

Tesis de Posgrado

Identificación y caracterización de proteínas en el Trypanosoma cruzi relacionadas con Glutación - S - transferasas de otros organismos con el fin de definir blancos potenciales para el control de la transmisión de la infección

García, Gabriela Andrea

2001

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:

García, Gabriela Andrea. (2001). Identificación y caracterización de proteínas en el Trypanosoma cruzi relacionadas con Glutación - S - transferasas de otros organismos con el fin de definir blancos potenciales para el control de la transmisión de la infección. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3346_Garcia.pdf

Cita tipo Chicago:

García, Gabriela Andrea. "Identificación y caracterización de proteínas en el Trypanosoma cruzi relacionadas con Glutación - S - transferasas de otros organismos con el fin de definir blancos potenciales para el control de la transmisión de la infección". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3346_Garcia.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

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

Identificación y caracterización de proteínas
en el *Trypanosoma cruzi* relacionadas con
Glutación - S - transferasas de otros organismos
con el fin de definir blancos potenciales para el
control de la transmisión de la infección.

Autor: Gabriela Andrea García

Director: Dr. Andrés Mariano Ruiz

INSTITUTO NACIONAL DE PARASITOLOGIA
"DR. MARIO FATALA CHABEN"
2001

N33467

A Florencia y Adrián

*Quienes desde su amor comprendieron
y apoyaron este trabajo día a día*

Los amo

Al principio de la investigación experimental sobre un tema determinado, la imaginación debe dar alas al pensamiento. En el momento de concluir y de interpretar los datos que los investigadores han reunido, la imaginación debe al contrario ser dominada y puesta al servicio de los resultados de los experimentos.

Louis Pasteur (1822-1895)

Síntesis del Trabajo de Tesis

Las drogas utilizadas para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, presentan múltiples efectos colaterales y una eficacia variable en las etapas indeterminada y crónica de la infección. Por otro lado, no existe una vacuna para esta parasitosis que impida la transmisión y/o la enfermedad.

Teniendo en cuenta la necesidad de la obtención de buenos inmunógenos y nuevas drogas tripanocidas más efectivas y seguras, el objetivo del Trabajo de Tesis fue definir nuevos posibles blancos para el control de la transmisión de la infección por *T. cruzi* a partir de la identificación de proteínas en este parásito relacionadas con glutatión-S-transferasas (GSTs) de otros organismos. La selección de las GSTs para dirigir esta búsqueda se basó en la participación de esta enzima, cuyos genes aun no fueron identificados en *T. cruzi*, en un metabolismo divergente entre el parásito y su hospedero mamífero y en una respuesta inmune protectora contra la infección experimental por este parásito.

En la primera parte del trabajo, que se denominó Parte A, se planteó la identificación de secuencias de genes funcionales resultantes del Proyecto Genoma de *T. cruzi* con homología con GSTs y su posterior caracterización a fin de determinar si su producto puede postularse como posible blanco de quimioterapia. Como resultado de esta búsqueda se identificó un nuevo gen de copia única, denominado *TcGRX*, cuyo producto presentó el patrón aminoacídico completo de glutarredoxinas (Grxs) y similitud con Grxs y GSTs de diversos organismos pero

no con enzimas de mamíferos. El modelado molecular de una porción de la TcGRX sobre la Grx 3 de *Escherichia coli* sugiere que esta proteína tendría la estructura típica de ambas familias.

En la segunda parte del trabajo, (Parte B), teniendo en cuenta la existencia en *T. cruzi* de antígenos de reactividad cruzada con la GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum* (GSTsj) y que las GSTs son enzimas muy conservadas en su estructura tridimensional se planteó la identificación de estos antígenos utilizando como herramienta un suero anti-GSTsj y su posterior caracterización y evaluación en protocolos de inmunoprotección. Por cromatografía de inmunoafinidad con el suero anti-GSTsj se purificó una fracción a partir de epimatigotes de *T. cruzi*, denominada PHGST, que presentó actividad de GST. Por otro lado, el rastreo de una biblioteca genómica de *T. cruzi* con este antisuero dio como resultado la selección de 38 clones que codificaron para antígenos de la familia Tc13 de la superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes. La identificación de un miembro de esta familia en la cepa Tulahuén del parásito, denominado PHGST#5, permitió su comparación con los ya conocidos en cuanto a su estructura aminoacídica. Mediante la hibridación de cromosomas separados y transferidos a membranas, se determinó que los genes *Tc13* se localizan principalmente en el cromosoma III y su homólogo.

Las funciones inmunomoduladoras descritas para ciertas proteínas de la superfamilia de antígenos de superficie y su participación en el desarrollo de una respuesta inmune protectora, sustentó la evaluación del antígeno PHGST#5 en experimentos de inmunoprotección en ratones de la cepa BALB/c. La inmunización plasmídica con PHGSTT#5 no indujo una

respuesta humoral específica y la respuesta celular, evaluada por efecto de hipersensibilidad retardada (DTH) frente a la inoculación con el antígeno recombinante, fue muy leve; mientras que, la inmunización con la proteína recombinante MBP-PHGST#5 indujo tanto una respuesta humoral como celular, evaluada por DTH. La inmunización plasmídica de PHGST#5, así como la inmunización con MPB-PHGST#5 produjeron una disminución significativa de la parasitemia luego del desafío con formas infectantes del parásito. La inmunización plasmídica con PHGST#5, además disminuyó el daño y el parasitismo tisular luego del desafío.

Por lo tanto, la selección de las GSTs para dirigir la definición de nuevos posibles blancos para el control de la transmisión de la infección por *T. cruzi* permitió identificar el gen *TcGRX*, cuyo producto por no poseer contraparte en el mamífero, luego de la caracterización bioquímica podría postularse como posible blanco para el diseño de drogas tripanocidas e identificar el antígeno PHGST#5, un nuevo miembro de la familia Tc13 con posibles epitopes compartidos con la GSTsj, y definir su efecto inmunoprotector tanto de la infección y como de la patología chagásica.

TITLE: Identification and characterization of *Trypanosoma cruzi* proteins related to Glutathion-S-Transferase of other organisms. Potential targets for the control of infection transmission.

Abstract

Trypanosoma cruzi is the ethiological agent of Chagas' disease. Drugs that have been utilized so far in the treatment of *T. cruzi* infection have shown colateral effects. No vaccine does exist against this parasitosis.

The objective of this thesis has been to define new possible targets for the control of the transmission of *T. cruzi* infection by means of the identification of parasite proteins related to Glutathion-S-Transferases (GST) of other organisms.

The selection of the GSTs to direct this screening was based on the participation of this enzyme in a divergent metabolism between the parasite and the mammal host and in a protective immune response against the experimental infection with the parasite. These genes have not been identified in *T. cruzi* yet.

The identification of functional *T. cruzi* gene sequences which showed GST homology resulted from the *T. cruzi* Genome Project and allowed to identify a unique (single) gene copy TcGRX. The product of this gene showed homology to glutaredoxin (Grxs) and GSTs from different organisms, but no homology was found to enzymes from mammals. This characteristics support biochemical studies of TcGRX with the purpose of postulating a new possible target for the design of trypanocidal drugs.

The utilization of an anti-GST of *Schistosoma japonicum* serum as a tool for the identification of cross reacting antigens in *T. cruzi* allowed the purification of an epimastigote fraction, which showed GST activity. The purification of this fraction was performed by immunoaffinity chromatography. The α -GSTsj serum was used to screen a *T. cruzi* genomic library and allowed the finding of a new member of the Tc13 family. This family belongs to the denominated PHGST#5 superfamily of trypomastigote surface antigens. This antigen showed an immunoprotective effect against the infection as well as the chagasic pathology, and was evaluated by means of both plasmid and recombinant protein immunization.

Gracias...

A mi hija Florencia, quien desde su madurez de una niña de cinco años pudo comprender el tiempo que no compartimos, haciéndome este duro trayecto un poco más liviano.

A mi marido, Adrián, por el amor que me brindó día a día, por su ayuda y comprensión sin límites.

A mis padres, Norma y Rómulo, por haberme dado la posibilidad de seguir esta carrera y por ocupar mi lugar en los momentos que estuve ausente.

A Jaqueline Búa, una gran amiga que siempre estuvo a mi lado en las buenas y en las malas, por su ayuda constante tanto en el laboratorio como en la vida.

A María Inés Antúnez, por su amistad y por su colaboración invaluable en la escritura y discusión de este trabajo.

A mi director, Andrés Ruiz, por haberme brindado la posibilidad de trabajar en el Instituto "Fatala Chabén", por su gran confianza y apoyo para que este trabajo saliera adelante.

A Carlos Pravia y Esteban Bontempi, quienes desde las reuniones grupales y la discusión diaria me aportaron cosas valiosísimas para concretar este trabajo y seguir siempre adelante.

A Claudia Nose, por su ayuda "imprescindible" en el diseño y edición de este trabajo.

A Natalia Ainciart, porque con su trabajo responsable y continuo colaboró con gran parte de los resultados presentados en esta tesis.

A María Arnaiz, por la amistad que compartimos y por su colaboración desinteresada en los experimentos de expresión *in vivo*.

A Mónica Esteva, por estar siempre, en especial cuando hay que trabajar con animales y parásitos, gracias por su ayuda en el diseño y la discusión de los experimentos de inmunoprotección.

A Adelina Riarte, por realizar la histología de los animales infectados.

A Natalia Pereira y Octavio Fusco, quienes día a día se preocuparon por las secuencias y un poquito más.

A Lilian Joensen, por su amistad, comprensión y su ayuda con el "english".

A Marta Lauricella, por su gran predisposición y colaboración continua.

A Susana Laucella, por su gran ayuda en la corrección de este trabajo.

A Nora Malagrino y Elsa Velázquez por la buena onda y ayuda que me dan todos los días.

A Laura Fichera, Miriam Postan y Cecilia Alvareda, por su ayuda en el cultivo de células y la obtención de tripomastigotes.

A Cristina Maidana por haberme bancado en su laboratorio durante cuatro meses escribiendo esta tesis.

A María del Carmen Aranda y Leticia Orellana, por encargarse de los ratoncitos.

A Rita Cardoni, por su discusión en la elaboración de los protocolos de inmunización.

A todos mis compañeros de trabajo, porque nunca me faltó una oreja que me escuche y alguien que me de un buen consejo. Porque gracias a todos ellos el paso por los momentos difíciles tanto laborales como de la vida se hacen más llevaderos.

INDICE

ABREVIATURAS.....	VIII
-------------------	------

INTRODUCCION:

1) LA ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA.....	1
1.1 - Antecedentes históricos y generalidades	1
1.2 – Epidemiología.....	2
1.3 - Vías de infección	3
1.4 - Fases de evolución clínica	5
1.5 - Diagnóstico.....	9
1.6 - Respuesta inmune a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.7 - desarrollo de la patología chagásica	14
1.8 - Alternativas para erradicar la endemia chagásica.....	16
1.8.1 - Eliminación del insecto vector.....	16
1.8.2 - Esterilización de sangre portadora para transfundir.....	17
1.8.3 - Quimioterapia de pacientes infectados.....	18
1.8.3.1 - Diseño racional de drogas en enfermedad de Chagas	20
1.8.4 - Una vacuna como prevención de la transmisión y la enfermedad.....	22
 2) <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>, AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	 27
2.1 - Ubicación taxonómica y estructura.....	27
2.2 - Ciclo de vida.....	29
<u>Figura:</u> Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
2.3 - Características particulares de la biología molecular de <i>T. cruzi</i>	33
2.4 - Proyecto genoma del <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
2.5 - Superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes	37
<u>Figura:</u> Superfamilia de Antígenos de Superficie de Tripomastigotes.....	41
 3) METABOLISMO DEL GLUTATIÓN EN <i>T. CRUZI</i>: UNA VÍA DIVERGENTE CON EL HOSPEDERO MAMÍFERO.....	 42
3.1- Funciones de la tripanotona.....	42
3.2- Descripción del ciclo del glutatión	44

3.2.1- Síntesis de los precursores de la tripanotina.....	44
3.2.2 - Síntesis de la tripanotina.....	45
3.2.3 - Ciclo redox de la tripanotina	46
3.2.4 - Otras enzimas del ciclo del glutatión en el <i>T. cruzi</i>	47
3.3 - Enzimas del ciclo del GSH/T(SH) ₂ como blancos probables de drogas tripanocidas.....	48
Figura: Metabolismo del glutatión	50

4)GLUTATIÓN-S-TRANSFERASAS Y TIORREDOXINAS /GLUTARREDOXINAS: DOS SUPERFAMILIAS DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DEL GLUTATIÓN:.....52

4.1 - Características generales de las glutatión-S-transferasas (GSTs).....	52
4.2 - Características generales de las Tiorredoxinas/Glutarredoxinas (Trxs/Grxs)	54
4.3 - Tiorredoxinas y glutarredoxinas en tripanosomátidos.....	55
4.4 - Glutatión-S-transferasas con características de glutarredoxinas.....	56
4.5 - Estructura tridimensional.....	57

TRABAJO DE TESIS

OBJETIVO GENERAL59

PARTE A:

Identificación y caracterización molecular del gen *TcGRX* que codifica para una probable glutarredoxina de *Trypanosoma cruzi* con homología con glutathione-S-transferasas.....60

A.1 – BREVE INTRODUCCION.....60

A.2 – OBJETIVOS PARTICULARES PROPUESTOS PARA ESTA SECCION.....60

A.3 – RESULTADOS Y DISCUSION.....61

- Identificación de un nuevo gen del *T. cruzi* homólogo con GSTs.....61

- Este nuevo gen codifica para una probable Grx homóloga a GSTs de diversos organismos.....62

- El modelado molecular de una porción de la <i>TcGRX</i> sugiere una estructura tridimensional típica de la familia Trx/Grx.....	63
- El gen <i>TcGRX</i> estaría presente en una única copia por genoma haploide del parásito.....	64
- La <i>TcGRX</i> recombinante formó cuerpos de inclusión y afectó el crecimiento de la bacteria al ser expresada en un sistema heterólogo	65

<u>Figura A-1:</u> Secuencia genómica y deducción de la secuencia aminoacídica de la <i>TcGRX</i>	68
---	----

<u>Figura A-2:</u> Alineamiento aminoacídico de la <i>TcGRX</i> con miembros seleccionados de las familias de Grxs.....	70
---	----

<u>Figura A-3:</u> Modelado molecular de la <i>TcGRX</i> tomando como templado la GRX3 de <i>E. coli</i>	72
--	----

<u>Figura A-4:</u> Caracterización molecular del gen <i>TcGRX</i>	74
---	----

<u>Figura A-5:</u> Expresión y purificación de la <i>TcGRX</i> recombinante.....	76
--	----

PARTE B:

Identificación y caracterización de antígenos en el <i>Trypanosoma cruzi</i> con epitopes compartidos con la GST de 26 kDa de <i>Schistosoma japonicum</i> . Evaluación de estos antígenos en ensayos de inmunoprotección experimental.	78
--	----

B.1 – BREVE INTRODUCCION	78
--------------------------------	----

B.2 – OBJETIVOS PARTICULARES PROPUESTOS PARA ESTA SECCION.....	79
--	----

B.3 – RESULTADOS Y DISCUSION.....	79
-----------------------------------	----

- El suero anti-GSTsj reconoce antígenos en el estadio epimastigote de <i>T. cruzi</i>	79
- La actividad de GST en la FS de <i>T. cruzi</i> se vio levemente incrementada luego del tratamiento con pH ácido durante tiempos corto.....	80
- Al menos diez proteínas de <i>T. cruzi</i> fueron purificadas por inmutafinidad con anticuerpos anti-GSTsj.....	83

- La fracción PHGST de <i>T. cruzi</i> purificada por cromatografía de afinidad con suero anti-GSTsj mostró actividad de GST.....	83
- La proteína de 10.7 kDa purificada por inmunoafinidad con el suero anti-GSTsj sería de membrana o secretable.....	85
<u>Figura B-1:</u> Reactividad del suero anti-GSTsj contra antígenos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	88
<u>Figura B-2:</u> Actividad de GST en fracción soluble (FS) de <i>T. cruzi</i> sometida a diferentes tratamientos de pH y temperatura.....	90
<u>Figura B-3:</u> Perfil electroforético de la fracción PHGST purificada a partir de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> por cromatografía de afinidad con IgG anti-GSTsj.....	91
<u>Figura B-4:</u> Caracterización de la secuencia N-terminal de la proteína PHGST 4.....	92
- El suero anti-GSTsj reconoce epitopes en antígenos de superficie de tripomastigotes de la familia Tc13.....	94
- La familia Tc13 está compuesta por varios miembros que difieren en el número de repeticiones y en la presencia de la secuencia consenso para anclaje por GPI.....	96
- El antígeno PHGST#5 fue expresado como proteína de fusión en un sistema heterólogo.....	99
- Los genes que codifican para la familia Tc13 se localizan principalmente en el cromosoma III y en su homólogo de 1020 kpb.....	100
- La hibridización de cromoblots realizados a diferentes tiempos de cultivo con PHGST#5 sugiere que el cariotipo de <i>T. cruzi</i> permanece estable a lo largo del ciclo celular.....	101
<u>Figura B-5:</u> Esquema del clon PHGST#5 obtenido en el rastreo de una biblioteca genómica de la cepa Tulahuén de <i>T. cruzi</i> con un suero Anti-GSTsj.....	104
<u>Figura B-6:</u> Alineamiento de PHGST#5 con los miembros conocidos de la familia Tc13 de la superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes.....	105
<u>Figura B-7:</u> Expresión del antígeno PHGST#5 en sistemas heterólogos....	107
<u>Figura B-8:</u> Localización cromosómica de PHGST#5.....	109
- El antígeno PHGST#5 fue seleccionado para realizar ensayos de inmunoprotección en ratones de la cepa BALB/c.....	111
- El antígeno PHGST#5 clonado en el vector para vacuna de AND pcDNA3.1 se expresó en sistemas eucariotas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	111
- La inmunización plasmídica con PHGST#5 no desencadenó una respuesta específica de anticuerpos.....	113

- Los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5 presentaron una leve respuesta de hipersensibilidad retardada contra la proteína recombinante MBP-PHGST#5.....	115
--	-----

- Los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5 presentaron una reducción significativa de la parasitemia luego del desafío con formas infectantes del parásito.....	116
--	-----

- La inmunización plasmídica con PHGST#5 produjo una disminución de la inflamación y parasitismo tisular en miocardio y músculo esquelético.....	117
--	-----

TABLA 1: Estudio histopatológico en diferentes órganos de ratones inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 infectados crónicamente por <i>T. cruzi</i> :	120
--	-----

TABLA 2: Parasitismo tisular en diferentes órganos de ratones inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 infectados crónicamente por <i>T. cruzi</i> :	121
--	-----

- La inmunización con MBP-PHGST#5 recombinante produjo respuesta humoral y celular específica	122
---	-----

- La inmunización con MBP-PHGST#5 produjo una disminución de la parasitemia luego del desafío con tripomastigotes metacíclicos con respecto al grupo inmunizado con MBP.....	123
--	-----

Figura B-9: Expresión de PHGST#5 en sistemas eucariotas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	126
---	-----

Figura B-10: Respuesta humoral y celular generada por los ratones inmunizados con PHGST#5 plasmídico.....	128
--	-----

Figura B-11: Curva de parasitemia de los ratones sometidos a inmunización plasmídica con PHGST#5 luego del desafío con tripomastigotes sanguíneos.....	130
---	-----

Figura B-12: Respuesta humoral y celular generada por los ratones inmunizados con PHGST#5 recombinante.....	131
--	-----

Figura B-13: Curva de parasitemia de los ratones inmunizados con PHGST#5 recombinante luego del desafío con tripomastigotes metacíclicos.....	133
--	-----

MATERIALES Y METODOS

1) MEDIOS Y SOLUCIONES.....	134
------------------------------------	-----

2) PARASITOS: CULTIVO Y OBTENCION DE SUBFRACCIONES.....	134
--	-----

2.1- Cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	134
---	-----

2.2- Preparación de Homogenato Total (HT) y Fracción Soluble (FS) de epimastigote.....	135
--	-----

2.3- Preparación de la fracción soluble (FS) de epimastigotes para detectar actividad de GST.....	135
---	-----

2.4- Preparación de lisados de tripomastigotes.....	136
3) MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE GST.....	136
4) OBTENCION DEL SUERO ANTI- GSTsj.....	137
5) PURIFICACION DE LA FRACCION PHGST POR CROMATOGRAFIA DE INMUNOAFINIDAD Y SECUENCIACION DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LAS PROTEINAS.....	138
6) DESCRIPCION DE LAS GENOTECAS DE <i>T. CRUZI</i> UTILIZADAS.....	139
6.1- Biblioteca genómica de la cepa Tulahuén de <i>T. cruzi</i>	139
6.2-Biblioteca de ADNc del clon CL Brener de <i>T. cruzi</i>	139
6.3- Biblioteca genómica del clon CL Brener de <i>T. cruzi</i>	139
7) DETECCION DE CLONES EN LAS GENOTECAS.....	140
7.1- Rastreo inmunológico con suero de conejo anti-GSTsj.....	140
7.2- Rastreo de la biblioteca genómica del clon CL Brener de <i>T. cruzi</i> con sondas radiomarcadas:	141
8) CARACTERIZACION DE LOS GENES OBTENIDOS.....	141
8.1- Secuenciación del ADN.....	141
8.2- Experimentos de "southern blot"	142
8.3 Preparación e hibridación de "cromoblots"	143
8.4- Reacción de polimerasa en cadena (PCR)	144
8.5- Obtención del extremo 5' del clon PHGST#5 en la cepa Tulahuén.....	146
8.6- Determinación del tamaño de los insertos de los clones obtenidos por rastreo inmunológico con el suero anti-GSTsj.....	146
8.7- Hibridación de los clones obtenidos en el rastreo inmunológico con el suero anti-GSTsj con el clon PHGST#5.....	147
8.8- Números de acceso al Genbank® de las secuencias obtenidas.....	147
9) BUSQUEDA DE HOMOLOGIAS EN BANCOS DE DATOS Y ANALISIS DE SECUENCIAS.....	147
9.1- Comparación de secuencias en bancos de datos.....	147
9.2- Análisis de secuencias proteicas.....	148
9.3- Modelado molecular de la TcGRX.....	149
10) CLONADOS Y PROTOCOLOS DE INDUCCION Y PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES.....	149
10.1- Clonado del gen TcGRX en el vector de expresión pQE31.....	149
10.2- Expresión y purificación de la TcGRX recombinante.....	150

10.3- Expresión de PHGST#5 en pBluescript.....	151
10.4- Sub-clonado de PHGST#5 en pMalp2.....	151
10.5- Expresión y purificación de MBP-PHGST#5.....	152
10.6- Clonado de PHGST#5 en pcDNA3.1.....	152
10.7- Expresión del antígeno PHGST#5 en sistemas eucariotas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	154
11) INMUNIZACIONES Y EVALUACION DE RESPUESTA INMUNE Y PROTECTIVA.....	155
11.1) Esquemas de inmunización plasmídica con PHGST#5 y experimentos de inmunoprotección.....	155
11.2) Estudio histopatológico de los distintos órganos de los ratones sometidos a inmunización génica e infectados crónicamente con <i>T. cruzi</i>	156
11.3) Esquema de inmunización con PHGST#5 recombinante y experimentos de inmunoprotección.....	157
11.4) Respuesta de hipersensibilidad retardada de los ratones inmunizados con PHGST#5.....	157
12) ANALISIS INMUNOENZIMATICO DE PROTEINAS ELECTROTRANSFERIDAS A NITRATO DE CELULOSA ("WESTERN BLOT").....	158
13) ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)	159
DISCUSION GENERAL.....	161
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	175
BIBLIOGRAFIA.....	177

ABREVIATURAS

ADNc: ADN copia
 CDNB: 1-cloro 2,4-dinitrobenzenceno
 DTH: hipersensibilidad retardada
 ELISA: enzimoimmunoassay
 EST: "Expressed Sequence Tags", base de secuencias de ADNc del GenBank®
 FS: fracción soluble de epimastigotes de *T. cruzi*
 GPI: glicosil fosfatidil inositol
 Grx: glutarredoxina
 GST: glutatión-S-transferasa
 GSTsj: glutatión-S-transferasa de 26 kDa de *Schistosoma japonicum*
 HT: homogenato total de epimastigotes de *T. cruzi*
 IFI: inmunofluorescencia indirecta
 IMAC: cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
 IPTG: isopropil- β -tio-galactopiranosido
 MBP: "Maltosa binding protein"
 PCR: reacción de polimerasa en cadena
 PFGE: electroforesis en campo pulsado
 PHGST: fracción proteica de epimastigotes de *T. cruzi* purificada con suero anti-GSTsj
 PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro
 poliPy: polipirimidinas
 SDS: dodecil sulfato de sodio
 SIRE: "short interspersed repetitive element"
 SNC: suero normal de conejo
 SNR: suero normal de ratón
 SRC: suero ratón crónico
 TcGRX: glutarredoxina de *T. cruzi*
 TLCK: N α -p-tosil-L-lisina clorometil cetna
 Trx: tiorredoxina
 TS: transialidasa
 3' UTR: región 3' no traducida

INTRODUCCION

1) LA ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

1.1 - Antecedentes históricos y generalidades

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria endémica del continente americano y su área de transmisión vectorial se extiende desde México hasta el centro de Argentina y Chile.

La historia del descubrimiento de la enfermedad se remonta al año 1907, cuando el médico brasileño Carlos Chagas es comisionado por el Dr. Oswaldo Cruz, para investigar un brote de paludismo en el estado de Minas Gerais. Chagas descubrió en el intestino del triatomino hematófago *Panstrongilus megistus* (denominados "barbeiros" por los lugareños) la presencia de organismos flagelados hasta ese momento desconocidas. Observó, además la presencia de estos insectos en viviendas humildes y encontró también este parásito en la sangre de algunos pobladores, denominándolo *Trypanosoma cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz (Chagas, 1909). A partir de los descubrimientos realizados se intensificaron considerablemente los estudios relacionados con este mal, describiéndose las fases crónicas con compromiso cardíaco y nervioso y reconociendo animales silvestres como verdaderos reservorios (Chagas, 1920; Chagas, 1921). El descubrimiento de esta tripanosomiasis presenta la particularidad de que tanto el parásito como el vector fueron descritos antes que la propia enfermedad.

Gaspar Vianna es el primero que hizo una descripción pormenorizada de las lesiones anatomopatológicas, así como Guerreiro y Machado fueron quienes se interesaron en el diagnóstico de la enfermedad a través de la utilización de la reacción de fijación del complemento (Guerreiro y Machado, 1913).

En 1924 se describieron los primeros casos de enfermedad de Chagas agudo en humanos en la República Argentina y fue a partir del año 1926

que Salvador Mazza se dedicó al estudio de la enfermedad en nuestro país. Realizó un registro de más de mil casos de esta afección, describiendo la infestación del *Triatoma infestans* en ambientes domiciliarios, la infección de los animales domésticos (Mazza, 1943), las formas crónicas de la enfermedad (Mazza, 1936 a) y la transmisión por la leche materna (Mazza y col., 1936 b). Trabajó también en la evolución de los métodos diagnósticos, y realizó las primeras experiencias terapéuticas (Mazza, 1941). En 1932 Romaña describió en el Chaco los primeros casos de miocarditis chagásica crónica y en 1935 el síndrome de la picadura palpebral como la puerta de entrada ocular, característica de la fase aguda de la enfermedad (Romaña, 1935).

1.2 - Epidemiología y prevalencia

El área de prevalencia de la enfermedad de Chagas se superpone con el área de distribución geográfica de los vectores triatomíneos, extendiéndose desde el paralelo 40° de latitud Norte en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el paralelo 45° de latitud Sur en la República Argentina, provincia de Chubut y Chile (Burkholder y col., 1980).

La Organización Panamericana de la Salud ha determinado que más de 50 millones de personas están expuestas al riesgo de infectarse por *T. cruzi* en los países del Cono Sur, estimándose que la población infectada es de alrededor de 10 a 11 millones de habitantes (OPS, 1999).

En Argentina se estima una población infectada de 2 millones de habitantes (Esquivel y Segura, 1994), siendo del 7.2% la tasa de infección en la población adulta en el año 1998 (OPS, 1999). La evaluación serológica realizada durante el año 1998 en niños de 6 meses a 14 años de edad demostró una prevalencia entre 1.77% a 2.3% dependiendo del grupo etario analizado en nuestro país. En ese mismo año se detectó un 4.6% de infección por *T. cruzi* entre los donantes en bancos de sangre y

una prevalencia global en mujeres embarazadas del 6.4%. Por otra parte, la transmisión congénita fue del 0.9% a partir del seguimiento de 2001 niños (OPS, 1999).

1.3 - Vías de Infección

La principal vía de transmisión de la endemia chagásica es la vectorial. El parásito es transmitido por insectos hematófagos de más de ochenta especies de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* (Zeledón, 1972).

La transmisión por el vector se lleva a cabo en el ciclo doméstico en el que participan el hombre, los mamíferos domésticos y los insectos hematófagos adaptados al hábitat domiciliario y/o peridomiciliario pero existe también un ciclo silvestre de transmisión en el que el hombre llega a participar accidentalmente, en las frecuentes incursiones de devastación de los bosques. La posibilidad de infección natural con el parásito se encuentra en vinculación directa con las condiciones socio-económicas de los pobladores, ya que la precariedad de sus viviendas permite el alojamiento de los insectos entre la paja de los techos o en las grietas de las paredes de adobe. La vía de entrada del parásito a un mamífero no infectado se da cuando los insectos parasitados luego de alimentarse con la sangre del mamífero depositan con sus deyecciones las formas infectantes del parásito que penetran a través de las mucosas o de las excoriaciones de la piel a su nuevo hospedero. Por otro lado, la entrada del parásito a un insecto no parasitado se produce cuando el vector succiona sangre de un mamífero infectado.

En nuestro país el insecto vector es *Triatoma infestans* (Mazza, 1943), conocido popularmente como vinchuca. Sin embargo, también se ha descrito una especie silvestre, *Triatoma guasayana*, como una potencialmente peligrosa para el hombre (Carcavallo y Martínez, 1985) que puede ser encontrada en domicilio y peridomicilio y de la cual se ha

aislado *T. cruzi* y reproducido con él el ciclo de infección en el ratón (Lauricella y col., 1999).

Si bien la vía de transmisión vectorial es la principal, existen otras vías de transmisión que pueden considerarse secundarias, estas son: la vía transfusional, la vía transplacentaria, a través de trasplantes de órganos, y con muy baja frecuencia la vía digestiva y la vía sexual.

La vía transfusional es el mecanismo responsable del aumento de casos de infección chagásica en zonas urbanas, siendo la causa de la contaminación de los bancos de sangre por donantes que desconocen su seropositividad (Wendel, 1998). En la mayoría de los países del Cono Sur las normas nacionales indican el uso de al menos dos técnicas de diagnóstico para realizar un tamizaje serológico de la sangre infectada por *T. cruzi* en los bancos de sangre. En nuestro país, desde 1998 el Ministerio de Salud realiza inspecciones al respecto en bancos de sangre y servicios de hemoterapia públicos y privados. La prevalencia de infección por *T. cruzi* para la Argentina detectada en los bancos de sangre fue del 4.6% en el año 1998 (OPS, 1999).

La infección congénita es muy poco frecuente y puede producirse con baja o alta parasitemia tanto en forma intrauterina como en el momento del parto (Bittencourt, 1988). En evaluaciones realizadas durante 1998 en nuestro país se determinó una tasa de transmisión vertical del 0.9% (OPS, 1999). El mecanismo por el cual algunos niños de madres chagásicas contraen la infección y otros no, es aún desconocido.

La transmisión del parásito por vía del trasplante de órganos favorece la infección dada la inmunosupresión terapéutica a la que es sometido el receptor (Jost y col., 1977). En nuestro país se observó que la reactivación de la infección en receptores chagásicos renales fue del 21% y la transmisión de la infección a través del donante en receptores no chagásicos fue del 18.7%, (Riarte y col., 1999). Por otro lado, el seguimiento de pacientes chagásicos crónicos sometidos a trasplante de médula ósea por un período de siete años, mostró un índice de

reactivación de la infección del 2% con un 20% de parasitemias positivas (Dictar y col., 1998).

La posibilidad de que la infección chagásica se produzca por vía buco gastroentérica está documentada ampliamente por observaciones de múltiples autores. Los mecanismos de entrada observados son la ingestión de animales naturalmente infectados o de alimentos contaminados con secreciones de los mismos (Wood, 1942; Shikanai-Yasuda y col., 1991). Existe también la posibilidad de transmisión del *T. cruzi* de madre a hijo a través de la ingestión de la leche materna, pero su frecuencia es tan escasa que debe ser considerada como un riesgo excepcional. Sin embargo, sería prudente que la madre chagásica aguda no amamante a su hijo (Storino y Jorg, 1994).

La posibilidad de transmisión del *T. cruzi* por vía sexual puede considerarse posible, ya que se encontró al parásito en sangre menstrual (Jorg y Oliva, 1980). Por otro lado, se han documentado casos de Chagas agudo en hombres donde no fue posible demostrar la posibilidad de una contaminación "clásica" abriendo la probabilidad de una entrada del parásito por vía sexual, siendo el mayor argumento para tal hipótesis la detección del *T. cruzi* en extendidos vaginales de las esposas (Carpintero, 1982).

Con menor frecuencia la transmisión puede ocurrir también accidentalmente, ya sea manipulando material de laboratorio, animales parasitados, cultivos de tejido infectados, insectos transmisores accidentales (chinchas, piojos) etc.

1.4- Fases de evolución clínica

La infección con el *T. cruzi* es frecuentemente inaparente y cuando los individuos infectados muestran sintomatología, no está asociada a un signo específico. En la enfermedad de Chagas se distinguen tres fases:

una fase aguda, una fase crónica asintomática, denominada fase indeterminada y una fase crónica sintomática.

La fase aguda puede presentarse en los períodos iniciales de la infección en la cual sólo del 5 al 10% de los individuos infectados presentan síntomas inespecíficos como fiebre, dolores articulares, quebrantamiento general, adenopatías, esplenomegalia y dermatopatías, o más específicos como el complejo oftalmoganglionar o “signo de Romaña” (Romaña, 1935).

Cuando el parásito, que penetra a través de la piel, origina una lesión manifiesta se está en presencia de las formas clínicas de la infección con puerta de entrada aparente (primoinfección cutánea), entre las que se destaca el complejo oftalmo-ganglionar, con una incidencia de presentación de hasta un 50% para las áreas endémicas de Brasil y Argentina (Rassi y col., 1958). Con menos frecuencia se observa el chagoma de inoculación, el que se presenta como una mácula de aspecto erisipeloides o un forúnculo en las partes expuestas del cuerpo. Las formas clínicas en las cuales no se puede establecer una relación entre la puerta de entrada y los signos clínicos, se denominan, sin puerta de entrada aparente.

Luego de un período corto de incubación post-infección, los pacientes pueden manifestar signos o síntomas tales como: fiebre, adenopatías, astenia, anorexia, dolores musculares, cefaleas, edemas, hepato-esplenomegalia, entre otros, y a menudo diarreas y vómitos en lactantes. En los niños también son importantes los compromisos cardíacos y la meningoencefalitis (Lugones y col., 1979). El daño miocárdico es el hallazgo más importante de esta etapa de la infección, pero solamente en un 5% del total de infectados se detectan casos de miocarditis aguda no severa y reversible (Laranja y col., 1956).

La fase indeterminada de la enfermedad se caracteriza por ser asintomática u oligosintomática. Fue definida como el período comprendido entre la remisión de los síntomas y signos de la etapa

aguda de la infección con *T. cruzi* y la aparición de las manifestaciones clínicas de la forma crónica de la enfermedad (Laranja y col., 1956). Dicha etapa puede comenzar semanas o meses después de la etapa aguda (Dias, 1989).

En las áreas endémicas el grupo de pacientes en fase indeterminada es el más numeroso. En estudios longitudinales se determinó que el 80% de los pacientes cursan esta etapa evolucionando favorablemente sin evidencias de daño cardíaco y/o digestivo (Dias, 1989; Storino y col., 1992). Se estima que solamente de un 2 a un 5% de los pacientes evolucionan a la fase crónica con síntomas y signos de cardiopatía (Dias, 1989). El buen pronóstico que caracteriza a esta etapa está avalado por la baja mortalidad que presenta, siendo similar a la observada en la población general (Coura y Pereira, 1984), no conociéndose aún los mecanismos patogénicos que determinan la evolución hacia la etapa crónica.

Durante la fase crónica se evidencian las alteraciones características de la enfermedad de Chagas que comprometen el corazón y el tubo digestivo. Se ha propuesto que la mayor prevalencia de patología en la enfermedad crónica se presenta en aquellos pacientes que habían evidenciado manifestaciones clínicas en la fase aguda de su enfermedad (Pinto Díaz, 1982).

Las formas clínicas que se observan en el continente americano muestran una variabilidad en sentido geográfico; un ejemplo lo constituye el predominio de la patología cardíaca en el sur del Brasil, Uruguay, Argentina y Chile y el predominio de la patología visceral en Bolivia y en el centro y norte del Brasil.

El porcentaje de los infectados que desarrollan lesiones cardíacas (20 a 30%), varía en función de la edad, del tiempo de exposición en área endémica, del número de reinfestaciones, del nivel socioeconómico y del estado de nutrición (Storino y Milei, 1986). La miocarditis chagásica crónica presenta algunas diferencias en su forma de presentación. En

algunas regiones endémicas, la mayoría de los pacientes infectados desarrollan una miocarditis crónica, mientras que en otras, las manifestaciones cardíacas son más tardías, en menor porcentaje y de evolución más lenta. En los casos en los cuales la sintomatología es leve, la enfermedad se manifiesta con palpitaciones aisladas y se acompaña de una incidencia del 2.4 al 4.4% de alteraciones electrocardiográficas (Macedo, 1980). En los casos de insuficiencia cardíaca avanzada, en orden de frecuencia se observan palpitaciones, disnea, mareos, precordialgia, síncope, tromboembolismos, taquiarritmias auriculares o ventriculares bradiarritmias por disfunción sinusal o trastornos de la conducción auriculo-ventricular (Giniger y col., 1992; Elizari y Chiale, 1993).

Se ha observado que la muerte de un paciente con enfermedad de Chagas puede ocurrir por insuficiencia cardíaca o tromboembolismo pulmonar (Castagnino y col., 1978; Granzotti y col., 1985).

Los pacientes chagásicos en fase crónica pueden presentar anomalías del tubo digestivo como la dilatación del esófago y del colon (megaesófago y megacolon). En ciertas regiones endémicas ubicadas por encima de la línea del ecuador, se describieron un mayor número de casos, en países como Panamá y Venezuela (Blandon y col., 1969). Por debajo de la línea del ecuador, el país en donde se halla la patología con mayor frecuencia es en la región central del Brasil. La esofagopatía chagásica se presenta con mayor frecuencia entre los 20 y 40 años de edad y predomina en el sexo masculino. Las lesiones en el tubo digestivo serían originadas por una destrucción neuronal del sistema nervioso autónomo (Rezende, 1988).

1.5- Diagnóstico

El diagnóstico infectológico de la enfermedad de Chagas se basa en un trípode constituido por la clínica, la epidemiología y el laboratorio. Durante la fase aguda de la enfermedad la presencia de parásitos circulantes permite hacer el diagnóstico mediante la identificación del mismo, utilizando métodos directos como la gota fresca, el Método de Strout y el microhematocrito o indirectos como el hemocultivo o el xenodiagnóstico (Ledesma Patiño y col., 1992). Los más sensibles son el strout (99.2%) y el xenodiagnóstico (100%) (Marteleur y Barbieri, 1984).

En la etapa crónica de la infección, el número de parásitos circulantes es muy bajo y los métodos utilizados en la fase aguda tienen baja sensibilidad, por lo que se recurre al diagnóstico serológico. Estas técnicas se basan en la detección de anticuerpos específicos contra el *T. cruzi*, y las más utilizadas son fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y enzimoimmunoensayo (Freilij y col., 1994). El análisis serológico es de fundamental importancia en el control de la enfermedad y en los bancos de sangre.

Con el desarrollo de las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, fue posible demostrar la presencia del parásito en la etapa crónica de la infección. Actualmente se está evaluando la utilidad del método en el seguimiento de los pacientes chagásicos a fin de estimar con precisión la carga parasitológica antes y después de la quimioterapia específica (Britto y col., 1999).

1.6 - Respuesta Inmune a la Infección por *T. cruzi*

La infección por *T. cruzi* modifica en forma generalizada el sistema inmune, activando primeramente los mecanismos inespecíficos de defensa y luego, sobre la base de éstos se desarrolla la posterior respuesta específica, tanto humoral como celular. Se ponen así en marcha

prácticamente todos los mecanismos inmunes efectores conocidos, y todos ellos participan en la resistencia a la infección (Tarleton, 1993). La respuesta inmune controla la invasión parasitaria, pero a pesar de ello, no es esterilizante, ya que no elimina totalmente al parásito, estableciéndose un equilibrio huésped-parásito que conduce a la cronicidad (Tarleton, 1993).

Ya hace 15 años se estableció la importancia de los mecanismos inmunes disparados en los primeros días de la infección en el control de la replicación temprana del parásito (Trishman, 1986), y mas recientemente se demostró que la carga parasitaria en la fase aguda se relaciona con la parasitemia y con el desarrollo de la patología en la etapa crónica de la infección (Marinho, 1998).

La respuesta inmune temprana está mediada principalmente por células fagocíticas. Estas participan en la presentación antigénica y son hospedadoras del parásito, ya que *T. cruzi* puede invadir macrófagos no activados, escapar de la vacuola fagocítica y quedar libre en el citoplasma donde es capaz de multiplicarse (Nogueira y col, 1977). Sin embargo, una vez que las células fagocíticas se activan por citoquinas, fundamentalmente interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), adquieren capacidad tripanocida destruyendo los parásitos de su interior (Nogueira y Cohn, 1977). Los mecanismos involucrados en la destrucción del parásito *in vitro* incluyen la liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Tanaka y col., 1983) y del nitrógeno (ERO) (Muñoz-Fernández y col., 1992; Gazzinelli y col., 1992), mientras que *in vivo* el control depende principalmente de la activación de la sintetasa de óxido nítrico inducible por IFN- γ (iNOS) de macrófagos y del consecuente incremento de óxido nítrico (NO) (Petray y col., 1994; Vespa y col., 1994). La importancia de estos mecanismos a quedado demostrada con modelos experimentales deficientes en la iNOS o en el receptor de IFN- γ , en los que la sobrevida del huésped infectado se ve seriamente afectada (Holscher y col., 1998).

De acuerdo al perfil de citoquinas, la respuesta inmune puede ser de tipo Th1 o Th2 (Mossman y col., 1986). La liberación de citoquinas fue descrita en principio para linfocitos CD4⁺, por eso en forma generalizada se utilizan los términos Th1 y Th2 para definir el tipo de respuesta. Pero también se hace referencia a un perfil Tc1 y Tc2 cuando las células productoras son linfocitos citotóxicos CD8⁺. La respuesta Th1 se caracteriza por la producción de IFN- γ , interleuquina 2 (IL-2) y TNF- β y se asocia con mecanismos de resistencia a patógenos intracelulares a través de la activación de células fagocíticas e inducción de anticuerpos de tipo IgG2a e IgG3, que al unirse a receptores para el fragmento Fc de las IgGs (Fc γ R) o a través del complemento facilitan la fagocitosis de los patógenos (Abbas y col., 1996). Las citoquinas de tipo Th2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 regulan la respuesta humoral dirigiendo la síntesis de anticuerpos de isotipos IgG1 e IgE importantes en la resistencia a patógenos extracelulares a través de su neutralización o de la degranulación de mastocitos y eosinófilos. La respuesta Th2 además es importante para modular la respuesta Th1, ya que esta última genera una intensa reacción inflamatoria debido a los mediadores liberados (Abbas y col., 1996). El desarrollo de uno u otro tipo de respuesta depende de diversos factores, como ser concentración y estado físico de los antígenos, señales co-estimuladoras de las células presentadoras de antígenos y citoquinas liberadas inicialmente (Abbas y col., 1996). Entre éstas, es fundamental la liberación temprana de IL-12 e IL-18 para desencadenar una respuesta Th1 y de IL-4 para una respuesta Th2 (Abbas y col., 1996; Akira, 2000).

En la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi* el perfil de citoquinas es predominantemente Th1, con alta producción de IFN- γ e IL-12 (Nabors y Tarleton, 1991; Antúnez y Cardoni, 2000) y anticuerpos de isotipo IgG2a (Spinella y col., 1999). Asimismo, en el bazo de ratones infectados se observa la aparición de ARNm de IL-12 e IL-18 (Meyer y col., 1997), aunque esta última citoquina sólo se produce en ratones con

mayor resistencia (Antúnez y Cardoni, 2000). La inducción de una respuesta Th1 *in vivo*, así como la administración de IL-12, protege a ratones de cepas susceptibles del desafío con *T. cruzi* (Hoft y col., 2000), mientras que el tratamiento con anti-IL-12 incrementa su susceptibilidad (Hunter y col., 1996; Aliberti y col., 1996). Sin embargo, se ha comprobado que más allá de su presencia, la cinética de aparición de las citoquinas es la que verdaderamente se asocia con los mecanismos de resistencia, ya que si bien el IFN- γ es una citoquina central en los mecanismos de defensa contra el parásito, sólo parece ser esencial en los primeros días de la infección (Plata y col., 1987; McCabe y col., 1991). Así, los ratones de cepas susceptibles presentan un retraso en la aparición de las citoquinas de tipo Th1 en comparación con cepas resistentes (Zhang y Tarleton, 1996; Antúnez y Cardoni, 2000).

Sin embargo, a pesar de su rol fundamental en la resistencia a la infección, la respuesta Th1 genera una intensa respuesta inflamatoria, ya que la activación de células fagocíticas implica la liberación de TNF, IL-1, ERO y ERN, entre otros, que en su conjunto pueden inducir o participar en la generación del daño tisular (Cardoni, 1997). Por otro lado, el IFN- γ incrementa además la expresión de moléculas MHC clase I y II y de moléculas de adhesión intercelular (Lauella y col., 1996). Por ello también parece ser importante la producción de citoquinas con efectos regulatorios características de una respuesta de tipo Th2, como la IL-10 que previene la patología inducida por sobreestimulación de las células T (Hunter y col., 1997). El factor transformante del crecimiento- β (TGF- β) (Silva y col., 1991), IL-4 (Hoft y col., 1993), IL-6 (Truyens y col., 1994) e IL-13 (Antúnez y Cardoni, 2001) se hallan también incrementados.

El papel que cumple la respuesta inmune celular en la resistencia a la infección, ha quedado bien establecido, ya que cepas de ratones genéticamente deficientes en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ o timectomizados presentan un aumento en la susceptibilidad a la infección, mientras que

a nivel del miocardio el infiltrado inflamatorio es de menor magnitud (Tarleton, 1990; Rottemberg y col., 1992).

La respuesta humoral está caracterizada por la presencia de anticuerpos fijadores del complemento. En el transcurso de la infección se produce una gran variedad de anticuerpos específicos debido a la extensa variedad de antígenos parasitarios capaces de inducir una respuesta inmune. Estos anticuerpos se conservan de por vida, por lo que su detección en las personas infectadas no tratadas es criterio de diagnóstico de la infección por el parásito. En el humano y en ratón la primera inmunoglobulina específica detectada durante la infección es la IgM y 10 a 40 días después de la infección aparecen las IgGs específicas (Vattuone y col., 1973; Hofflin y col., 1987).

En modelos experimentales se observó que las cepas resistentes de ratones presentan mayores niveles de IgG específica y más tempranamente que las cepas susceptibles (Tarleton y Kuhn, 1983) y que ratones genéticamente deficientes en linfocitos B sucumben a la infección (Kumar y Tarleton, 1998), estos datos demuestran que la producción de anticuerpos es absolutamente necesaria para el control de infección.

El papel de las células T en el período crónico de la infección es poco claro, pudiendo ejercer una acción colaboradora en la activación de células B específicas contra el parásito (Burgess y Hanson, 1980) productoras de anticuerpos IgG1 e IgG2a (Marinho, 1998). En esta etapa hay linfocitos T CD8⁺ que destruyen células parasitadas que presentan antígenos asociados a MHC-I (Nickell y col., 1993). La importancia de mecanismos inmunes está documentada por la exacerbación de la patología y el aumento de la carga de parásitos en el tejido miocárdico en modelos de depleción continua de células CD8⁺ y/o CD4⁺ (Tarleton y col., 1994). A pesar de los niveles elevados de IFN- γ encontrado en el suero de los ratones crónicos (Antúnez y Cardoni, 2000), éste no parece relacionado con las bajas parasitemias en esta etapa (Silva y col., 1992). El infiltrado inflamatorio de los corazones de ratones infectados con *T.*

cruzi está principalmente compuesto por linfocitos T CD8⁺ y se producen citoquinas tanto de tipo Th1 como Th2 (Tarleton y col., 1994).

Los mediadores inflamatorios liberados durante una infección actúan regulando los niveles de moléculas de adhesión (CAMs) como s-VCAM, s-PSelectina y CD44, las cuáles son muy importantes en las interacciones intercelulares. La formación de lesiones inflamatorias en la infección por *T. cruzi* involucra adhesión entre las membranas citoplasmáticas de las células musculares cardíacas con los linfocitos y/o macrófagos (Andrade y col., 1994). En pacientes crónicamente infectados se encontró un incremento de s-VCAM-1 y s-PSelectina, encontrándose una correlación positiva entre esta última y la severidad de la enfermedad y una disminución de los niveles de CD44 en pacientes chagásicos crónicos con miocardiopatía severa (Laucella y col., 1996). Aún queda por dilucidar, cual es la función de estas moléculas en la patogénesis de la infección crónica.

1.7 - Desarrollo de la patología chagásica

El mecanismo fisiopatológico de la enfermedad de Chagas no se ha aclarado totalmente y hasta el momento se han propuesto diversas hipótesis no mutuamente excluyentes para explicar el desarrollo de la miocardiopatía chagásica crónica.

Existen dos hipótesis principales para explicar el origen de la patología chagásica. Por un lado, el dogma que atribuye la etiología de esta enfermedad a procesos autoinmunes y por otro, el planteo mucho más reciente que su desarrollo está directamente relacionado con la persistencia del parásito en los tejidos afectados (Tarleton y Zhang, 1999).

Existen evidencias que apoyan un origen autoinmune de la patogénesis chagásica, como ser: la inducción de lesiones semejantes a las producidas por esta enfermedad mediante la inmunización con

fracciones subcelulares (Esteve y col., 1983; Ruiz y col., 1985), la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes chagásicos crónicos con reactividad contra tejido de miocardio, vascular, intersticial y nervioso (Cabeza Meckert y col., 1991; Gea y col., 1993; Kalil y Cunha-Neto, 1996), la transferencia de la enfermedad a través de células inmunes o suero en ausencia de parásitos (Hontebeyre-Joskowicz y col., 1987; Silva-Barbosa y col., 1997) y la presencia de antígenos de reactividad cruzada entre el parásito y el mamífero (Van Voorhis y col., 1993; Levin y col., 1989). Sin embargo, a pesar de estas evidencias falta aun demostrar en forma fehaciente el rol de esta respuesta autoinmune como mediadora del daño tisular (Tarleton y Zhang, 1999).

La persistencia del parásito como causal de la patología es la hipótesis alternativa a la autoinmunitaria. Esta hipótesis postula que la persistencia de *T. cruzi* en los órganos blanco de la enfermedad es suficiente para el desarrollo de la misma no requiriendo de un componente autoinmune, el cuál si existe, también sería gatillado por la presencia del parásito (Tarleton y Zhang, 1999). El planteo surgió a partir de la utilización de técnicas mucho más sensibles, como inmunohistoquímica, reacción de la polimerasa en cadena (PCR) *in situ* o standard, que permitieron la detección del parásito en tejidos con focos inflamatorios a partir de hospederos con infección crónica, correlacionando la presencia de *T. cruzi* con el daño tisular (Ben Younes-Chennoufi y col., 1988; Lane y col., 1997; Tarleton y col., 1997).

La existencia de sustentos para ambas hipótesis sugiere que tanto la presencia del parásito como la respuesta autoinmune generada por el mismo estarían involucradas en la patogenia de la enfermedad de Chagas.

Además de las hipótesis discutidas se han propuesto otros mecanismos para explicar la etiología de la miocardiopatía chagásica crónica, como ser, trastornos en la microcirculación (Morris y col., 1990) y la denervación del sistema nervioso autónomo (Köberle y Alcantara, 1960).

1.8 - Alternativas para erradicar la endemia chagásica

1.8.1 - Eliminación del insecto vector

La enfermedad de Chagas constituye la principal enfermedad tropical de la República Argentina y su prevalencia está directamente relacionada con las condiciones socioeconómicas de la población, los índices de analfabetismo, desnutrición y mortalidad infantil (Pinto Dias y col., 1994). La realidad epidemiológica de Latinoamérica, sumada al desconocimiento de la fisiopatogenia y a la falta de un tratamiento específico eficaz, ha determinado que la mejor terapéutica para luchar contra esta endemia es una buena profilaxis.

Las acciones para controlar la transmisión de la enfermedad de Chagas en Argentina tienen como inicio actividades efectuadas por Cecilio Romaña en Chaco, Carlos A. Soler en La Rioja y Carlos Bravo en Catamarca en la década del 50. A partir de 1962 se organizó el Servicio Nacional de Chagas y el Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén", teniendo como objetivos efectuar el control de la transmisión vectorial e interhumana, respectivamente. Los beneficios de las acciones desarrolladas durante los últimos 40 años de funcionamiento del Programa, se observaron en la modificación de las prevalencias serológicas en varones de 18 años, a ser incorporados para el Servicio Militar, que de un 10.3 % de prevalencia en los años 1965-1969 desciende al 1.6 % en 1994, pudiéndose atribuir esta diferencia a las acciones de control vectorial (Chuit, 1994; Segura y col., 2000).

Con el objeto de producir un control efectivo y duradero de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas se implementó una Estrategia de Participación Comunitaria en la década del 90, que consistió en la detección del triatomino o rastros del mismo, mediante el

uso de sensores de cartón, por parte de la comunidad, la notificación de la presencia de vectores (Wisnivesky-Colli y col., 1988) y el tratamiento de las viviendas con insecticidas de efecto residual en manos de un agente sanitario. Estas acciones fueron acompañadas por la Iniciativa de Salud del Cono Sur (INCOSUR) bajo la coordinación de la Organización Panamericana de la Salud y del Programa de Control de Enfermedades Tropicales, cuyo objetivo fue la interrupción de la transmisión vectorial y transfusional de la enfermedad de Chagas en 6 países del Cono Sur, incluyendo la Argentina (Moncayo, 1994). La aplicación de esta nueva estrategia horizontal participativa mostró mejores resultados que los obtenidos por el programa de control de tipo vertical como ser: la detección de mayor número de casas con vectores, la reducción del número de insectos capturados dentro de las viviendas y una disminución de 5 veces de los costos. Se observó que de una infección inicial de los *T. infestans* por *T. cruzi* del 38 % en las comunidades, luego de tres años en las áreas que trabajó el agente sanitario/comunitario mostraron una infección de los vectores del 0% y las trabajadas por el programa de control de acción vertical fue del 10% (Chuit, 1994). Se logró un descenso del índice de infestación promedio del 17.6% al 1.75% en viviendas luego del ataque químico con insecticidas y de la instalación de un programa de vigilancia que incluye la revisión sistemática de biosensores (OPS, 1999).

1.8.2 - Profilaxis de sangre portadora para transfundir

Para evitar la transmisión del *T. cruzi* a través de una transfusión de sangre es necesario realizar serología para Chagas a todos los donadores con el objeto de detectar los infectados. Luego de la detección la prevención puede llevarse a cabo de dos maneras: 1) descartando la sangre con serología reactiva o 2) esterilizando la misma con drogas que afecten la viabilidad del parásito (Storino, 1994).

Una de las drogas mas utilizadas en la esterilización de la sangre es el violeta de Genciana o cristal violeta. Si bien a las dosis utilizadas estas drogas no producen efectos tóxicos, pueden provocar una coloración azulada fugaz en el paciente (Storino, 1994). Otras sustancias que han demostrado en experimentos *in vitro* ser efectivos como agentes tripanocidas en sangre infectada son: anfotericina B, WR6026 (Chiari y col., 1996) y psoralen más luz ultravioleta A (Gottlieb y col., 1996).

Dado que existen estudios experimentales que demuestran una falta de seguridad en la esterilización parasitaria de sangre contaminada con el *T. cruzi* tratada con violeta de Genciana (Celentano y González Cappa, 1988), se cree que la mejor profilaxis es descartar totalmente para cualquier transfusión la sangre serológicamente reactiva. La escasez de sangre no debe ser una excusa para desconocer y obviar medidas preventivas elementales (Storino, 1994).

1.8.3 - Quimioterapia de pacientes infectados

Las metas del tratamiento específico contra la infección por *T. cruzi* son la eliminación del parásito y la disminución de la probabilidad de desarrollar la infección.

A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de Chagas en 1909, aún no se dispone de una quimioterapia eficaz para todas las formas clínicas de la enfermedad, ya que los medicamentos utilizados en la actualidad son de relativa eficacia y el tratamiento se ve limitado por la toxicidad de los mismos. Desde 1930 se han investigado en forma experimental más de un centenar de compuestos, pero los únicos que superaron la etapa clínica fueron el nifurtimox (Lampit, Bayer), un nitrofurano cuya producción ha sido discontinuada a partir de 1990 y el benznidazol (Radanil, Roche), un nitroimidazol (Boinain y Rassi, 1979). Estos fármacos tripanocidas y antichagásicos son eficaces en la etapa aguda de la infección, ya que producen altos porcentajes de

seroconversión y de eliminación total del parásito (Russomando y col., 1998). Sin embargo, poseen las desventajas de producir una amplia gama de efectos colaterales y presentar diferencias en cuanto a su eficacia terapéutica, pudiendo esto último relacionarse con la susceptibilidad o resistencia de la cepa de *T. cruzi* infectante (Stoppani, 1999).

En nuestro país, luego que la Autoridad de Regulación del Ministerio de Salud aprobó al nifurtimox y al benznidazol como drogas contra *T. cruzi*, se dictó la Norma para su aplicación, la cual recomendaba el tratamiento de los casos agudos de la enfermedad de Chagas (Norma para atención médica del infectado chagásico. Ministerio de Salud y Acción Social, Secretaría de Salud, Buenos Aires, Argentina, 1983). Durante muchos años se cuestionó el beneficio de la medicación antiparasitaria en las etapas indeterminada y crónica de la infección. Sin embargo, los estudios realizados en grupos de pacientes que cursaban por estas fases, mostraron una efectividad superior al 60% (Viotti y col., 1994, Sosa Stani y col., 1998). Debido a la publicación de estos resultados, en 1997 la Norma original fue revisada y fue aprobado un nuevo procedimiento (Resolución Secretaría de programas de Salud/Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación N° 28/99), por medio del cual el tratamiento es recomendado en: a) Toda persona durante la fase aguda de la infección, b) Niños y adolescentes en fase indeterminada, c) adultos en fase indeterminada o con cardiopatía incipiente asintomática de la enfermedad de Chagas, d) accidentes con material contaminado en laboratorios o durante cirugías y e) donantes o receptores chagásicos en transplantes de órganos (Sosa Estani y Segura, 1999).

Para evaluar la respuesta a la quimioterapia específica, se recomienda utilizar la combinación diagnóstica, clínica, inmunoserológica y parasitológica, teniéndose en cuenta para determinar su eficacia, la ausencia del parásito, la disminución significativa de la concentración de

anticuerpos o la negativización de la serología (Sosa Estani y Segura, 1999).

El modo de acción del nifurtimox y el benznidazol no es comprendido totalmente. Los efectos tóxicos del nifutimox se explican a través de su reducción intracelular dando origen al radical nitro anión ($R-NO_2^-$), el cual entra en un ciclo redox generando O_2^- y H_2O_2 . La presencia de radicales libres es letal para el *T. cruzi*, ya que no posee los mecanismos necesarios para su eliminación. Los efectos tóxicos del benznidazol serían debidos a la producción de metabolitos reducidos del grupo nitro, los cuáles se unirían covalentemente a macromoléculas celulares (Morello, 1988). Ambas drogas reducen las concentraciones de glutatión, tripanotiona y glutatiónil espermidina, tres compuestos involucrados en el mantenimiento del equilibrio redox intracelular de tripanosomátidos (Maya y col., 1997).

1.8.3.1 - Diseño racional de drogas en enfermedad de Chagas

Dadas las desventajas mencionadas de las drogas actualmente utilizadas, es de principal importancia el desarrollo de nuevas estrategias quimioterápicas más efectivas y seguras. Lamentablemente la industria farmacéutica no posee incentivo económico para financiar esta necesidad y por lo tanto la gente de los países no desarrollados continúan sin poder resolver este problema sanitario; sin embargo, la investigación básica puede ayudar a su resolución. La identificación de nuevos procesos metabólicos esenciales para la supervivencia del parásito funda las bases para el diseño racional de drogas. Este es un proceso multidisciplinario que consta de la identificación de una molécula blanco, el diseño de un inhibidor específico y por último el estudio farmacológico (Fairlamb, 1996). En los últimos años se han ido describiendo diversas vías metabólicas del parásito que presentan puntos de divergencia con su hospedero mamífero. Estos descubrimientos sumados a los aportes

realizados por el Proyecto Genoma del *T. cruzi*, el conocimiento de la estructura molecular de las proteínas y la bioinformática brindaron la posibilidad de identificar nuevos blancos para medicamentos específicos.

Los azoles son compuestos que interfieren en el metabolismo de los esteroides en el *T. cruzi*, inhibiendo la $\Delta^{24(25)}$ -esterol metil transferasa, una enzima que no está presente en vertebrados. Como consecuencia se altera la membrana del parásito por no formarse ergosterol. Algunos azoles como el econazole y el ketoconazole resultaron parcialmente eficaces como antichagásicos (Stoppani, 1999). Utilizando un bis-triazol como el D08070 en modelo ratón se previene la muerte en un 70-90% de los animales en infecciones agudas y crónicas (Urbina y col., 1996).

La síntesis de nucleótidos es un buen blanco terapéutico, ya que el *T. cruzi* es un organismo incapaz de sintetizar purinas (Hammond y Gutteridge, 1984). Con análogos de purinas y pirimidinas se inhibe la replicación intracelular del parásito *in vitro*; entre ellos, el allopurinol demostró ser efectivo en el tratamiento de pacientes chagásicos que reactivaron la infección luego de un trasplante cardíaco (Almeida y col., 1996).

La obtención de péptidos inhibidores de la cruzipaina, una cisteína proteasa con funciones esenciales para el parásito, constituye un avance significativo para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas. La identificación de pseudopéptidos inhibidores de esta proteasa fue llevada a cabo mediante algoritmos de diseño molecular. Estos inhibidores interrumpen el ciclo intracelular del *T. cruzi* y curan infecciones experimentales agudas en animales de laboratorio, sin observarse lesiones miocárdicas (Engel y col., 1999).

La tripanotona reductasa recibió gran atención como blanco terapéutico potencial dado su rol central en las funciones anti-oxidantes de la tripanotona, un análogo de glutatión presente sólo en tripanosomátidos. Esta enzima cumple funciones equivalentes a la glutatión reductasa de los mamíferos (Ver 3.1 de esta Introducción). La

tripanotiona reductasa de *T. cruzi* fue estudiada detalladamente en cuanto a especificidad de sustratos (Marsh y Bradley, 1997), mecanismo de acción (Borges y col., 1995) y estructura cristalográfica (Bond y col., 1999). Una gran variedad de compuestos inhibidores de esta enzima presentan actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo* (Henderson y col., 1988; O'Sullivan y col., 1997), pero es necesario lograr una inhibición superior al 90% de la enzima para matar al parásito, por lo que deben encontrarse compuestos más selectivos y potentes (Ver 3.3 de esta Introducción). La empresa Glaxo-Wellcome comenzó un proyecto en colaboración con la Universidad de Dundee (Escocia, Reino Unido) para el desarrollo de un rastreo en masa de compuestos químicos ("high throughput screening") con el objeto de encontrar nuevos inhibidores que permitan continuar con el desarrollo de un fármaco anti chagásico (Fairlamb, 1999).

1.8.4 - Una vacuna como prevención de la transmisión y la enfermedad

A lo largo de los años se han realizado intentos para producir una respuesta inmune protectora contra la infección por *T. cruzi* utilizando diversas técnicas que abarcan desde la atenuación de parásitos hasta la nueva tecnología de inmunización génica. En todos los casos sólo se han logrado protecciones parciales, lo que indica la posibilidad de estar bastante lejos de obtener una vacuna esterilizante. Sin embargo, la obtención de una vacuna profiláctica sería de gran valor, ya que una disminución de la carga parasitaria durante la fase aguda puede resultar en una menor transmisión vectorial y en una fase crónica con menores alteraciones (Ruiz y col., 1994). Hasta hace algunos años en la mayoría de los casos se evaluaba la efectividad de un reactivo vacunante sólo en la etapa aguda de la infección, mediante el control de la parasitemia y la mortalidad o sobrevida después del desafío con las formas infectantes del parásito y son pocos los trabajos que tomaron como criterio de

evaluación la protección contra el desarrollo de patología en los modelos crónicos (Basombrío y Besuschio, 1982; Ruiz y col., 1985; Zuniga y col., 1997).

En los primeros estudios sobre inmunización protectiva se utilizaron como inmunógenos parásitos vivos atenuados (Menezes, 1971), muertos con diversos tratamientos físicos o químicos (Kierszenbaum y Budzko, 1975; Hanson y col. 1976), y otros tripanosomátidos (Souza y Roitman, 1971). Sin embargo, la existencia de reacciones cruzadas entre los antígenos del *T. cruzi* y del huésped y las lesiones observadas en los tejidos de los huéspedes infectados sugieren que no sería adecuada la utilización de preparaciones antigénicas complejas como inmunógenos (Texeira y col., 1975; Ruiz y col., 1985). En la década del 70 Segura y colaboradores comenzaron a estudiar el efecto inmunoprotectivo de fracciones subcelulares del parásito obtenidas por presión y descompresión (Segura y col., 1974). La vacunación con una fracción enriquecida en membranas y flagelos, denominada fracción flagelar, utilizando *Bordetella pertussis* como adyuvante produce en ratones una respuesta inmune protectiva con un 90% de sobrevida luego del desafío con formas infectantes del parásito (Segura y col., 1976; Ruiz y col., 1986). Por otro lado, esta misma fracción muestra una reducción de las lesiones en los tejidos de los ratones inmunizados luego del desafío (Ruiz y col., 1985).

La técnica de producción de anticuerpos monoclonales y los avances en los métodos de obtención de las proteínas permitió una mejor identificación, aislamiento y purificación de las proteínas del parásito. Es así que comenzaron a identificarse las proteínas del parásito capaces de generar una respuesta humoral en huéspedes inmunizados o infectados (Grogl y Kuhn, 1985). Son numerosas las proteínas del parásito purificadas y ensayadas en protocolos de inmunoprotección. Algunos ejemplos son: glicoproteínas de superficie (Scott y col., 1984; Scott y col., 1985); antígenos purificados con anticuerpos monoclonales (Ruiz y col.,

1990; Gomes y col., 1995) y proteínas purificadas a través de columnas de afinidad (Plumas-Marty y col., 1993). Los resultados informados son en general una disminución significativa de parasitemia luego del desafío que, no siempre se encuentra acompañada con un aumento en la sobrevivencia. Es importante aclarar que en ninguno de los casos se obtuvo una protección esterilizante. El amplio espectro de resultados obtenidos utilizando diferentes tipos de adyuvantes con el mismo antígeno demuestran la importancia del mismo en la obtención de una respuesta inmunoprotectiva en modelos experimentales (Ruiz, 1983; Scott y col., 1984; Plumas-Marty y col., 1993).

Si bien el uso de antígenos más definidos purificados a partir del parásito es preferible al uso de extractos crudos, tiene como desventaja la difícil obtención de los mismos en las cantidades adecuadas. El advenimiento de la biología molecular y las técnicas de ADN recombinante permitieron clonar, expresar y producir en grandes cantidades los antígenos a estudiar. A fines de los años 80 comienza la identificación de antígenos mediante rastreo de genotecas del parásito con sueros humanos infectados (Ibáñez y col., 1987). Las proteínas más inmunogénicas poseen repeticiones de aminoácidos en su extremo C-terminal (Ibáñez y col., 1988) y se encuentran principalmente en las formas del parásito presentes en el hospedero mamífero (Souto-Padrón y col., 1989). Dichos antígenos se clasifican dentro de una superfamilia denominada Superfamilia de Antígenos de Superficie de Tripomastigotes (Ver 2.5 de esta Introducción (Campetella y col., 1992; Schenkman y col., 1994). Diferentes miembros de esta superfamilia, entre ellos SAPA ("shed acute phase antigen"), el dominio catalítico de la trans-sialidasa (TS) y la región amino de TSA-1 ("trypomastigote surface antigen-1), fueron expresados en sistemas bacterianos o baculovirus y ensayados en experimentos de inmunoprotección en ratones (Wrightsmann y col., 1994; Nasser y col., 1997; Pereira-Chiocola y col., 1999). La inmunización con estos antígenos recombinantes induce buenos títulos de anticuerpos

dirigidos contra la región C-terminal de las proteínas. Sin embargo, la respuesta no es protectora, mientras que los dirigidos hacia la región N-terminal son capaces de producir protección pasiva contra la infección por *T. cruzi* (Chuenkova y Pereira, 1995; Franchin y col., 1997). Los ratones inmunizados sólo con la región C-terminal del antígeno TSA-1 no sobreviven al desafío, mientras que el 70% de los ratones desafiados sobreviven cuando se utiliza como inmunógeno la porción N-terminal de este antígeno (Wrightsmann y col., 1994). Basándose en estos resultados se postula que la región C-terminal de estos antígenos presenta un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que dirige la misma hacia epitopes que no son necesarios para la supervivencia del parásito (Wrightsmann, 1994; Frash, 2000). La respuesta inmunoprotectora del TSA-1 es mediada por células, ya que la transferencia adoptiva de células linfoides productoras de IFN- γ y TNF- α protegen a ratones *naïve* de la muerte por la infección con *T. cruzi* (Wizel y col., 1997). Por otro lado, la inmunización con el antígeno SAPA recombinante es capaz de disminuir la parasitemia y bajar la mortalidad de un 67 a un 25% luego del desafío, siendo esta protección mediada por células y no por anticuerpos (Nasser y col., 1997).

Un mayor conocimiento de la respuesta inmune del huésped y los elementos mediadores de la resistencia al parásito, así como de la patogénesis de la enfermedad llevan a postular que un buen candidato para una vacuna contra la infección por *T. cruzi* debe generar una respuesta tanto humoral como celular de tipo Th1 y Tc1 (Ver 1.6 de esta Introducción). La caracterización de la respuesta inmune protectora está permitiendo una búsqueda racional de los antígenos a ser ensayados en protocolos de vacunación experimental, planteándose el concepto de vacuna inmunomoduladora.

Los avances recientes en la tecnología de vacuna de ADN (también llamada inmunización genética o plasmídica o vacuna de ADN desnudo), hacen de la misma un vehículo atractivo para el desarrollo de una

vacuna contra la infección por *T. cruzi* tanto por razones inmunológicas como económicas. La inmunización se realiza con un ADN plasmídico que codifica el gen de interés, siendo este ADN tomado y expresado por la células del hospedador. La expresión del gen “extraño” es capaz de inducir la respuesta inmune del hospedador. La atracción de esta nueva generación de vacunas reside en su capacidad de inducir tanto una respuesta humoral como celular, sin correr los riesgos asociados a una vacuna a organismos vivos; presentando, además, la ventaja de no requerirse pasos de expresión y purificación del inmunógeno (Donnelly y col., 1997). Por otro lado, el ADN plasmídico actúa como adyuvante, ya que posee propiedades inmunoestimuladoras atribuidas a secuencias de oligonucleótidos de simple cadena conteniendo motivos CpG no metilados (Tokunaga y col., 1984).

El antígeno TSA-1 es uno de los blancos de los linfocitos T citotóxicos CD8+ tanto en la infección experimental como en humanos (Wizel y col., 1997; Wizel y col., 1998a). La identificación de este antígeno como un blanco de la respuesta inmune protectora contra el *T. cruzi* llevó a Wizel y colaboradores a utilizar TSA-1 en protocolos experimentales de inmunización genética. La inoculación plasmídica de TSA-1 induce tanto respuesta humoral como celular, siendo esta última mediada por linfocitos T citotóxicos CD8+. Luego del desafío la sobrevida es del 64% al 89% (Wizel y col., 1998 b). Resultados similares se obtienen mediante la inmunización plasmídica con la porción catalítica de la TS (Costa y col., 1998). Las células CD4+ y CD8+ producidas luego de la inmunización con este antígeno secretan IFN- γ , pero no IL-4 o IL-10 e inhiben la replicación intracelular del *T. cruzi* (Rodrigues y col., 1999). La inmunización plasmídica con otra proteína de la superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes, la proteína reguladora del complemento (CRP), presenta mejores resultados que la inmunización con la CRP recombinante, ya que sólo la vacuna a ADN induce la

producción de anticuerpos líticos y protege contra el desafío (Sepulveda y col., 2000).

La magnitud y la naturaleza de la respuesta inmune puede ser diferencialmente regulada mediante la inmunización genética con diferentes citoquinas. La administración de plásmidos codificando para IL-12 o IFN- γ , incrementan la respuesta de tipo Th1, mientras que la administración de IL-4 aumenta la respuesta Th2 (Chow y col., 1998). La inmunización conjunta de proteínas del flagelo de *T. cruzi* con adenovirus recombinantes conteniendo el gen de IL-12 resulta en una fuerte respuesta inmune celular, 100% de sobrevida y 90% de reducción de la parasitemia (Wrightsmann y Manning, 2000).

Los resultados obtenidos hasta el momento dan gran incentivo para continuar el estudio de esta nueva estrategia para el desarrollo de una vacuna preventiva o terapéutica contra la enfermedad de Chagas. La identificación de péptidos blanco de una respuesta inmune protectora sumada a la tecnología de inmunización plasmídica brinda la posibilidad de desarrollar vacunas conformadas por multiepitopes.

2). *TRYPANOSOMA CRUZI*, AGENTE ETIOLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

2.1 - Ubicación taxonómica y morfología

El *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un parásito protozoario digenético que alterna su ciclo de vida natural entre un huésped vertebrado y otro invertebrado. La ubicación sistemática del parásito es la siguiente:

Reino : *Protista*

Subreino: *Protozoa*

Phylum: *Sarcomastigophora*

Clase: *Zoomastigophora*

Orden: *Kinetoplastida*
Familia: *Trypanosomatidae*
Género: *Trypanosoma*
Subgénero: *Schizotrypanum*
Especie: *cruzi* (Chagas, 1909; Hoare, 1972)

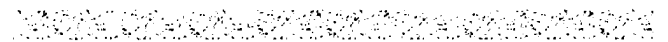
El género *Trypanosoma* se divide en dos secciones: *Salivaria* y *Estercoraria* (Hoare, 1972). El *T. cruzi* pertenece a la segunda y es el único patógeno dentro de esta sección. La principal característica de los organismos clasificados en *Estercoraria* es que son transmitidos por un insecto vector que elimina con sus deyecciones las formas infectantes del parásito

Este parásito se ubica dentro del orden *Kinetoplastida*, cuya característica principal corresponde a la presencia del kinetoplasto, una estructura que concentra una malla de ADN mitocondrial cerca de la base del flagelo, formando parte integral del sistema mitocondrial. El ADN del kinetoplasto (ADNk) corresponde al 30% del ADN total del parásito y está compuesto de una red formada por maxicírculos y minicírculos (Englund y col., 1996).

Como miembro de la familia *Trypanosomatidae*, se caracteriza por la presencia de un flagelo que emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar, un cuerpo paraflagelar y un kinetoplasto único (Cox, 1993).

El flagelo presenta un axonema típico compuesto por 9 pares de microtúbulos periféricos más 2 microtúbulos centrales. El cuerpo paraflagelar es una estructura extra-axonema conformada por filamentos asociados entre sí por puentes proteicos (Farina y col., 1986).

Desde el punto de vista morfológico la superficie celular de los tripanosomátidos está compuesta por tres estructuras: el glicocalix, la bicapa lipídica y los microtúbulos sub-pelicales. Los glicoconjugados se encuentran uniformemente distribuidos sobre la superficie del cuerpo celular y el flagelo. La bicapa lipídica contiene proteínas integrales de



membrana uniformemente distribuidas, excepto en áreas muy especializadas como el bolsillo flagelar y la base del flagelo. Los microtúbulos sub-pelicales localizados debajo de la membrana plasmática constituyen el citoesqueleto de los tripanosomátidos y se encuentran conectados con el retículo endoplásmico (De Souza, 1999).

Existen organelas características de los tripanosomátidos, como ser los reservosomas, los glicosomas y los ácidocalcisomas. Los reservosomas son compartimentos pre-lisosomales localizados en la región posterior del parásito y estarían involucrados en el almacenaje de macromoléculas a ser usadas en la metacicloogénesis (De Souza, 1999). Los glicosomas son organelas que pertenecen al grupo de los peroxisomas y contienen enzimas involucradas en la oxidación de aminoácidos y lípidos (Oppenheimer y Michels, 1991). Los ácidocalcisomas son organelas ácidas que concentran calcio y que pueden observarse al microscopio como vesículas vacías rodeadas por un material electrodensito periférico (Docampo y col., 1995; De Souza, 1999).

2.2 - Estados y ciclo de vida

El *T. cruzi* presenta a lo largo de su ciclo de vida varios estadios fácilmente identificables por microscopía óptica. Estas formas difieren esencialmente en la morfología celular, en la posición del flagelo respecto del núcleo y la región por la cual emerge el flagelo del bolsillo flagelar (González Cappa y Durante de Isola, 1994).

El amastigote es un estadio replicativo intracelular en el hospedador mamífero. Presenta una morfología redondeada, carente de flagelo libre y el kinetoplasto cercano al núcleo con apariencia de una doble capa de fibrillas.

El esferomastigote corresponde al estadio de morfología redondeada y replicativo en el estómago del insecto vector, semejante al amastigote. Presenta un flagelo muy corto que no emerge a la superficie celular.

El epimastigote es un estadio proliferativo de morfología alargada (20-40 μm) presente en el insecto vector. El flagelo se origina por delante del núcleo y arrastra la membrana plasmática dando la imagen de una corta membrana ondulante que emerge desde la región lateral anterior del parásito. El kinetoplasto se ubica anterior al núcleo, siendo este último redondeado.

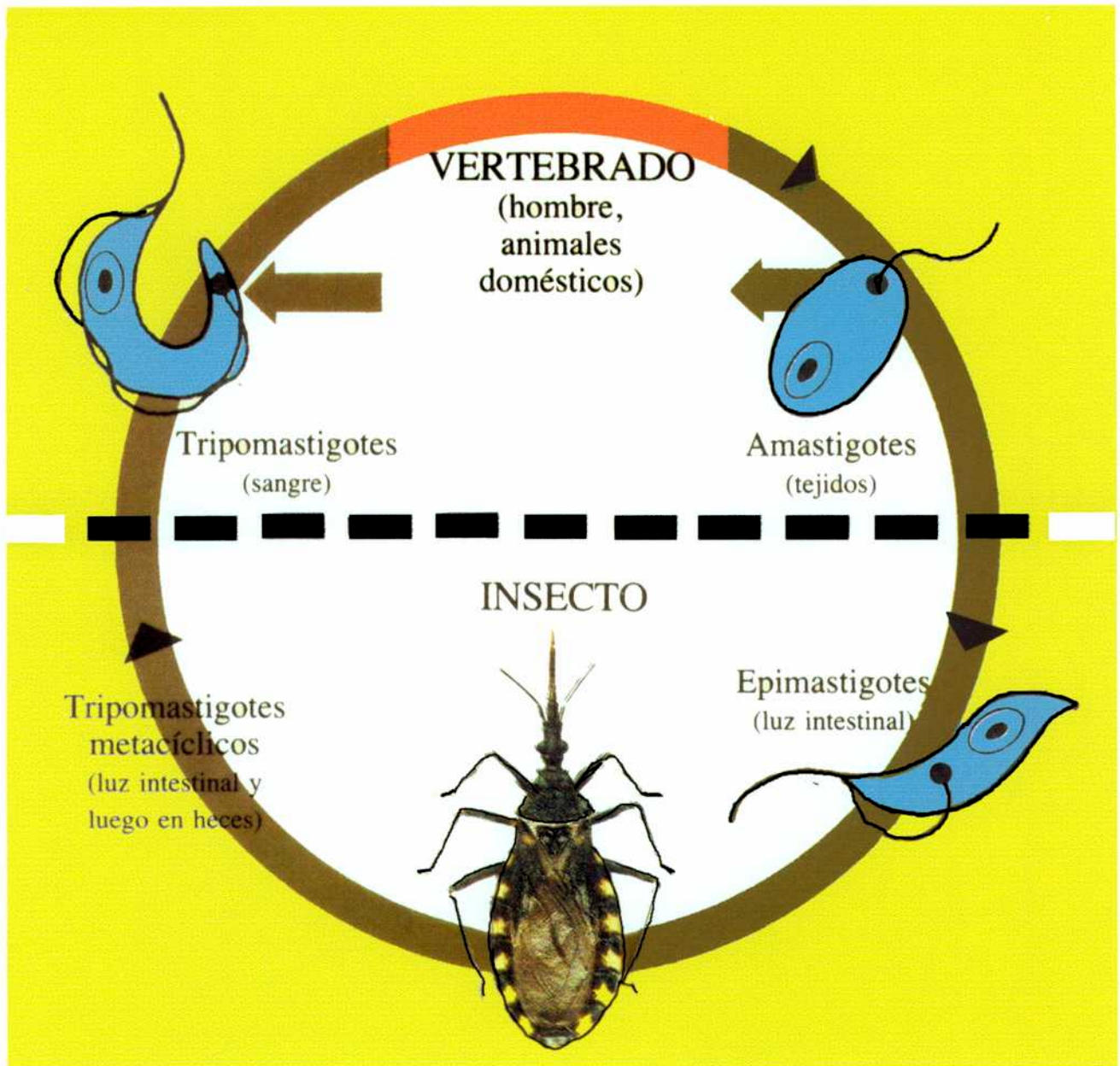
El tripomastigote es un estadio no replicativo de forma alargada presente en la ampolla rectal del insecto (tripomastigote metacíclico) y en la sangre del mamífero (tripomastigote sanguíneo). El kinetoplasto se ubica detrás del núcleo, en tanto que el flagelo, cuyo nacimiento es próximo a esta estructura, corre a lo largo de todo el cuerpo celular en el sentido posteroanterior formando la membrana ondulante del organismo. El núcleo es un poco más alargado que en los otros estadios y de localización central.

El *T. cruzi* desarrolla su ciclo de vida entre un vertebrado mamífero y un invertebrado insecto hematófago de la familia *Reduviidae*. Además del humano, el parásito fue detectado en diversos hospederos mamíferos, entre ellos roedores, perros, cerdos y gatos. Aves y anfibios no han demostrado ser susceptibles a la infección (Pereira Barreto, 1985).

Los insectos parasitados luego de alimentarse sobre el mamífero depositan con sus deyecciones las formas infectantes del parásito (tripomastigotes metacíclicos) que penetran a través de las escoriaciones de la piel facilitado por el rascado involuntario. Luego de atravesada esta barrera, los tripomastigotes metacíclicos penetran en las células fagocíticas locales donde se diferencian en amastigotes y se duplican por división binaria. Después de varias duplicaciones los amastigotes se diferencian en tripomastigotes los que previa ruptura de la célula hospedadora son liberados a la circulación (tripomastigotes sanguíneos). De esta forma el parásito circulante invade nuevas células repitiendo el ciclo. El ciclo se continúa cuando el vector succiona sangre de un mamífero parasitado, los parásitos se diferencian en su tubo digestivo en

esferomastigotes y parte de ellos en epimastigotes, los cuales luego de una activa división alcanzan la ampolla rectal donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. El insecto infectado elimina con las heces el parásito que ingresa en otro mamífero reiniciando el ciclo (González Cappa y Durante de Isola, 1994) (Ver Figura Ciclo de vida de *T. cruzi* pagina 32).

Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*



2.3 - Características particulares de la biología molecular de *T. cruzi*

La información genética del *T. cruzi* se encuentra organizada en dos estructuras principales: los cromosomas y el ADN del kinetoplasto, compuesto por maxicírculos y minicírculos. En varios protozoos, incluyendo el *T. cruzi*, la cromatina no se condensa durante la mitosis, por lo que los cromosomas no pueden observarse al microscopio como entes separados (Hecker y col., 1994). Este hecho ha dificultado enormemente el estudio de los cromosomas en este parásito, hasta que con la aparición de la electroforesis en campo pulsado (PFGE, “pulsed field gel electrophoresis”) (Schwartz y Cantor, 1994) esta problemática fue superada, ya que fue posible lograr una separación de cromosomas intactos en geles de agarosa (Gibson y Miles, 1986).

El estudio de la expresión de genes en kinetoplástidos reveló novedosos procesos post-transcripcionales que en un principio no habían sido observados en otros organismos, como el “*trans*-splicing” y la edición de ARN (“RNA editing”).

La producción de ARNm maduros en tripanosomas es un proceso que difiere bastante con la mayoría de los eucariotas. Los genes que codifican para proteínas se encuentran compactados en zonas del genoma organizados como unidades transcripcionales policistrónicas en lugar de monocistrónicas, lo cual explica porqué hasta el momento se describieron muy pocos promotores. Sin embargo, los genes pertenecientes a un mismo transcripto pueden mostrar una marcada diferencia en la expresión (Gibson y col., 1988; Bringaud y Baltz, 1993), hecho que demuestra que en los tripanosomátidos el control de la expresión génica opera primariamente a nivel post-transcripcional (Vanhamme y Pays, 1995).

Los transcriptos policistrónicos o primarios son procesados para formar los ARNm mediante dos procesos acoplados: “*trans*-splicing” y poliadenilación. Mediante el “*trans*-splicing” se adiciona un ARN de 39

bases (miniexón) al extremo 5' del ARNm. Este proceso utiliza una maquinaria muy similar a la de "cis-splicing" empleada por otros eucariotas (Agabian, 1990; Bruzik y Steitz, 1990). La poliadenilación puede ocurrir en varios lugares, lo que origina ARNm con regiones no traducidas de distintos tamaños, hecho que demostró ser importante en la regulación de la expresión génica (Vanhamme y Pays, 1995). Los dos eventos están acoplados a través de la interacción de la maquinaria con una región rica en pirimidinas (poliPy) presente en las zonas intergencias del transcripto primario. El clivaje de este transcripto es seguido por el "trans-splicing" hacia la región 3' y la poliadenilación hacia la región 5' de la zona de poliPy (Huang y Ploeg, 1991; Matthews y col., 1994).

Durante casi una década se pensó que el "trans-splicing" era la única forma de "splicing" existente en los trypanosomátidos, ya que hasta el momento no se habían encontrado intrones en estos organismos. Sin embargo, recientemente se describió el proceso de "cis-splicing" en *T. cruzi* y *T. brucei* para el gen de la polyA polimerasa (Mair y col., 2000).

En protozoos kinetoplástidos existe una forma particular del procesamiento del ARN. Varios genes para proteínas mitocondriales están codificados en los maxicírculos del kinetoplasto, pero muchos de estos genes están incompletos. La generación de ARNm funcionales involucra la adición o delección post-transcripcional de uridinas (U) mediante un proceso conocido como edición del ARN o "RNA editing". Este proceso es mediado por pequeños RNAs denominados RNAs guías (RNAg) codificados en los maxi y en los minicírculos (Stuart, 1991).

2.4 - Proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi*

En 1994 el Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud (TDR/WHO) lanzó la iniciativa de analizar los genomas de varios parásitos, entre ellos *T. cruzi*. Los objetivos planteados fueron: i) mejorar

el conocimiento de la biología molecular del parásito, ii) identificar nuevos genes y sus productos, lo cual podría ser muy útil en el diseño de nuevas drogas, el desarrollo de una vacuna o el mejoramiento del diagnóstico, y iii) compartir material y experiencia entre los laboratorios participantes, ofreciendo, además, información accesible a los investigadores involucrados en este campo (Zingales y col., 1997).

Debido a que *T. cruzi* se caracteriza por una gran heterogeneidad en cuanto a sus propiedades biológicas, como diferencias en su infectividad, tropismo celular, susceptibilidad a drogas, etc., fue necesario seleccionar un clon de referencia para ser utilizado en el Proyecto Genoma. El organismo de referencia elegido fue el clon CL Brener, aislado de la cepa CL proveniente de un *Triatoma infestans*, presentando esta cepa todas las características representativas de *T. cruzi*. El clon CL Brener fue aislado por el Dr. Brener a partir de sangre de un ratón crónicamente infectado por la cepa CL (Zingales y col., 1997).

Las estrategias para cumplir con los objetivos del Proyecto fueron el mapeo físico del genoma del parásito, el análisis del cariotipo, la secuenciación genómica y la secuenciación de genes funcionales.

Para llevar adelante el mapeo físico del genoma se construyeron genotecas del parásito en cósmidos (Hanke y col., 1996; Frohme y col., 1998), en YACs (Cromosomas artificiales de levaduras) y en BACs (cromosomas artificiales de bacterias) (Zingales y col., 1997; Ferrari y col., 1997). Estas genotecas fueron grilladas en filtros de alta densidad e hibridadas con conjuntos de sondas provenientes de las mismas u otras genotecas con el objeto de realizar un mapa físico mediante el ordenamiento contiguo de los clones ("contigs"). Si bien no fue posible el mapeo del genoma total del parásito a partir de la hibridación con conjuntos de clones de la genoteca construida en cósmidos (Búa J., comunicación personal), la construcción e hibridación de sub-genotecas de cromosomas específicos permitió el mapeo del cromosoma III, IV (Hanke y col., 1998), XVI y XVII (Santos y col., 1999).

Se obtuvo una secuencia genómica de 93.4 kb del cromosoma III a partir de tres cósmidos contiguos (Andersson y col., 1998) y mediante secuenciación al azar de fragmentos genómicos (GSS, “genomic sequence survey”) se llegó a secuenciar aproximadamente un 10% del genoma haploide de *T. cruzi* (Agüero y col., 2000).

Los estudios de cariotipo se realizan mediante la hibridación de los cromosomas del parásito separados por electroforesis de campo pulsado (PFGE, “pulsed field gel electrophoresis”) con diversos marcadores (Cano y col., 1995; Henriksson y col., 1995). Hasta el momento se han utilizado un centenar de marcadores que permitieron identificar desde 20 bandas cromosomales (Santos y col., 1997 a) hasta 42 (Henriksson y col., 1995). No se conoce aún el número exacto de cromosomas del parásito, ya que la técnica de separación disponible no puede resolver todas las bandas cromosomales, ni siquiera utilizando diferentes condiciones de corrida electroforética. Se cree que la próxima aplicación de la técnica de PFGE en doble dimensión resolverá cada banda cromosomal.

La secuenciación de genes funcionales es la estrategia del Proyecto Genoma que presenta mayor utilidad, ya que puede resultar en la identificación de nuevos blancos para combatir al *T. cruzi*, tanto desde el punto de vista de quimioterapia como de vacuna y puede proveer información de interés a los diversos grupos de investigación en el área. Dicha estrategia se realiza mediante la secuenciación al azar de genotecas normalizadas de ADNc construidas a partir del estadio epimastigote del parásito (Verdun y col., 1998; Urmenyi y col., 1999). Las secuencias obtenidas se denominan ESTs (“expressed sequence tags”). Hasta el momento se secuenciaron aproximadamente 13000 ESTs, de las cuales el 67% no presenta ninguna similitud con las secuencias registradas en las bases de datos, indicando que podrían ser genes específicos de *T. cruzi* (Brandao y col., 1997; Verdun y col., 1998; Porcel y col., 2000).

En la actualidad el Proyecto Genoma de *T. cruzi* está siendo subsidiado por el “National Institute of Health” (NHI) de Estados Unidos

y se realiza en tres centros, la Universidad de Uppsala (Uppsala, Suecia), “Seattle Biomedical Research Institute” (Seattle, EEUU) y el laboratorio de secuenciación TIGR (Maryland, EEUU). El objetivo es secuenciar el genoma completo del parásito, para lo cual se estima un período de aproximadamente 5 años.

Se calcula que los genes de importancia en el parásito serían de 1500 a 2000. Las actividades post-genómicas, empleando técnicas de avanzada como “microarray” y “knock out” de genes, permitirán caracterizar la funcionalidad y posible utilidad de los mismos en el control de la transmisión de la enfermedad de Chagas.

2.5 - Superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes

La Superfamilia de Antígenos de Superficie de Tripomastigotes, también denominada Superfamilia de las Trans-sialidasas (TS) (Campetella y col., 1992; Cross y Takle, 1993; Schenkman y coll., 1994; Frash, 2000) incluye cientos de antígenos que contienen cuatro copias completas o parciales de un motivo conservado en neuraminidasas bacterianas (SxDxGxTW) y un motivo característico VTVxNVxLYNR, denominado secuencia FLY (Colli y Alves, 1999). Las proteínas que componen esta superfamilia tienen aproximadamente 430 aminoácidos en la región intermedia que presentan una identidad del 30% al 40% y algunas de ellos poseen una región C-terminal compuesta por repeticiones en tandem que pueden variar en número y composición aminoacídica (Ver Figura). La mayoría de sus miembros se encuentran en la superficie de la membrana plasmática de tripomastigotes sanguíneos, tripomastigotes metacíclicos y amastigotes (Souto-Padrón y col., 1989; Santos y col., 1997 b) anclados mediante glicofosfatidil inositol (GPI) (Agusti y col., 1997) pudiendo ser liberados al medio fácilmente por el parásito (Affranchino y col., 1989).

Los genes que codifican para estos antígenos se encuentran en múltiples copias en el genoma (Affranchino y col., 1991), ubicándose algunos de ellos en tandems (Takle y col., 1992) y en diferentes cromosomas (Henriksson y col., 1995; Frasch, 2000).

En base a los porcentajes de identidad y a la presencia de determinadas repeticiones en la porción C-terminal, estos antígenos se clasifican en cuatro grupos o familias (Ver Figura Superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes, página 41):

Grupo 1: Los miembros de este grupo poseen actividad de trans-sialidasa localizada en la región N-terminal de la proteína, a excepción de aquellos que poseen una mutación puntual Tyr342-His (Cremona y col., 1995). En la región C-terminal poseen cantidades variables de repeticiones de 12 aminoácidos (DSSAHGTPSTPV). A este grupo, entre otros, pertenecen SAPA (Affranchino y col., 1989), TCNA (Pereira y col., 1991) y la trans-sialidasa descrita para epimastigotes, la cuál no posee las repeticiones C-terminales (Botelho-Chavez y col., 1993).

Grupo 2: Incluye diversas proteínas de 85 kDa, algunos de sus miembros, como TSA-1, pueden tener repeticiones de 9 aminoácidos (DKKESGDSE) (Fouts y col., 1991).

Grupo 3: Incluye diversas proteínas de aproximadamente 160 kDa, como FL-160 (Van Voorhis y col., 1993), CEA-160 (Jazin y col., 1995) y CRP (Norris y col., 1997).

Grupo 4: Los miembros de ese grupo se caracterizan por tener un número variable de repeticiones de 5 aminoácidos (EPKSA) en su región C-terminal y son denominados antígenos Tc13 (Campetella y col., 1992).

Los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica poseen títulos elevados de anticuerpos dirigidos contra las repeticiones características de Tc13 (Burns y col., 1992), mientras que los sueros de pacientes agudos presentan, además, anticuerpos dirigidos contra SAPA

(Affranchino y col., 1989; Burns y col., 1992). Ambas repeticiones son capaces de aumentar la vida media en sangre de las proteínas que las transportan y por consecuencia estabilizan la actividad de TS en sangre (Buscaglia y col., 1999).

Si bien la superfamilia de antígenos de superficie sigue siendo objeto de diversos estudios, su participación en la invasión celular y en la modulación de la respuesta inmune del hospedador son las funciones hasta ahora descriptas.

T. cruzi no es capaz de sintetizar ácido siálico, por lo tanto lo adquiere a partir de sialoconjugados del hospedador mediante las trans-sialidasas (TS) (Schenkman y col., 1994). Estas enzimas adicionan ácido siálico a moléculas aceptoras de la membrana del parásito denominadas mucinas (Ferguson, 1997). Los epitopes sializados podrían estar involucrados en la adhesión celular y en la invasión. Por otro lado, algunos miembros de esta superfamilia podrían unirse a galactosas terminales, laminina y otros posibles receptores en la célula hospedadora favoreciendo su entrada (Cremona y col., 1999; Giordano y col., 1999).

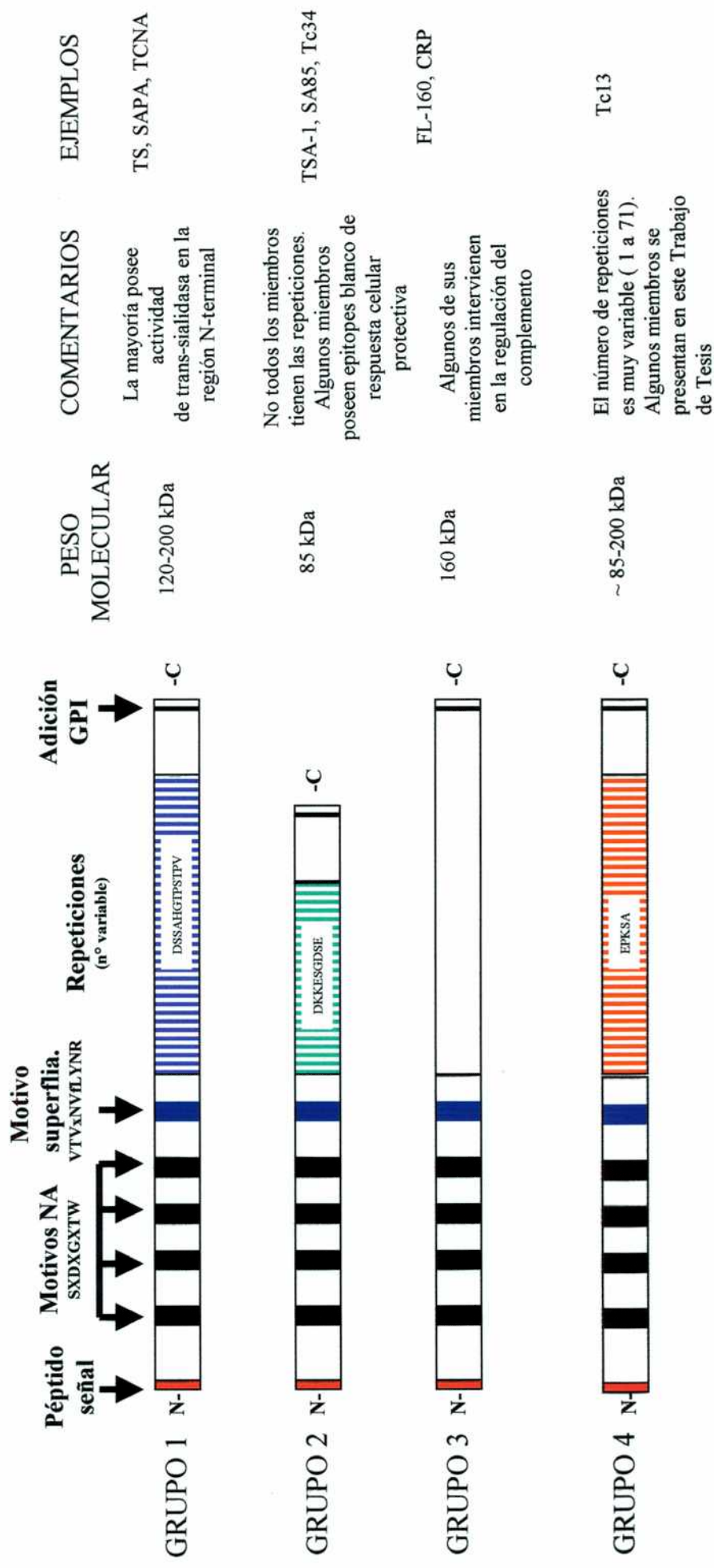
Se han descrito varias acciones inmunomoduladoras llevadas a cabo por los antígenos de esta superfamilia:

a) Las repeticiones de la región C-terminal de las TS son inmunodominantes, esto hace que en los primeros estadios de la infección se desarrolle una respuesta inmune dirigida hacia estos epitopes evitando la formación de anticuerpos contra la región catalítica de la TS y por consecuencia favoreciendo la entrada del parásito a la célula (Frasch, 1994). En una etapa posterior, se comienzan a producir anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS que previenen de una invasión masiva del parásito que podría ser letal para su hospedador (Buscaglia y col., 1998).

b) La CRP ("complement regulatory protein") provee al parásito resistencia al complemento mediante su unión a los componentes C3b y C4b (Norris y Schrimpf, 1994).

c) Algunos miembros de esta superfamilia presentan epitopes que actúan como blanco de una respuesta celular protectora mediada por linfocitos CD8+ y CD4+ secretores de IFN- γ (Wizel y col., 1997; Kahn y Wleklinski, 1997; Miller y Kahn, 2001). La variabilidad existente de los epitopes para células T en estos antígenos y la expresión simultánea de los mismos limita la respuesta celular protectora mediada por IFN- γ (Kahn y Wleklinski, 1997).

Superfamilia de Antígenos de Superficie de Tripomastigotes



3. METABOLISMO DEL GLUTATION EN *T. CRUZI*: UNA VIA DIVERGENTE CON EL HOSPEDERO MAMIFERO

3.1- Funciones de la tripanotiona

En la mayoría de los procariotas y en los eucariotas el glutatión (GSH) es el principal tiol involucrado en procesos redox intracelulares enzimáticos y no enzimáticos. Sin embargo, los tripanosomátidos son los únicos organismos estudiados hasta el momento, a excepción de *Entamoeba histolytica* (Ondarza y col., 1999), que poseen la capacidad de conjugar el tripéptido glutatión (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) y la poliamina espermidina para formar la tripanotiona ($T(SH)_2$, N^1, N^8 -bis(glutathionil)espermidina), siendo éste el tiol principal en esta familia (Fairlamb y Cerami, 1992).

La tripanotiona fue descubierta en el año 1985 cuando al caracterizar una actividad de glutatión reductasa aparentemente atípica en *Trypanosoma brucei*, se observó el requerimiento de un cofactor de bajo peso molecular que contenía un puente disulfuro para que el glutatión oxidado pudiera ser reducido (Fairlamb y Cerami, 1985). La purificación del cofactor y el análisis del mismo determinó que la estructura era N^1, N^8 -bis(glutathionil)espermidina y fue denominada tripanotiona (Fairlamb y col., 1985). A pH fisiológico, el grupo sulfhidrilo de la tripanotiona es más reactivo que el del glutatión debido a que posee un pK_a más bajo (Moutiez col., 1994).

La función principal de la tripanotiona es proveer al parásito un medio intracelular reductor a través de su forma reducida ($T(SH)_2$), cumpliendo funciones equivalentes al glutatión en su hospedero mamífero. La tripanotiona reductasa es una flavoenzima NADPH dependiente encargada de reducir la forma disulfuro de este compuesto,

T(S)₂, sustituyendo a la glutatión reductasa presente en mamíferos (Fairlamb y Cerami, 1992) (Ver Figura).

El *T. cruzi* es deficiente en la mayoría de los sistemas de defensa contra los radicales libres, ya que la cantidad de GSH es 10 veces menor que en la célula de mamífero (Boveris y col., 1980) y no posee catalasa ni glutatión peroxidasa capaz de metabolizar el peróxido de hidrógeno (Boveris y col., 1980; Carnieri y col., 1993). Por lo tanto, la tripanotiona parece ser el único mecanismo para detoxificar los hidroperóxidos. Sin embargo, la cascada enzimática que transfiere los electrones desde la T(SH)₂ hasta los hidroperóxidos es menos eficiente que la glutatión peroxidasa del mamífero (Nogoceke y col., 1997; Gommel y col., 1997), hecho que explicaría la alta sensibilidad de estos parásitos al daño oxidativo.

La presencia del ácido ascórbico (vitamina C), un neutralizante de la acción de los radicales libres, fue reportada en *T. cruzi* (Clark y col., 1994). La tripanotiona es capaz de regenerar en forma no enzimática al ácido ascórbico a partir de su forma oxidada con una reactividad 3 veces mayor que el GSH (Krauth-Siegel y Ludemann, 1996). Hasta el momento no ha sido descrita una dehidroascorbato reductasa en este parásito, lo cual indica que la tripanotiona sería el componente central en el ciclo redox de este compuesto.

Si bien hasta ahora no ha sido fehacientemente probado, no se descarta que la tripanotiona esté involucrada en reacciones de intercambio tiol-disulfuro característica de la activación de algunas enzimas y/o plegamiento de las proteínas (Moutiez y col., 1997)

La tripanotiona está involucrada en la resistencia a metales pesados. El modelo propone la eliminación de los mismos a través de una bomba acoplada a ATP específica para conjugados de arsenito con tripanotiona (Mukhopadhyay y col., 1996).

El flujo de electrones provenientes de la tripanotona activa a la ribonucleótido reductasa de *T. brucei*, definiendo su participación en la síntesis de deoxiribonucleótidos (Ludemann y col., 1998).

3.2- Descripción del ciclo del glutatión

(Ver Figura Metabolismo del Glutatión, página 51)

3.2.1- Síntesis de los precursores de la tripanotona

La proporción de GSH en los tripanosomátidos es del 10 al 30% de los tioles totales (Maya y col., 1997). A pesar que la vía biosintética de este compuesto no ha sido investigada con demasiado detalle, los estudios con inhibidores de las enzimas participantes en el ciclo del γ -glutamil en mamíferos sugieren la presencia de una vía similar en estos organismos (Fairlamb y Cerami, 1992; Lueder y Phillips, 1996).

Las poliaminas juegan un rol fundamental en el crecimiento y diferenciación celular. En tripanosomátidos, una poliamina, la espermidina, es el precursor de la tripanotona. La principal ruta de síntesis de espermidina es a partir de la putrescina, la cual proviene de la decarboxilación de la ornitina por la ornitina decarboxilasa (ODC). Sin embargo, muchas plantas y bacterias poseen vías alternativas que involucran la decarboxilación de la arginina mediante la arginina decarboxilasa (ADC), la cual es convertida en putrescina via agmatina (Smith, 1963; Cunin y col., 1986). Existen evidencias en tripanosomátidos como *T. brucei*, *Leishmania donovani* y *Crithidia fasciculata*, pero no en *T. cruzi*, de la presencia de una ODC activa (Bitonti y col., 1985; Kaur y col., 1986; Hunter y col., 1991). Incluso puede utilizarse un inhibidor de esta enzima, α -difluorometilornitina (DFMO), para curar la enfermedad del sueño causada por *T. brucei gambiense* (Taelman y col., 1987). Sin embargo, el DFMO no ejerce efecto anti parasitario en el *T. cruzi* (Kierszenbaum y col., 1987). Sobre la base de estudios bioquímicos *in*

vivo se postuló tanto la auxotrofia del estadio epimastigote de *T. cruzi* para la síntesis de putrescina (Ariyanayagam y Fairlamb 1997) como la presencia de una vía alterna para su síntesis utilizando ADC en lugar de ODC (Kierszanbaum y col., 1987; Schwarcz de Tarlovsky y col., 1993; Hernández y Schwarcz de Tarlovsky., 1999), ya que no existe un gen activo de esta última en este parásito (Carrillo y col., 1999). Si bien hasta el momento no está del todo claro este paso metabólico no existe ninguna duda que es un punto divergente entre el *T. cruzi* y su hospedero mamífero.

El pasaje de putrescina a espermidina requiere de la decarboxilación de la S-adenosilmetionina por la S-adenosilmetionina decarboxilasa (AdoMetDC). Esta enzima fue recientemente clonada en *T. cruzi* y presenta sólo un 25% de identidad con la enzima de mamíferos (Persson y col., 1998). Un potente inhibidor de la AdoMetDC de mamíferos, MGBG, inhibe pobremente la enzima de *T. cruzi*, lo que sugiere que ambas enzimas son lo suficientemente diferentes como para buscar compuestos que inhiban específicamente al parásito (Persson y col., 1998).

3.2.2 - Síntesis de la tripanotiona

La síntesis de la tripanotiona incluye la conjugación ATP dependiente de una molécula de GSH a cada extremo amino de la espermidina (Fairlamb y col., 1986). Si bien en un principio se pensó que esta conjugación estaba catalizada por una única enzima, la tripanotiona sintetasa (Henderson y col., 1990), posteriormente se identificaron dos enzimas ATP dependientes involucradas en esta síntesis: la glutationilespermidina sintetasa (GSS), que forma tanto N^1 - como N^6 -glutationil espermidina, y la tripanotiona sintetasa (TRS) que cataliza la adición de la segunda molécula de GSH a la glutationilespermidina (Smith y col., 1992).

La glutathionilperoxidasa no es exclusiva de los organismos que poseen tripanotina, ya que se encuentra también en *Escherichia coli* (Tabor y Tabor, 1975), probablemente regulando los niveles de sus precursores, GSH y espermidina.

3.2.3 - Ciclo redox de la tripanotina

La enzima que reduce a la forma oxidada de la tripanotina, T(S)₂, es la tripanotina reductasa (TR). Esta enzima fue purificada por primera vez a partir de *Crithidia fasciculata* en el año 1986 (Shames y col., 1986). Su caracterización y posterior purificación en otros tripanosomátidos revelaron su similitud con la enzima de mamífero glutatión reductasa (GR). Ambas tienen un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y son flavoenzimas homodiméricas NADPH-dependientes que contienen un disulfuro que es reducido y oxidado durante la catálisis (Krauth-Siegel y col., 1987; Shames y col., 1988; Fairlamb y Cerami, 1992). Sin embargo, a pesar de presentar un 41% de identidad aminoacídica, la TR y la GR son muy específicas para sus respectivos sustratos, lo cual es determinado por el ancho y la distribución de cargas en el sitio de unión del mismo (Krauth-Siegel y Schoneck, 1995).

Durante varios años se buscó sin éxito a la tripanotina peroxidasa, la enzima capaz de relacionar el metabolismo de los hidroperóxidos con la tripanotina, como una proteína homóloga a alguna glutatión peroxidasa (Fairlamb y Cerami, 1992). En el año 1997 se identifican dos oxidorreductasas, que trabajando en forma concertada, reducen los hidroperóxidos a expensas de tripanotina, sugiriendo la inexistencia de una tripanotina peroxidasa (Nogoceke y col., 1997). El componente de esta cascada que acepta los electrones de la tripanotina es un ancestro de la familia de las tiorredoxinas llamada triparredoxina (TXN). A su vez, la TXN es el sustrato de una peroxidasa relacionada con las tiorredoxinas peroxidadas (o peroxirredoxinas) denominada triparredoxina peroxidasa

(TXNPx). Por lo tanto, en tripanosomátidos el flujo de equivalentes reductores desde la $T(SH)_2$ hasta los hidroperóxidos está catalizado por dos enzimas, TXN y TXNPx (Nogoceke y col., 1997; Flohé y col., 1999).

3.2.4 - Otras enzimas del ciclo del glutatión en el *T. cruzi*

Además de las enzimas involucradas en la síntesis y en la oxido-reducción de la tripanotiona, se describieron otras actividades enzimáticas en relación a este metabolismo, algunas de ellas no presentes en el hospedero mamífero:

Glutatión-S-transferasa (GST): Es la enzima que conjuga el glutatión con compuestos electrofílicos. La actividad de GST fue descrita en *T. cruzi* (Yawetz y Agosin, 1980; Plumas-Marty y col., 1992) y una enzima heterodimérica fue purificada a partir de extractos de epimastigotes (Yawetz y Agosin, 1981). Sin embargo, hasta el momento no han sido identificados sus genes.

Tripanotiona-S-transferasa: Si bien la tripanotiona es capaz de formar S-conjugados en forma no enzimática (Moutiez y col., 1994) y llegó a reportarse la existencia de una enzima que cataliza esta reacción (Fairlamb y Cerami, 1992) aún no hay evidencias suficientes que avalen la misma.

Tripanotiona-glutatión tiol transferasa (Tc52): Esta enzima pertenece a la familia de las tioredoxinas/glutarredoxinas y establece un enlace entre el metabolismo del glutatión y la tripanotiona, ya que reduce glutatión a expensas de tripanotiona (Moutiez y col., 1995). Posee, además, la capacidad de reducir a expensas de glutatión ácido dehidroascórbico, puentes disulfuros proteicos y puentes disulfuro de compuestos de bajo peso molecular siendo una enzima clave en la regulación del balance redox tiol-disulfuro intracelular (Moutiez y col., 1997).

Glutación peroxidasa: Durante muchos años se dijo que los tripanosomátidos no tenían glutación peroxidasa, sin embargo recientemente se clonó y caracterizó una glutación peroxidasa en *T. cruzi* (Wilkinson y col., 2000). Esta enzima presenta actividad de peroxidasa en presencia de glutación/glutación reductasa y no de tripanotiona/tripanotiona reductasa reduciendo una gran variedad de hidroperóxidos pero no peróxido de hidrógeno (Wilkinson y col., 2000).

3.3 - Enzimas del ciclo del GSH/T(SH)₂ como blancos probables de drogas tripanocidas

Existen amplias evidencias que la sobrevivencia y virulencia del parásito dependen de los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos. Las diferencias existentes en el metabolismo de los tioles entre el *T. cruzi* y el mamífero, junto con el papel que cumplen el GSH y la T(SH)₂ en el mantenimiento del equilibrio redox intracelular, hacen de esta vía un componente importante para el diseño de drogas tripanocidas (Krauth-Siegel y Coombs, 1999).

La selección de un blanco para acción quimioterápica debe considerar varios aspectos, como ser la importancia de su inhibición en la viabilidad del parásito, la identificación de inhibidores específicos y la eficiencia de inhibición requerida para eliminar al patógeno. Teniendo en cuenta estos conceptos, hasta ahora sólo una enzima de este ciclo, la tripanotiona reductasa, fue validada como potencial blanco de drogas (Flohé y col., 1999; Fairlamb, 1999). Si bien se encontraron distintos tipos de inhibidores de esta enzima (Krauth-Siegel y col., 1987; Henderson y col., 1988; Tromelin y col., 1993) y un mayor conocimiento de la estructura de la misma sentará las bases para el diseño racional de drogas, desafortunadamente, se requiere una inhibición de su actividad mayor al 80% para disminuir la virulencia del parásito (Dumas y col., 1997) y sólo

la ablación completa de sus genes afecta la viabilidad del mismo (Krauth-Siegel y Coombs, 1999).

La síntesis de la tripanotona es un paso metabólico más interesante para evaluar, ya que las enzimas son únicas y no presentan homología con ninguna enzima conocida del mamífero. Pero hasta el momento no se expresaron dichas enzimas en forma recombinante ni se obtuvieron datos de su estructura.

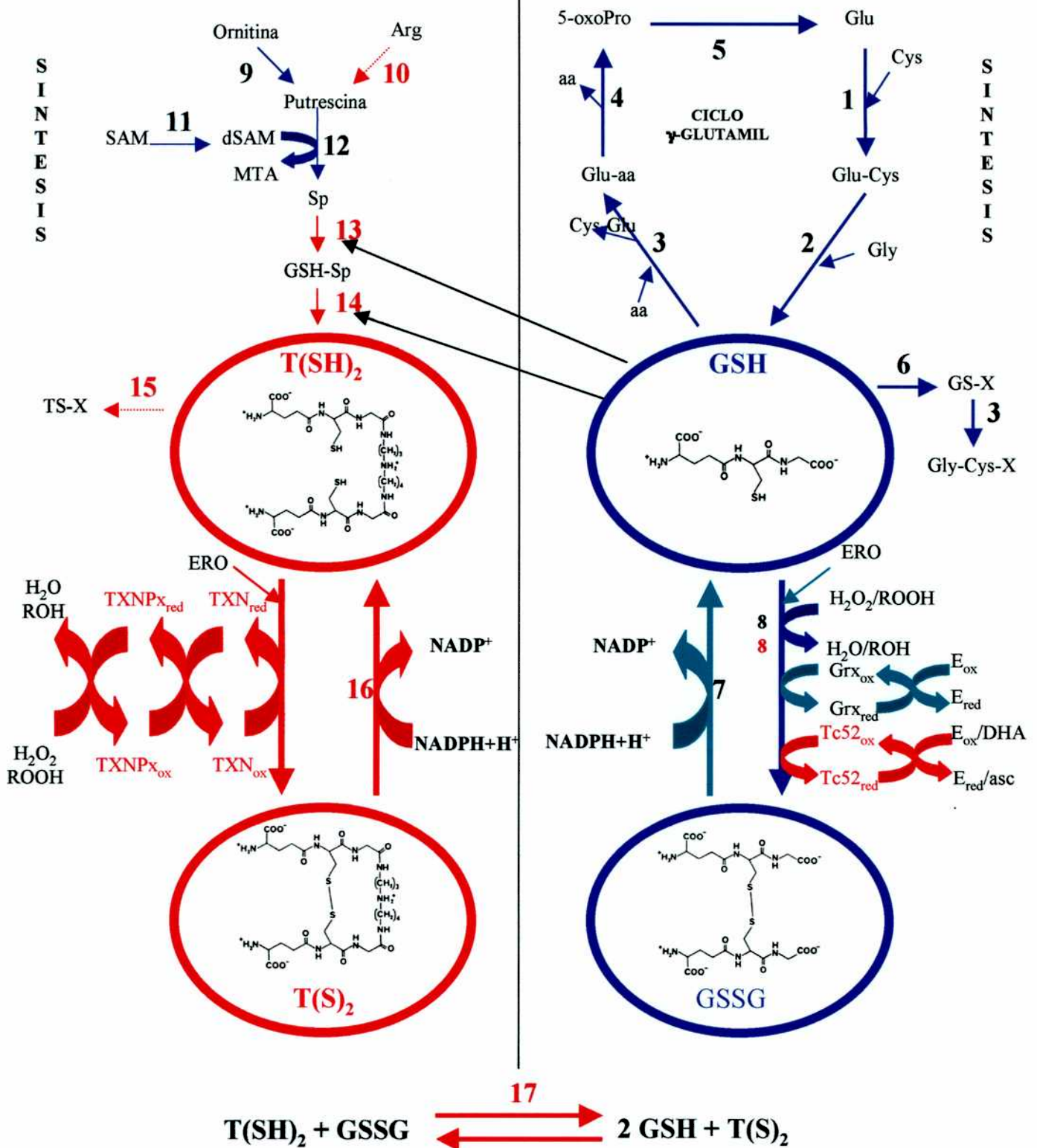
La triparredoxina es un blanco atractivo para el diseño de drogas, ya que interviene en dos procesos que determinan la viabilidad del parásito: la regulación del metabolismo de los peróxidos y la biosíntesis de ADN (Gommel y col., 1997; Ludeman y col., 1998). Las diferencias con las trioxirredoxinas de mamíferos en cuanto a secuencia y especificidad de sustrato justifican la búsqueda de inhibidores específicos de esta enzima. El diseño de inhibidores específicos de la triparredoxina peroxidasa será un desafío aún mayor debido a que en mamíferos existen peroxirredoxinas cercanamente relacionadas con esta enzima (Flohé y col., 1999).

La Tc52 es una enzima muy interesante a evaluar en este aspecto. La delección completa del gen es letal para el *T. cruzi*, mientras que la delección de un solo alelo produce problemas en la diferenciación del estadio epimastigote a tripomastigote metacíclico (Allaoui y col., 1999).

Figura: Metabolismo del glutatión

CICLO DE LA TRIPANOTIONA

CICLO DEL GLUTATION



4) GUTATION-S-TRANSFERASAS Y TIORREDOXINAS / GLUTARREDOXINAS: DOS SUPERFAMILIAS DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DEL GLUTATION

4.1 - Características generales de las glutatión-S-transferasas (GSTs)

Las GSTs son una superfamilia de enzimas multifuncionales que participan en la detoxificación celular y excreción de sustancias fisiológicas y xenobióticas. Catalizan la conjugación del grupo tiol del glutatión reducido con varios compuestos electrófilos, haciéndolos más solubles y facilitando su excreción. Como consecuencia de su rol de detoxificación las GSTs están implicadas en el desarrollo de resistencia de células y organismos a drogas, insecticidas, herbicidas y antibióticos (Pickett y Lu, 1989; Hayes y Pulford, 1995). La expresión de las GSTs está regulada a nivel de la transcripción por xenobióticos y peróxido de hidrógeno. Esta regulación está mediada por elementos que actúan en *cis*, como las secuencias ARE (“antioxidant-responsive element”) y XRE (“xenobiotic responsive element”) localizadas río arriba del gen, que le permiten a la célula responder ante un compuesto tóxico o daño oxidativo (Rushmore y Pickett, 1993).

Las GSTs son homo u heterodímeros con subunidades de aproximadamente 25 kDa de peso molecular. En base a los primeros estudios realizados con GSTs citosólicas humanas, estas enzimas fueron clasificadas de acuerdo a la especificidad de sustrato y a la secuencia aminoacídica en tres clases evolutivas diferentes denominadas Alfa, Mu y Pi (Mannervick y col., 1985). Posteriormente, en algunos casos la clasificación de las GSTs de mamíferos se extendió a otros organismos y en otros, se definieron nuevas clases. La clase Theta se encuentra también en bacterias, levaduras, plantas e insectos y es considerada un ancestro de las clases de mamíferos recién mencionadas (Pemble y Taylor, 1992). La clase Kappa es soluble y mitocondrial (Pemble y col.,

1996). La clase Zeta fue recientemente definida y está presente en una amplia gama de especies (Board y col., 1997). La clase Sigma está bien representada en cefalópodos, la clase Phi en plantas y la clase Delta en insectos (Buetler y Eaton, 1992; Blocki y col., 1993; Toung y col., 1993). En general, existe una identidad aminoacídica del 70% dentro de las clases y menor al 30% entre clases.

El sitio activo de las GSTs consiste de dos zonas: el sitio G, donde se une el GSH, y el sitio H, donde se une el compuesto electrofílico hidrofóbico. Las clases Alfa, Mu, Pi y Sigma poseen una Tyr en la porción N-terminal que forma un puente de hidrógeno con el tiolato del GSH (Dirr y col., 1994), mientras que las clases Theta y Zeta tienen una Ser en esa posición (Board y col., 1995; Board y col., 1997).

Desde el punto de vista inmunogénico, no hay que dejar de mencionar el rol que cumplen las GSTs de trematodes digenéticos como antígenos protectivos (Brophy y Pritchard, 1994). La GST de 28 kDa de *Schistosoma mansoni* es la mejor caracterizada en este aspecto y es el mejor candidato para una vacuna contra la schistosomiasis. La proteína recombinante desencadena inmunidad protectora en varios modelos experimentales, brindando un nivel de protección contra la infección del 40 al 70% y reduciendo la carga de gusanos y la fecundidad (Riveau y col., 1998). Otro antígeno evaluado es la GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum*, sin embargo, esta proteína no provee una protección tan consistente como la de 28 kDa (Mitchell y col., 1988; Wright y col., 1991). Las diferentes GSTs de *Fasciola hepatica* también son candidatas para el desarrollo de una vacuna. La inmunización de ovejas y ganado vacuno con las GSTs nativas protege significativamente de la infección por este parásito (Morrison y col., 1994).

4.2 - Características generales de las tiorredoxinas / glutarredoxinas

Las tiorredoxinas (Trxs) y las glutarredoxinas (Grxs) son proteínas pequeñas (9 a 12 kDa) que poseen dos grupos sulfhidrilos en su sitio activo, con el motivo Cys-X-X-Cys, que intervienen en la transferencia de electrones mediante su oxidación y reducción durante la catálisis. Ambas familias pueden transferir electrones desde el NADPH hacia la ribonucleótido reductasa, una enzima esencial para la síntesis de ADN que debe reducirse para estar activa. La Trx oxidada es reducida a expensas del NADPH por la flavoenzima tiorredoxina reductasa; mientras que la Grx es reducida a expensas del GSH, el cual es reciclado a su forma reducida por el NADPH y la flavoenzima glutatión reductasa (Holmgren, 1989) (Ver Figura: Metabolismo del glutatión página 50).

Las Trxs son en general disulfuro-reductasas que cumplen un rol regulatorio catalizando la reducción NADPH dependiente de puentes disulfuro en diversas proteínas, no sólo de la ribonucleótido reductasa. Por ejemplo, en plantas, las Trxs están involucradas en la activación mediada por la luz de algunas enzimas fotosintéticas del cloroplasto (Muller y Buchanan, 1989).

Por otro lado, existen evidencias que las Trxs ocupan un lugar central en el control de la proliferación y división celular. Algunos genes que codifican para Trx son inducibles por daño oxidativo y su producto es secretado de la célula, ejerciendo su acción tanto a nivel intracelular como extracelular (Nakamura y col., 1997). Dentro de la célula las Trxs inducidas protegen contra las especies reactivas del oxígeno, intervienen en transducción de señales, por ejemplo catalizando la activación del receptor de glucocorticoides (Grippo y col., 1985) y regulan la unión al ADN de algunos factores de transcripción, como el NF- κ B (Matthews y col., 1992). A nivel extracelular, actúan como un factor de crecimiento estimulando el crecimiento tumoral e inhibiendo la apoptosis (Buchanan y col., 1994; Powis y col., 1998).

Las Grxs (también denominadas transhidrogenasas o tioltransferasas) poseen actividad de GSH-disulfuro óxido reductasas. Además de reducir puentes disulfuros proteicos, las Grx pueden reducir disulfuros del GSH con compuestos de bajo peso molecular, hecho que las diferencian de las Trxs (Holmgren y Aslund, 1995). Las Grxs se encuentran en diversos organismos como *Escherichia coli* (Holmgren, 1979 a y b), levaduras, plantas, mamíferos e incluso es codificada por algunos virus (Eklund y col., 1984). A pesar que se conoce muy poco acerca de su rol fisiológico, además de su participación en la reducción de la ribonucleótido reductasa, se conoce su participación en la reducción del sulfato (Russel y col., 1990) y en la regeneración del ácido ascórbico citoplasmático (Wells y col., 1990).

4.3 - Tiorredoxinas y glutarredoxinas en tripanosomátidos

La triparredoxina (TXN) puede ser clasificada como una tiorredoxina ancestral, ya que no presenta las características de una Trx típica. Las enzimas clonadas en *C. fasciculata* (dos isoformas) (Montemartini y col., 1998; Guerrero y col., 1999) y *T. brucei* (Ludemann y col., 1998) tienen un peso molecular de 16 kDa, un 50% mayor que las Trx de mamífero, y poseen un sitio activo con el motivo WCPPCR en lugar de WCGPCK. La TXN presenta muy baja homología con las Trx típicas y la misma está circunscripta a la región del sitio activo (Flohe y col., 1999). La TXN fue en principio descrita como una tripanotiona-peroxirredoxina óxido reductasa, ya que transfiere electrones desde la tripanotiona hasta la tryparredoxina peroxidasa (Nogoceke y col., 1997). Posteriormente, se determinó que el par $T(SH)_2/TNX$ reduce a la ribonucleótido reductasa de *T. brucei* (Ludemann y col., 1998). La caracterización bioquímica de la TXN de *T. brucei* llevó a postular la clasificación de esta enzima en una nueva clase diferente a tiorredoxinas o glutarredoxinas (Ludemann y col., 1998).

La tripanotiona-glutación tiol transferasa (Tc52) es una proteína descrita en *T. cruzi* de 52 kDa que consta de dos dominios homólogos y posee homología significativa con GSTs y proteínas inducibles por calor (Schoneck y col., 1994). La Tc52 fue clasificada como una tiol-disulfuro óxido reductasa y en su secuencia N-terminal contiene el motivo CPFC característico. Es la enzima que reduce glutación a expensas de tripanotiona (Moutiez y col., 1995) pero a su vez presenta características enzimáticas de una Grx, como la capacidad de reducir disulfuros de bajo peso molecular y el ácido dehidroascórbico (Moutiez y col., 1997).

Además de intervenir en el metabolismo de los tioles, la Tc52 modula la producción de citoquinas y la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible en los macrófagos (Fernández-Gómez y col., 1998). Esta enzima también está involucrada en la metaciclo génesis del *T. cruzi* (Allaoui y col., 1999). La multifuncionalidad de la Tc52 es otra característica en común con miembros de la superfamilia Trx/Grx.

4.4 - Glutation-S-transferasas con características de glutarredoxinas

Las GSTs y las Grxs tienen la característica en común de utilizar GSH como sustrato y por lo tanto ambas familias poseen un sitio de unión específico para este compuesto. Sin embargo, las GSTs catalizan una reacción de conjugación del GSH, mientras que las Grx son óxido reductasas que oxidan GSH, interviniendo en el flujo de electrones el puente disulfuro activo del motivo CXXC de la región N-terminal (Holmgren y Aslund, 1995).

La caracterización de estructuras cristalográficas de algunas GSTs con el GSH demostró que existen GSTs que poseen una Cys en el sitio de unión al GSH, en lugar de la Tyr o Ser típica, que forma un puente disulfuro con el GSH, sugiriendo que en estos casos la enzima podría intervenir en una reacción redox en lugar de conjugación. En base a estas

observaciones se definieron dos nuevas clases, Beta y Omega (Rossjohn y col., 1998; Board y col., 2000).

La clase Beta está compuesta por GSTs bacterianas. Este grupo de enzimas presenta muy baja homología con GSTs de mamíferos, hecho por el cual algunas de ellas habían sido clasificadas en la clase Theta. Estas GSTs poseen propiedades cinéticas e inmunológicas muy distintas a las enzimas típicas y tienen muy poca actividad con los sustratos convencionales (Mignogna y col., 1993). Además, estas enzimas poseen otras actividades enzimáticas como diclorometano dehalogenasa (La Roche y Leisinger, 1990), tetraclorohidroquinona dehalogenasa (McCarthy y col., 1996) y β -eterasa (Masai y col., 1993).

La clase Omega existe en varias especies de mamíferos y en *Caenorhabditis elegans*. La GST Omega 1-1 humana recombinante funciona como tiol transferasa y dehidroascorbato reductasa, ambas actividades características de las Grxs (Board y col., 2000).

En base a estas nuevas observaciones se postula que la clase Theta de las GSTs evolucionó a partir de un miembro ancestral de la superfamilia Trx/Grx (Rossjohn y col., 1998).

4.5 - Estructura tridimensional

Si bien no existen altas identidades entre la estructura primaria de las GSTs, las Trxs y las Grxs; el dominio amino terminal de las GSTs y las Grxs y Trxs en su totalidad, tienen una estructura tridimensional común denominada “plegamiento tioredoxina” (“thioredoxin fold”). Esta forma básica de plegamiento está compuesto por 4 hojas plegadas β en un mismo plano y 3 hélices α , 2 de ellas ($\alpha 1$ y $\alpha 3$) a un lado del plano generado por las hojas β y 1 del otro ($\alpha 2$). El esquema del plegamiento se compone de un motivo N-terminal $\beta 1 \alpha 1 \beta 2$ unido por $\alpha 2$ a un motivo C-terminal $\beta 3 \beta 4 \alpha 3$ (Martin, 1995).

El plegamiento Trx comprende aproximadamente 80 aminoácidos, pero las diferentes proteínas pueden tener residuos adicionales a esta forma básica. Las Grx que fueron cristalizadas no presentan ninguna estructura adicional, mientras que las Trxs poseen una hoja plegada β y una α hélice extra en su extremo N-terminal. En el caso de las GSTs existe un dominio helicoidal C-terminal conectado al plegamiento Trx (Martin, 1995).

TRABAJO DE TESIS

OBJETIVO GENERAL:

Las drogas actualmente utilizadas para el tratamiento de la infección por *T. cruzi* presentan múltiples efectos colaterales y una eficacia muy variable en las etapas indeterminada y crónica de la infección. Por otro lado, no existe hasta el momento una vacuna que impida la transmisión y la enfermedad de esta parasitosis.

Teniendo en cuenta la necesidad de la obtención tanto de buenos inmunógenos como de blancos para el diseño de nuevas drogas tripanocidas más efectivas y seguras, el objetivo general de este Trabajo de Tesis fue:

"Definir nuevos posibles blancos para el control de la transmisión de la Infección por *T. cruzi* a partir de la identificación de proteínas en este parásito relacionadas con glutatión-S-transferasas (GSTs) de otros organismos"

La selección de las GSTs para dirigir esta búsqueda se debió a: 1) que sus genes aún no han sido identificados en *T. cruzi* aunque su actividad está presente en este parásito (Yawetz y Agosin, 1980; Yawetz y Agosin, 1981), 2) la inmunización con fracciones de *T. cruzi* con actividad de GST presenta efectos protectivos contra la infección experimental (Plumas - Marty y col., 1993) y 3) la participación de esta enzima en el ciclo del glutatión, un metabolismo divergente entre el *T. cruzi* y su hospedero mamífero, en el cuál la identificación de nuevos componentes posibilitaría la definición de probables blancos de acción quimioterápica (Fairlamb y Cerami, 1992; Fairlamb, 1999).

PARTE A

PARTE A: Identificación y caracterización molecular del gen *TcGRX* que codifica para una probable glutarredoxina de *Trypanosoma cruzi* con homología con glutatión-S-transferasas

A.1 - BREVE INTRODUCCION:

La actividad de glutatión-S-transferasa (GST), una enzima del metabolismo del glutatión (GSH) que participa en la detoxificación, está presente en *T. cruzi*. En la década del 80 se purificó una GST heterodimérica con características diferentes a las GSTs de mamíferos y probablemente relacionada con la resistencia a agentes tripanocidas (Yawetz y Agosin, 1981). Sin embargo, hasta el momento sus genes no han sido identificados.

Teniendo en cuenta que el metabolismo del GSH es divergente en *T. cruzi* y su hospedero mamífero, la identificación en el parásito de nuevas enzimas involucradas en este ciclo puede brindar nuevos posibles blancos para el desarrollo de drogas tripanocidas.

A.2 – OBJETIVOS PARTICULARES PROPUESTOS PARA ESTA SECCION:

- Seleccionar secuencias de genes funcionales (ADNc o ESTs) resultantes del Proyecto Genoma de *T. cruzi* que presenten homologías con GSTs, a fin de identificar nuevos componentes del metabolismo del GSH que puedan ser propuestos como posibles blancos de quimioterapia.
- Realizar la caracterización molecular de los genes seleccionados.
- Analizar las secuencias de los productos codificados por los genes identificados.

- Expresar las proteínas recombinantes.

A.3 - RESULTADOS Y DISCUSION:

- Identificación de un nuevo gen del *T. cruzi* homólogo con GSTs:

Como resultado de la búsqueda en el banco de datos de ESTs, se seleccionaron dos clones provenientes del Proyecto Genoma de *T. cruzi*, 19h22 (n° acceso en GenBank™: AJ046207) y 44h9 (n° acceso en GenBank™: AW33037), con homología con una probable GST del nematode *Caenorhabditis elegans* (emb/CAA94368.1).

La secuencia de ambos clones demostró que el clon 19h22 poseía 232 bases adicionales hacia el extremo 5' en comparación con el clon 44h9. El largo total del clon 19h22 fue 972 pb, presentó una región codificante de 843 pb incompleta en su extremo 5' y una zona 3' no traducida de 108 pb precediendo a la cola de poliadenina (poliA) (Fig. A-1).

Para obtener la secuencia del gen completo, el clon 19h22 fue utilizado como sonda en un rastreo de una genoteca de *T. cruzi* construida en cósmidos (gentilmente cedida por el Dr. Hoheisel, Heidelberg, Alemania). Se obtuvieron 25 clones positivos y uno de ellos fue seleccionado al azar, el 35i22, para su secuenciación. La secuencia genómica con oligonucleótidos específicos mostró un marco abierto de lectura de 936 pb, una zona de poliPy a partir de la posición -19 del codón de iniciación, con un posible sitio de adición del miniexón en la posición -16. En la zona 3' no traducida también presentó una zona de polipirimidina (poliPy) relacionada con la adición de la cola de poliA 110 bases después del codón de terminación (Matthews y col., 1994) (Fig. A-1).

- Este nuevo gen codifica para una probable Grx homóloga a GSTs de diversos organismos:

El gen identificado codifica para una proteína de 312 aminoácidos con un peso molecular estimado de 35.17 kDa y un pI de 8.99. La secuencia proteica presentó el patrón completo de glutarredoxinas (Grxs), L-Y-X₍₄₎-C-P-F-C-X₍₂₎-A-X₍₂₎-L, entre la posición 73 y la 88, siendo CPFC el sitio activo probable (Holmgren, 1989) (Fig. A-1). Dada la probabilidad que dicha proteína sea una nueva Grx del *T. cruzi*, fue denominada TcGRX.

La comparación de la secuencia aminoacídica de TcGRX en los bancos de datos utilizando los programas BLASTP y PSI-BLAST demostró su homología tanto con miembros de la familia de Grxs como de la de GSTs. La Figura A-2 muestra el alineamiento de la TcGRX con algunas Grxs y GSTs ya caracterizadas en cuanto a su actividad enzimática. La GST de *C. elegans* con la cual presenta su mayor homología no se muestra en la figura ya que esta secuencia surgió como resultado del Proyecto Genoma de este organismo, no habiéndose confirmado aún su funcionalidad (Wilson y col., 1994).

La proteína con mayor identidad que se muestra en la Figura A-2 es la proteína Su(P) de *Drosophila melanogaster*, la cual presenta un 26.3 % de identidad con la TcGRX a lo largo de toda su secuencia. Esta proteína fue propuesta como posible transportador de electrones y probablemente se une a una proteína denominada ref(2)P (Dezelee y col., 1989), homóloga a proteínas inducibles por xenobióticos o daño oxidativo al igual que las GSTs (Rushmore y col., 1991) (Dr. D. Contamine, Universidad de Versailles-St. Quentin, Versailles, Francia, comunicación personal).

La secuencia proteica de TcGRX presenta similitud con miembros muy bien caracterizados de la familia Grx, como la Grx2 y 3 de *Escherichia coli* y la Trx del fago T4 la cual también funciona como una Grx (Holmgren, 1978). De todas ellas, mostró mayor identidad con la Grx2 de *E. coli* con un 23.7 % en la región central que abarca desde el residuo 171 hasta el residuo K153, elevándose a 33.7% si se consideran los cambios conservativos de aminoácidos (Fig. A-2). La Grx2 de *E. coli* es una Grx atípica, ya que presenta un peso molecular de 27 kDa, mucho mayor que las Grx convencionales y sólo presenta similitud con las Grx 1 y 3 de *E. coli* en la región del sitio activo (Aslund y col., 1994; Vlamis-Gardikas y col., 1997).

La TcGRX mostró también similitud con miembros de las clases más ancestrales de GSTs como ser Sigma, Theta, Phi y Zeta. En la Figura A-2 se muestra el alineamiento con la GST inducible por auxinas de *Arabidopsis thaliana* (Van der Kop y col., 1996) y con la GST de subclase Sigma de *Ascaris suum* (Liebau y col., 1997), con las cuales presenta un 12.8 y un 9.6 % de identidad, respectivamente.

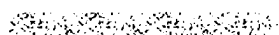
- El modelado molecular de una porción de la TcGRX sugiere una estructura tridimensional típica de la familia Trx/Grx:

La comparación de la secuencia aminoacídica de TcGRX en el banco de estructuras tridimensionales utilizando los programas SAS Fasta y Swiss Model resultó en dos posibles templados para modelar una porción de esta proteína: la Grx3 de *E. coli* (3GRX) (Nordstrand y col., 1998) y la Trx del fago T4 (Söderberg y col., 1978), respectivamente. Ambas poseen la estructura característica de la familia Trx/Grx conteniendo cuatro hojas plegadas β paralelas y tres α hélices a los lados (Martin, 1995).

La TcGRX se alinea con la Grx3 de *E. coli* desde el residuo P69 hasta el residuo K144 con un 23.1 % de identidad y con la Trx del fago T4 desde el residuo K66 hasta el residuo V157 con un 20.6 % de identidad (Fig. A-2). Los modelos tridimensionales de la TcGRX construidos sobre ambos templados resultaron muy similares, por lo tanto sólo se muestra el modelado molecular sobre la Grx3 de *E. coli*. El alineamiento primario entre ambas secuencias que se muestra en las Figuras A-2 y A-3 está modificado manualmente con el fin de conservar la estructura secundaria. De esta forma se incrementó la similitud entre la TcGRX y la Grx3 de un 47.5 % a un 51 %. El modelo tridimensional de la TcGRX mostró la estructura típica Trx/Grx en una extensión de 82 aminoácidos cercana al extremo N-terminal. Presentó una estructura $\alpha\beta\alpha$ "sandwich" de tres capas conformada por los motivos $\beta 1\alpha 1\beta 2$ y $\beta 3\beta 4\alpha 3$ conectados mediante la hélice $\alpha 2$, conteniendo una hélice adicional $\alpha 4$. Las hojas $\beta 1$ y $\beta 2$ resultaron paralelas, mientras que $\beta 3$ y $\beta 4$ antiparalelas; $\alpha 1$ y $\alpha 3$ se orientaron de un lado del plano de las hojas β y $\alpha 2$ del otro lado del plano (Fig. A-3).

- El gen *TcGRX* estaría presente en una única copia por genoma haploide del parásito:

El ADN de *T. cruzi* digerido por diferentes enzimas y transferido a membranas de nylon fue hibridado con el clon 19h22 radiomarcado. La sonda reconoció el ADN del clon CL Brener y de la cepa Tulahuén del parásito (Fig. A-4 a y b). Las hibridaciones del ADN de *T. cruzi* cortado con enzimas que digieren fuera de la región codificante, como ser EcoRI, SacI y PstI dieron como resultado un único fragmento marcado, inclusive cuando el ADN se cortó durante distintos tiempos (Fig. A-4 a y b). El corte del ADN con la enzima BamHI, que posee un sitio en la



mitad del gen *TcGRX* dio como resultado la hibridación de dos fragmentos (Fig. A-4 a). Estos resultados sugieren que el gen *TcGRX* estaría presente en copia única por genoma haploide. Estos resultados fueron confirmados en experimentos de “dot blot” hibridando cantidades crecientes de ADN del parásito con cantidades fijas del clon 19h22 (resultado no mostrado). La detección de 25 clones de la genoteca de *T. cruzi* construida en cósmidos con el ADNc 19h22 avala la posibilidad que este gen se encuentre en copia única dado que dicha genoteca presenta 25 copias del genoma del parásito (Hanke y col., 1996).

La hibridación de cromosomas del clon CL Brener de *T. cruzi* separados por electroforesis en campo pulsado y transferidos a membranas de nylon determinó que el gen *TcGRX* se encuentra en dos cromosomas posiblemente homólogos de 680 y 775 kpb (Fig. A-4 c).

- La *TcGRX* recombinante formó cuerpos de inclusión y afectó el crecimiento de la bacteria al ser expresada en un sistema heterólogo:

El gen *TcGRX* fue amplificado por PCR con iniciadores específicos a partir de su secuencia genómica completa codificada en el cósmido 35i22. El fragmento amplificado fue clonado en el vector de expresión procariota pQE (Qiagen), el cual adiciona 6 histidinas al extremo N-terminal de la proteína recombinante para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC).

El estudio de la expresión de la proteína codificada por el gen *TcGRX* partió del análisis de 10 colonias recombinantes inducidas con una concentración 1mM de IPTG. Se encontró que sólo una colonia, denominada *TcGRX* #12, presentó una buena expresión de una proteína



con un peso molecular menor al esperado de 25 kDa. La secuencia de ADN determinó la delección de un nucleótido en la posición 540 a partir del codón de iniciación que resultó en un cambio en el marco de lectura, dando un codón de terminación 252 bases antes. La proteína mutada *TcGRX* #12 formó cuerpos de inclusión en las condiciones de inducción utilizadas y pudo ser purificada por columna de IMAC sólo en condiciones desnaturalizantes (Fig. A-5 a).

El resto de las colonias recombinantes tuvo un comportamiento atípico, ya que luego de la inducción con IPTG no se detectó un aumento de la densidad óptica a 660 nm, indicando una detención en el crecimiento de las bacterias o la lisis de las mismas. Luego de la inducción con 1mM de IPTG se detectó una proteína del tamaño esperado, 39 kDa, pero de expresión muy débil (Fig. A-5 b calle 2). El nivel de expresión de la proteína recombinante aumentó al disminuir la concentración de IPTG a 0.1mM (Fig. A-5 b calle 3). Inesperadamente, se logró la máxima inducción cuando la bacteria se creció sin inductor (Fig. A-5 b calle 4), sugiriendo la falta de represión producida por la inactivación de los antibióticos luego de un cierto tiempo de cultivo a 37°C y consecuente pérdida del plásmido que codifica para el represor (Manual Qiaexpressionist, Qiagen, 1997). En todos los casos, la *TcGRX* recombinante se encontró en cuerpos de inclusión (Fig. A-5 b calles 5 y 6) y por lo tanto, no fue posible purificar la proteína por cromatografía de afinidad en condiciones nativas (resultado no mostrado). La *TcGRX* recombinante tampoco se encontró en el sobrenadante concentrado del cultivo de las bacterias inducidas con 0.1mM de IPTG, sugiriendo que dicha proteína afecta el crecimiento de las bacterias en lugar de provocar su lisis (Fig. A-5 b calle 7).

La producción de GSTs y Grxs recombinantes insolubles en sistemas bacterianos fue documentada por diversos autores (Vlamiš-Gardikas y

col., 1997; Sherrat y col., 1997); incluso, llegó a documentarse la baja afinidad por la columna de IMAC de la fracción soluble de una GST recombinante fusionada a His (Sherrat y col., 1997). En el caso de la TcGRX, la falta de crecimiento de la bacteria sugiere la toxicidad de esta proteína para este organismo, aún en cantidades imperceptibles. Estos hechos coinciden con la obtención de una máxima expresión de la proteína recombinante sin agregado del inductor, ya que en estas condiciones la síntesis de la misma sería más lenta, permitiéndole a la bacteria crecer normalmente y formar los cuerpos de inclusión. El agregado de IPTG induciría una expresión explosiva de la TcGRX con los consecuentes efectos tóxicos.

Es necesario el clonado de esta enzima de *T. cruzi* en diversos vectores procariotas con el objeto de encontrar el sistema ideal capaz de permitir la obtención de esta proteína en forma soluble para realizar su caracterización bioquímica.

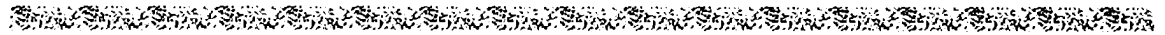


Figura A-1: Secuencia genómica y deducción de la secuencia aminoacídica de laTcGRX

Secuencia genómica y deducción de la secuencia aminoacídica de la TcGRX:

Las zonas de poliPy en las regiones 5' y 3' no traducidas se encuentran subrayadas. El sitio AG posiblemente aceptor del minlexón se indica con una flecha negra y el sitio de adición del poliA con una flecha azul. Los asteriscos negro y rojo indican el inicio de los clones de ADNc 19h22 y 44h9, respectivamente. El sitio activo característico de las Grxs, CXXC, se encuentra recuadrado en azul.

Sec. genómica 1 ATGGTGATATTATGGATCGGGCTTGATGTGGGGTGTGGGCAAATAGCAGGTTTTTTCATT 60
 Sec. genómica 61 TTGGCAATCACATCAACCCCGCGCGGGTGGGTCTGGAGAGTTAGAGGAGGCCAGAGA 120
 Sec. genómica 121 GGCTGCCCATTCGCAGGCAAAACAGTTGGATGTGGGTGGGATTTTGTGCATTGATGT 180
 Sec. genómica 181 CTTTTATTATTATTATTTTTATTATTTTGGCTTTTGCGCCCTTATCGTGATTT 240
 Sec. genómica 241 TTTTTTTTCCATTGCGTTGTTTATAAACTAACGGGGTTGATTTTCTCACGGCACTGTGC 300
 Sec. genómica 301 GTCTTCCATGCGGGGCTCATTTCGCCCTCATTGAACGTTTTTTTTTTTTTCTCTTATT 360
 Sec. genómica 361 TTATCCGCATTTCAGTCGAAAAATTTACATAGGTTTGGGTAAGGGATCAATTGGCCGAA 420
 Sec. proteína 1 M V L G K G S I G R 10
 Sec. genómica 421 AGTTGCTTGGGGCGACAGGTCTGATCGGCTCACTGGCGATTGGCGGCGGCTACTTTACGT 480
 Sec. proteína 11 K L L G A T G L I G S L A I G G G Y F T 30
 Sec. genómica 481 ATCAGCGACGACTGAAGGAAACCGCAGCTGCACGGCTGAAGAGTTCAACGCGGCACAAA 540
 Sec. proteína 31 Y Q R R L K E N R S C T A E E F N A A Q 50
 Sec. genómica 541 ACCAGGAAGAAGTCTTGGGCTCTTTCACACTTGAGGAATCCGAAGGAGCACCOCGAGA 600
 Sec. proteína 51 N Q E E L S W A L S E L R N P K E E P Q 70
 Sec. genómica 601 TTCTTCTCTATCGATATTCACCTTGCCCTTTTGTGGGACGGCGAAGGCCCTGCTGGACT 660
 Sec. proteína 71 I L L Y R Y S T C P F Q G T A K A L L D 90
 Sec. genómica 661 ACGCCAAAATTCACACGAATGTGTTGAGGTGGAGCCAATGTTAAAAAGGAGATTCTT 720
 Sec. proteína 91 Y A K I P E E C V E V E P M F K K E I S 110
 Sec. genómica 721 CATTTGCATACAAAAAGTACCACAGTTGCAGTTCAATGTACACGGATACAATGGCCAC 780
 Sec. proteína 111 S F A Y K K V P Q L Q F N V E G Y N G P 130
 Sec. genómica 781 TTGTCGTGGACTCGGAAATATCGTCAGTACTCTTGCAAAGCATGTGGGTATGGAGAAGC 840
 Sec. proteína 131 L V V D S E I I V S T L A K E V G M E K 150
 Sec. genómica 841 AGCTGAAGGATCCGGAAGTTGTGAAGTGGCGTGAGTGGGCCCGCGGACCGATGGTACGCC 900
 Sec. proteína 151 Q L K D P E V V K W R E W A R G P M V R 170
 Sec. genómica 901 TTTTGACTCTGGAATTTAACTCTTCTTTACAGGCGTGGTGGCGTTATTCCTACATAA 960
 Sec. proteína 171 L L T L E F N S S L Y R A W C G Y S Y I 190
 Sec. genómica 961 ATAACATTGACACGATCCCGTATGCGAACAAGTTGTTCTTAAAGATAGTGGGTGCACCTG 1020
 Sec. proteína 191 N E I D T I P Y A N K L F L K I V G A P 210
 Sec. genómica 1021 TGATGTACCTCGTATCTCAATACATCACTAGGCCCGGACTCCTTAAAGCGGTCACTTAC 1080
 Sec. proteína 211 V M Y L V S Q Y I T R P R L L K S G E L 230
 Sec. genómica 1081 ACGAGGGGAAGATGTAAAGGAAGACTTCATGGTGAGATAAACACCTTTATTGAAAAAG 1140
 Sec. proteína 231 E E G E D V K G R L E G E I N T F I E K 250
 Sec. genómica 1141 CCCTTTTGGGTGGGAAGAAAAAGTTTACGGTGGCTCAAACACGATCTTGGCGATTGG 1200
 Sec. proteína 251 A L L G G K K K F E G G S K P D L A D L 270
 Sec. genómica 1201 ACACCTACGGCGTTCTTCAATCTGTAGAGGACACCGCTCTATGAAGAAATGTTCAAT 1260
 Sec. proteína 271 D T Y G V L Q S V R G E R V Y E E I V Q 290
 Sec. genómica 1261 CTACGCCAATTAAACCATGGTTGGATAGTATGGACAAGGAGTTGGCCACGTGGGCCATC 1320
 Sec. proteína 291 S T P I K P W L D S M D K E V G E V G E 310
 Sec. genómica 1321 ATGGGTAGGAACTCCAGGCTCTTATGCAACTGCAACGGTGAGCATGAGAGCTGTTTAT 1380
 Sec. proteína 311 E G 312
 Sec. genómica 1381 ATGTAATAGGAGTAACGGGAATGGCAGCTACTCCGCCTCATGAATCTTATATGTGTAAT 1440
 Sec. genómica 1441 TCTTTTTTTTTTGGATTGGACAGACTACGTTTTTTTTTTTTTTTGTACCTTCTCCC 1500
 Sec. genómica 1501 TTGTCAGCCCATCTCTCGCAGTCTTGAATTTTGTGCTTCTGCTGCATTTTTTAAATT 1560
 Sec. genómica 1561 TTCTTAAATCATTTATTTAAAT 1583

Figura A-2: Alineamiento aminoacídico de la TcGRX con miembros seleccionados de las familias de Grxs y GSTs

Alineamiento aminoacídico de la TcGRX con miembros seleccionados de las familias de Grxs y GSTs:

Las secuencias alineadas corresponden a los siguientes organismos (entre paréntesis se muestra el número de acceso al GenBankTM): TcGRX, *Trypanosoma cruzi* (AF223386); DmSu(P), *Drosophila melanogaster* (AJ11320); EcGRX3, *Escherichia coli* (3GRX.pdb); EcGRX2, *Escherichia coli* (P39811); T4TRX, fago T4 (1AAZ.pdb); AtGST, *Arabidopsis thaliana* (P46421) y AsGST, *Ascaris suum* (P46436). Las secuencias se alinearon con el programa Clustal W. La estructura secundaria de la EcGRX3 usada para el modelado de la TcGRX se muestra en negrita abajo del alineamiento (H, α hélices; E, hoja plegada β ; t, vuelta y -, espiral). Los aminoácidos idénticos con TcGRX están sombreados. La secuencia dentro del recuadro grande indica el patrón de Grx (PROSITE:PS00195). El recuadro más pequeño indica el sitio activo CXXC. El * indica que la secuencia es parcial, el número total de aminoácidos de estas proteínas está dado en el extremo C-terminal después de la barra.

TcGrx	MVLGKSGIGRK-----LLGATGLIGSLAIGGGYFTYQRRLKENRSCTAEEFNAAQNQ---EELSWALSHLRNPKHP--QILLRYSTCPFCGTA	85
Dmsu (P)	*AVAVENGCGRKKPNGTFKLAVLGATVGAATGSVYTMYQRTDGSSSHKEHETKPTRLDGIPAGVRITKRYVNPDKDTSGLDIVLFQFQTCPFCKV	139
EcGrx3	-----	17
EcGrx2	-----	15
T4Trx	-----	20
AtGST	-----	21
AtGST	-----	8

-----MPKV--YGYDSNIHKCVYCDNA
 -----MAEKE--EVKLLGIWASPFRRV
 -----MP--QYKLTFFDIRGLGEGA

 -----EEEE--tt-HHHHH

TcGrx	KAILDYAKIPHECVEPEMF-KKE-ISSFAYKK--VPQLQFNH---GYNGPLVVDSEIIVSTLAKHVMEKQLK-----	153
Dmsu (P)	RAPIIDYMGISYAVVEVDVL-RQD-IRWSSVKK--VPMVLIRQ---DGKYVQMVDSAIISLIATHLQDKRTDIGELAQFYPHTSFFDDGKKK	227
EcGrx3	KAILSSKGVSFQELPIDGNAKRE-EMIKRSGRTPQIFIDAQHIGGCCDDLALDARGGLDPLLK-----	82
EcGrx2	RMIFGLKNIPVELHVLNDD-AETPTRMVQKQ--VPILQKDD---RYMP-----ESMDIVHYVDKLDGK---P-----	76
T4Trx	KRILTVKKQPFEFINIMP-----E-KGVFDEK--IAELLTKL---GRDTQIGLTMPOVPAPDGSHIGGFDQLR-----	83
AtGST	EMALKLKGIPYEVVEILEN-KSP-LLLALNPI--HKKVPVLVH-----NGKTILESHVILEYIDETWPQNPI-----	86
AtGST	RLIFHQAGVKFEDNRLKRED-WP-----ALKPK--TPFGQLPLL---EVDGEVLAQSAAIYRYLGRQFGLAGKT-----	81

HHHHH---tEEEEttt---HHHH HHHHH-----EEEEttt---HHHHHHHH---t-HHHH-

TcGrx	-----DPEVVKREWARGPMVRLLT---LEFNSSLYRAWCGYSYINNIDT-IPYANKLFLKIVGAPVMYLVSYITR	221
Dmsu (P)	NDILNKYFLMYREHTPKGVSKETDETRKWRSWADSHLVHLISPNCYQTMGESLETFFWFSQAGEWDVHFPKWERDLMVYCGATAMWAIKMLKR	322
EcGrx3	-----	82
EcGrx2	-----	119
T4Trx	-----EYFK-----	87
AtGST	-----P-----QDPYERSKA---RFFAKLVDEQIMNVGFISMARA-DEKGREVLAEQVRELIMYLEKELVG-	143
AtGST	-----P-----MEEAQVDSIFDQF---KDFMAELRPCFRVLAGEFEGDK-EKVLKEVAVPARDKHLPLLEKFLAK-	142

TcGrx	PRLLKSGHLHEGEDVKGRHLHGEINTFIEKALLGKKKPHGGSKPDLA-DLDTYGVLSVRGHRVYEEIVQSTPIK--PWLDSDMDKEVGHVGHG	312
Dmsu (P)	-R-----HALSDDVRSHMYDALDQWTTTELKRNKTKFMGGKQPSLA-DLSVFGVLSSMEGCQTFKDCLONTSIG---KWFYDVKALVEKNRQQL*405/419	
EcGrx3	-----	
EcGrx2	-----KYFVDKKEASAGNFADLLAHSDDLKNIISDDLALDKLIV-KPNAVNGELSEDDIQLFLLRNLTLVAGINWPSRVADYRDNMAKQT*205/215	
T4Trx	-----	
AtGST	-----K---DYFGKTVGFLDFVAGSLIPFCLERG---WEGIGLEVIT-EKFPPEFKRWVRNLEKVEIVKDCVPPR---EEHVEHHNYMAERVRS	224
AtGST	-----SGSEYMGKSVTWADLVITDSLAS-----WESLIPDLSGHLQKKYIEHVRELPNIKKWIAERPKT--PY-----	206

Figura A-3: Modelado molecular de la TcGRX tomando como templado la GRX3 de *E. coli*

Modelado molecular de la TcGRX tomando como templado la GRX3 de *E. coli*:

El modelado de la TcGRX fue realizado por reemplazo molecular a partir de la estructura tridimensional obtenida por cristalografía de la Grx3 de *E. coli* utilizando el programa TOM/mdFrodo (Cambillau y col., 1987). Al pie de la secuencia se muestra la porción alineada entre ambas proteínas y su estructura secundaria (H, α hélices; E, hoja plegada β ; t, vuelta y -, espiral). Los aminoácidos idénticos se muestran en color rojo y los cambios conservativos en verde. El alineamiento fue modificado manualmente de forma tal de conservar la estructura secundaria y aumentar la similitud entre las secuencias. El porcentaje de similitud obtenido fue del 51% tomando como reemplazos conservativos aquellos residuos con polaridad o carga electroestática similar. Los residuos 38, 50, 51 y 61-63 fueron eliminados de la Grx3 y la estructura terciaria fue ajustada gráficamente, realizando por último tres pasos de refinamiento del modelo.



1 2 3 4 5 6 7 8

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012

TcGRX 69 pqillyrystcpcfgtakalldyakiphecvevepmf-kkeissfaykk--vpqlqfnvh--gyngplvvdseiivstlak 144

EcGRX3 1 ANVEIYTKETCPYSHRAKALLSSKGVSFQELPIDGNAAKREEMIKRSGRTTVPQIFIDAQHIGGYDDLALDARGGLDPLLK 82

Est. 2° --EEEE--tt-HHHHHHHHHHHH---tEEEEtt---HHHHHHHHHH-----EEtt-EE---HHHHHHHH--t-HHHH-

β1 α1 β2 α2 β3 β4 α3 α4

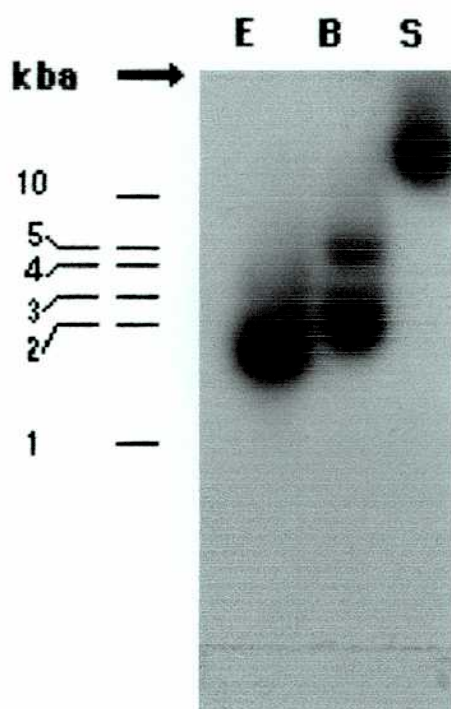
Figura A-4: Caracterización molecular del gen *TcGRX*

Caracterización molecular del gen *TcGRX*:

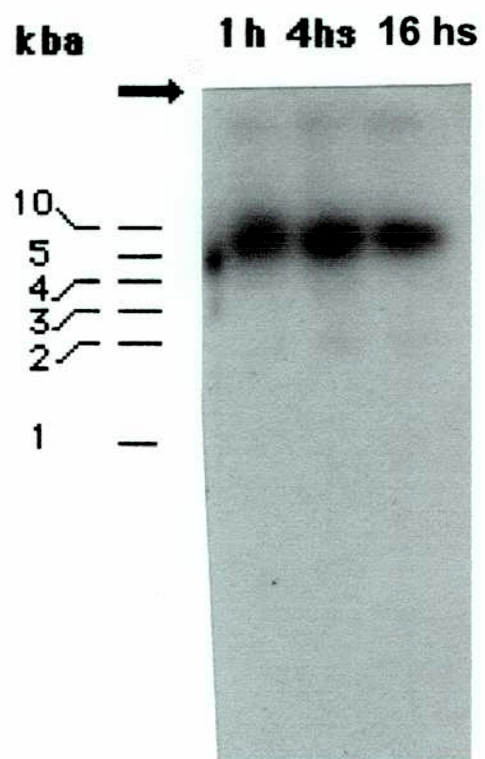
- a) Ensayo de “southern blot” sobre ADN de *T. cruzi* clon CL Brener digerido totalmente con EcoRI (E), BamHI (B) y SacI (S) utilizando como sonda el clon 19h22.
- b) Ensayo de “southern blot” sobre ADN de *T. cruzi* cepa Tulahuén digerido parcialmente con la enzima PstI utilizando como sonda el clon 19h22. Los tiempos de incubación se indican arriba de cada calle.
- c) Localización cromosómica del gen *TcGRX* en el clon CL Brener.

En todos los casos la flecha indica el sitio de siembra del ADN en el gel de agarosa.

a)



b)



c)

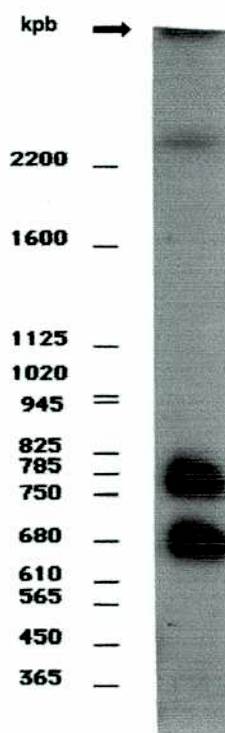


Figura A-5: Expresión y purificación de la TcGRX recombinante

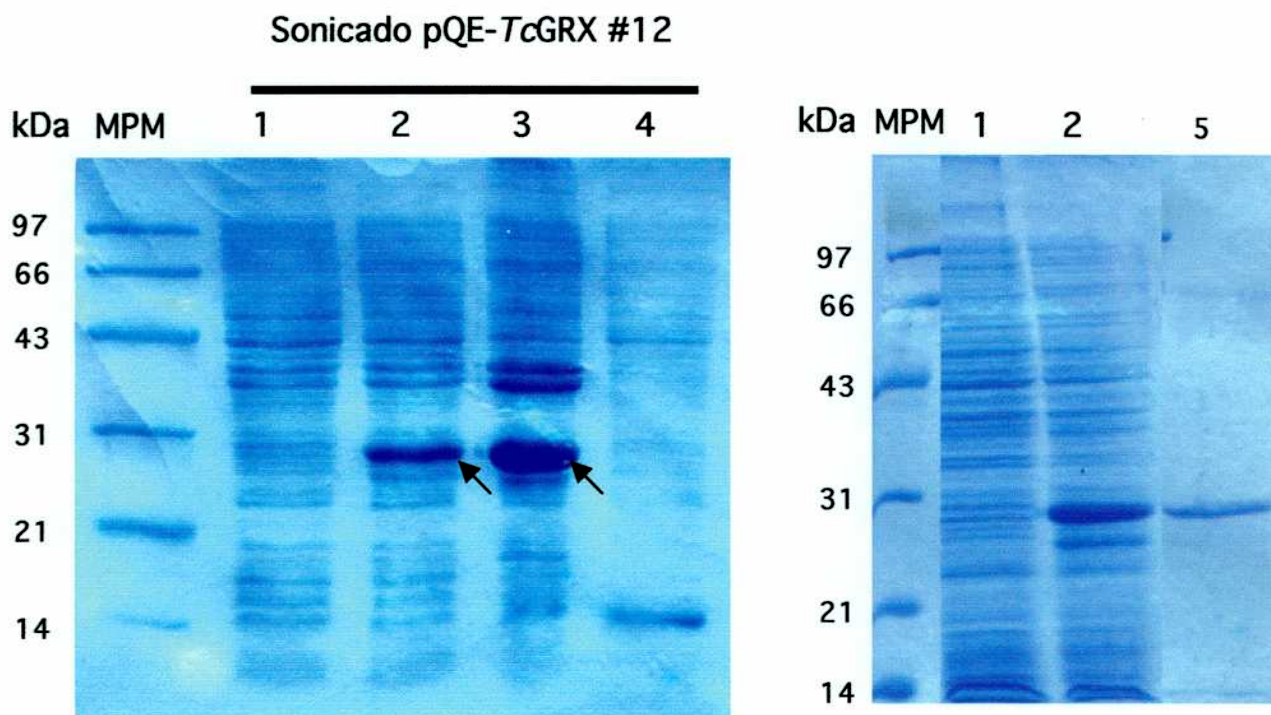
Expresión y purificación de la TcGRX recombinante:

Las fracciones obtenidas en los distintos pasos de la inducción y purificación de la TcGRX recombinante (a, proteína truncada, TcGRX#12, y b, TcGRX entera) se corrieron en un gel de poliacrilamida 15% con SDS y se visualizaron mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue. MPM, marcadores de peso molecular. La flecha señala la proteína inducida (a, 25 kDa y b, 39 kDa).

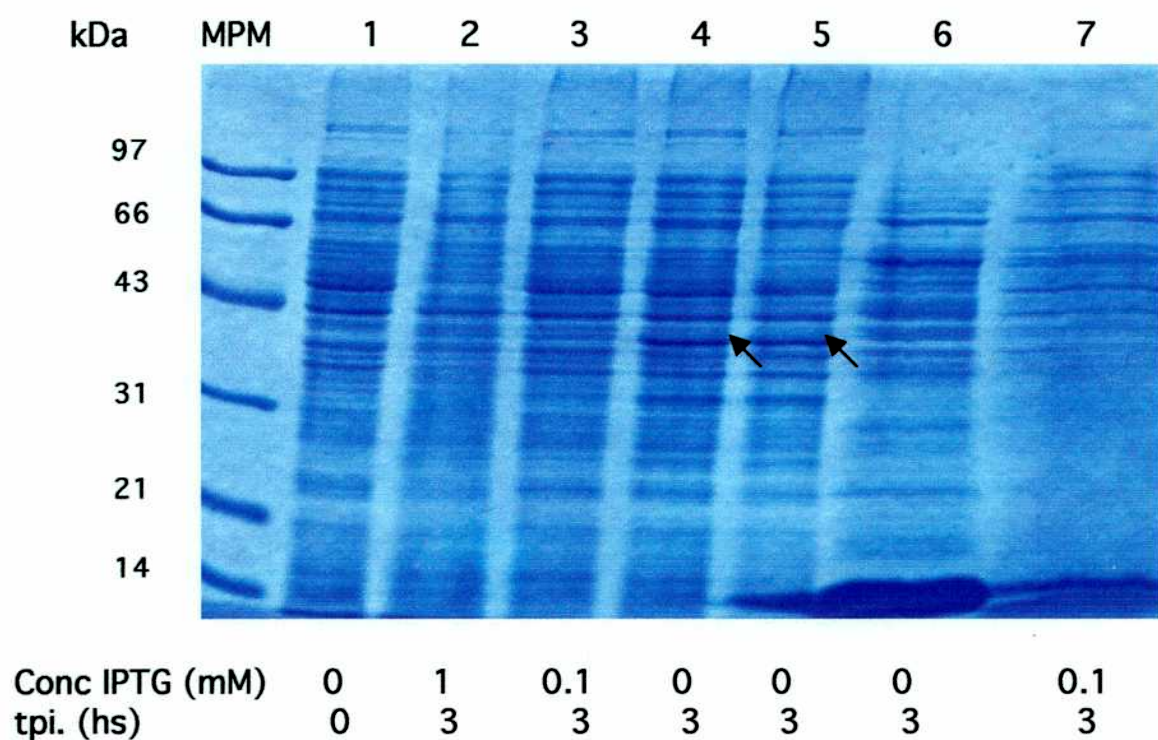
a) Inducción y purificación de TcGRX#12: (1) Sonicado de bacterias recombinantes no inducidas, (2) sonicado de bacterias inducidas con 1 mM de IPTG durante 3 hs, (3) pellet y (4) sobrenadante de 9000 x g del sonicado de bacterias inducidas, (5) Proteína TcGRX#12 recombinante purificada por columna de IMAC en condiciones desnaturizantes.

b) Inducción de la proteína TcGRX recombinante con distintas cantidades de IPTG: tpi, tiempo post-inducción, (1) sonicado de bacterias no inducidas, (2) sonicado de bacterias inducidas con 1 mM, (3) 0.1 mM y (4) 0 mM de IPTG durante 3hs, (5) pellet y (6) sobrenadante de 9000 x g proveniente de (4) y (7) sobrenadante de cultivo proveniente de (3).

a)



a)



PARTE B

PARTE B: Identificación y caracterización de antígenos en el *Trypanosoma cruzi* con epitopes compartidos con la GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum*. Evaluación de estos antígenos en ensayos de inmunoprotección experimental.

B.1 - BREVE INTRODUCCION:

Las GSTs son enzimas que presentan muy baja homología en su estructura primaria pero poseen una estructura tridimensional muy conservada (Dirr y col., 1994; Martin, 1995).

En *T. cruzi* existen antígenos de reactividad cruzada con la GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum* (GSTsj) (Gruber y Zingales, 1992), los cuales hasta el momento no han sido suficientemente estudiados. Por otro lado, se describió el efecto protector de una fracción de *T. cruzi* con actividad de GST contra la infección experimental por este parásito (Plumas-Marty y col., 1992; Plumas-Marty y col., 1993).

La GSTsj es una enzima muy bien caracterizada, que demostró ser un candidato potencial para una vacuna contra la schistosomiasis (Mitchell y col., 1988; Yang y col., 1995) y es uno de los blancos de acción del prazicuantel, una droga utilizada contra este parásito (McTigue y col., 1995). Esta enzima se encuentra clonada en los plásmidos de expresión comerciales pGEX (Pharmacia/Biotech) y puede purificarse fácilmente mediante cromatografía de afinidad con GSH (Smith y Johnson, 1988).

Dados los antecedentes, se consideró interesante profundizar la caracterización de los antígenos de *T. cruzi* con epitopes compartidos con la GSTsj a fin de evaluar los mismos en protocolos de inmunoprotección.

B.2 – OBJETIVOS PARTICULARES PROPUESTOS PARA ESTA SECCION:

- Identificar en *T. cruzi* los antígenos de reactividad cruzada con la GSTsj mediante ensayos de “western blot” y rastreo en una biblioteca genómica utilizando un suero anti-GSTsj.
- Purificar los antígenos de reactividad cruzada a partir de homogenato de epimastigotes mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos anti-GSTsj.
- Secuenciar el extremo N-terminal de los antígenos purificados.
- Determinar si los antígenos purificados presentan actividad de GST.
- Caracterizar los genes de los antígenos obtenidos en el rastreo inmunológico.
- Evaluar la capacidad inmunoprotectora en ratones de la cepa BALB/c de los antígenos seleccionados.

B.3 – RESULTADOS Y DISCUSION:

- El suero anti-GSTsj reconoce antígenos en el estadio epimastigote de *T. cruzi*:

La GSTsj expresada por el plásmido de expresión pGex-1 y purificada mediante cromatografía de afinidad con GSH fue utilizada para producir un antisuero de conejo. Este anti-suero demostró reactividad contra antígenos de *T. cruzi* a partir de la segunda dosis evaluada por las técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA) y “western blot”.

Utilizando como antígeno homogenato total (HT) de epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* en ELISA, el suero

anti-GSTsj mostró una densidad óptica máxima 90 veces mayor que la obtenida con un suero normal de conejo (SNC) a una dilución 1/50. Dicho suero específico mantuvo una densidad óptica mayor a 0.1 aún cuando se lo diluyó 400 veces, siendo a esta dilución 16 veces más reactivo que el SNC (Fig. B-1 a). Cuando la técnica de ELISA se realizó utilizando como antígeno la GSTsj recombinante, el suero específico demostró una densidad óptica mayor a 0,1 hasta una dilución de 1/32000 (Fig. B-1 a recuadro).

Con el fin de identificar las proteínas reconocidas por el suero anti-GSTsj, el mismo se utilizó en ensayos de “western blot” sobre extractos del parásito. Dos antígenos de 27 y 64 kDa fueron visualizados sobre HT de epimastigotes de *T. cruzi*, mientras que sobre la fracción soluble (FS) de este parásito el antisuero reconoció dos proteínas de 27 y 38 kDa. Un antígeno de 27 kDa también fue reconocido por este antisuero sobre HT de *Leishmania braziliensis* (Fig. B-1 b).

- La actividad de GST en la FS de *T. cruzi* se vio levemente incrementada luego del tratamiento con pH ácido durante tiempos cortos:

Dado que uno de los objetivos planteados fue purificar los antígenos de reactividad cruzada por cromatografía de inmunoafinidad con el suero anti-GSTsj y ya que este procedimiento sometería a la FS del parásito a tratamientos que podrían producir una pérdida de la actividad de GST, nos propusimos evaluar esta actividad en las distintas condiciones a las que sería sometida la enzima, como ser: 1) incubación a 4 °C por varias horas, ya que el pegado de las proteínas se realizaría

durante toda la noche a esa temperatura y 2) disminución del pH, ya que la elución se realizaría a pH 2.3. Con este fin, se midió la actividad de GST utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobencono (CDNB) como sustrato en las condiciones standard (Habig y col., 1974) en FS incubada a 4 °C y/o llevada a pH 2.3 y luego neutralizada a pH 7 a distintos tiempos. La figura B-2 muestra la cantidad de conjugados de CDBN formada en función del tiempo en FS (control), FS que fue sometida a pH 2.3 durante 5 y 15 minutos, FS incubada a 4 °C durante toda la noche y FS incubada a 4 °C durante toda la noche y sometida durante 15 minutos a pH 2.3.

La actividad específica obtenida en la FS fue 0.932 ± 0.410 nmoles/min/mg de proteínas, la cual, si bien mostró gran variabilidad está dentro del rango publicado (Yawetz y Agosin, 1980; Yawetz y Agosin, 1981). La FS sometida durante 5 minutos a pH 2.3 y luego neutralizada a pH 7 demostró una leve tendencia de aumento de la actividad de GST ($AE=1.35 \pm 0.226$ nmoles/min/mg proteína), mientras que el tratamiento con bajo pH durante 15 minutos no afectó dicha actividad. El tratamiento con pH ácido durante una hora y media produjo una disminución de la actividad en un 48.5 % (dato no mostrado). La actividad de GST fue afectada en mayor magnitud por la temperatura que por el pH; ya que, la incubación durante toda la noche de la FS a 4 °C disminuyó la actividad en un 53.5 % (Fig. B-2).

La actividad de GST de *T. cruzi* utilizando CDBN como sustrato presenta un pH óptimo de 7 (Yawetz y Agosin, 1980). La sensibilidad al pH de las reacciones enzimáticas refleja una alteración en el estado de ionización de los residuos que participan de la catálisis y/o interactúan en la unión con el sustrato, sin dejar

de tener en cuenta que el sometimiento a pHs extremos provoca la desnaturalización de las enzimas (Horton y col., 1993). Por cristalización de GSTs en presencia de GSH y por mutagénesis dirigida de los aminoácidos del sitio activo, se sabe que el mecanismo catalítico de estas enzimas está dado por la capacidad de disminución del pKa del grupo tiol del GSH, dando lugar a la formación de un anión tiolato del GSH (GS^-) que actúa como nucleófilo atacando a los centros electrofílicos de los xenobióticos o sustratos endógenos. La disminución del pKa del grupo tiol (siendo 9 cuando el GSH está en agua y 6-7 cuando está en el sitio activo de la GST) es posible gracias a la presencia de una Tyr protonada de la región N-terminal (Ser en GSTs de clase theta), la cual estabiliza al GS^- mediante un puente de hidrógeno ($\text{Tyr-OH}\cdots\text{SG}$) (Dirr y col., 1994; Wilce y Parker, 1994; Tan y col., 1996). Si bien un pH de 2.3 podría considerarse extremo y se esperaría una inactivación de la GST por desnaturalización, se observó un leve aumento de la actividad de esta enzima cuando la FS de *T. cruzi* fue sometida a pH 2.3 durante tiempos cortos (5 minutos) y luego una disminución de la misma hasta un 48.5 % de su actividad normal luego de someter la fracción a ese pH durante una hora y media (Fig. B-2). Si bien el planteo es totalmente especulativo podría llegar a pensarse que la disminución del pH de alguna forma favorecería la ionización de los residuos involucrados en la estabilización de los sustratos en su forma activa. Por otro lado, la desnaturalización provocada a la molécula se revertiría al neutralizar nuevamente la fracción a pH 7, mientras que la ionización de los aminoácidos del sitio activo no volverían a su

- Al menos diez proteínas de *T. cruzi* fueron purificadas por Inmunoadfinidad con anticuerpos anti-GSTsj:

La fracción PHGST presentó varios componentes proteicos al ser corrida en un gel de poliacrilamida 12 % con SDS y teñida con coomassie (Fig. B-3): cuatro proteínas principales denominadas PHGST 1 a 4, de 30.2, 17.5, 14.7 y 10.7 kDa, respectivamente; tres de intensidad intermedia, denominadas I, II y III, de 25.7, 12.9 y 8.4 kDa, respectivamente y tres muy tenues de 56.2, 50.1 y 40.7 kDa.

La actividad de GST fue medida en la fracción PHGST eluida de la columna de IgG anti-GSTsj, obteniéndose una actividad específica de 21.61 +/- 3.8 nmoles de CDNB conjugado/min/mg proteínas. Teniendo en cuenta los valores de actividad específica

obtenidos en la FS y que el tiempo de exposición al pH ácido, dadas las dimensiones de la columna, no fue mayor a cinco minutos, se puede considerar un factor de purificación promedio de 24.4 luego de pasar la FS por la columna de inmunoafinidad. Este factor puede considerarse sólo una estimación ya que no fue posible medir la actividad de GST en la misma FS a partir de la cual se obtuvieron las PHGSTs. La actividad de GST en citosol es muy baja e incluso algunos autores explicitaron la imposibilidad de detectarla (Plumas-Marty y col., 1992). La puesta a punto de esta actividad resultó sumamente complicada, ya que en el tubo de reacción fue necesario colocar 2 mg de proteínas para obtener una actividad medible (Yawetz y Agosin, 1980), con lo cual si la FS no es preparada en las condiciones estrictas para medir esta actividad y a la concentración requerida se obtienen resultados erróneos. Si bien provienen de una estimación, los resultados obtenidos concuerdan con purificaciones realizadas por otros autores. El pasaje de citosol del parásito por una columna de glutatión agarosa permitió eluir una fracción conteniendo tres proteínas con una actividad específica de 70 nmoles/min/mg proteína (Plumas-Marty y col., 1992), mientras que la única referencia de purificación a homogeneidad de una GST en el *T. cruzi* presentó un factor de purificación de 140.6 con una actividad específica de 86.8 nmoles/min/mg proteínas luego de cinco pasos de purificación (Yawetz y Agosin, 1981). Teniendo en cuenta que la fracción PHGST presenta al menos diez componentes, la actividad específica y el factor de purificación concuerdan con los resultados publicados por estos autores, sin embargo no hay que dejar de considerar la diferencia en la cepa de *T. cruzi* utilizada y que en los

un 46 % de similitud con regiones internas de proteínas de membrana y mitocondriales (Fig. B-4 a). Para evaluar la significancia estadística de los alineamientos, el valor estadístico E es el parámetro más confiable, ya que tiene en cuenta, además de los cambios conservativos y "gaps", la longitud de la secuencia y el tamaño de la base de datos rastreada (Brenner y col., 1998). El valor mínimo de E obtenido en los alineamientos con PHGST 4 fue 1.4, el cual no es considerado estadísticamente significativo (Altschul, 1998; Brenner y col., 1998).

La secuencia N-terminal de PHGST 4 contiene un 46.6 % de aminoácidos hidrofóbicos (un 53.3 % si se considera una Leu en la tercera posición en lugar del Glu) y presenta un índice de hidrofobicidad promedio de 1.18 (Kyte y Doolittle, 1982) (Fig. B-4 b). La hidrofobicidad de la secuencia sugiere que las similitudes encontradas en los bancos de datos sólo podrían ser atribuidas a la composición aminoacídica y no a la secuencia; este hecho fue corroborado aplicando el programa PRSS, con cada una de las secuencias con mayor similitud (Pearson y Lipman, 1988). Por otro lado, se determinó que la secuencia N-terminal de PHGST 4 posee las características típicas de un péptido señal de proteínas eucariotas para ser traslocadas a retículo endoplásmico: una Met inicial, una zona hidrofóbica corta con Leu, Ala y Val y suponiendo que el sitio de clivaje se encuentre entre los residuos Ala₁₄ y Gly₁₅, posee un aminoácido Ala en la posición -1 (en relación al sitio de clivaje) y un aminoácido Leu en la posición -3 (Nielsen y col., 1997). El gráfico mostrado en la figura B-4 b sugiere que si la secuencia continuara, el sitio de clivaje podría estar algunos aminoácidos más adelante.

La variabilidad aminoacídica existente en los péptidos señales explicaría la falta de similitud de la secuencia de PHGST 4 con péptidos señales de otras proteínas y la similitud sólo por azar con secuencias hidrofóbicas de proteínas de membrana, como ser el dominio transmembrana 12 del transportador de glucosa de *T. cruzi* (Tetaud y col., 1994), y mitocondriales, como la región de interfase de la lipoamida deshidrogenasa de *T. cruzi* (Schöneck y col., 1997) (Fig. B-4 a).

La presencia de una proteína de membrana o secretable en la fracción soluble del parásito podría explicarse por el efecto de la rotura del mismo con un método bastante agresivo como es la compresión y descompresión, el cual no permitiría tener fracciones subcelulares totalmente puras.

Figura B-1: Reactividad del suero anti-GSTsj contra antígenos de epimastigotes de *T. cruzi*

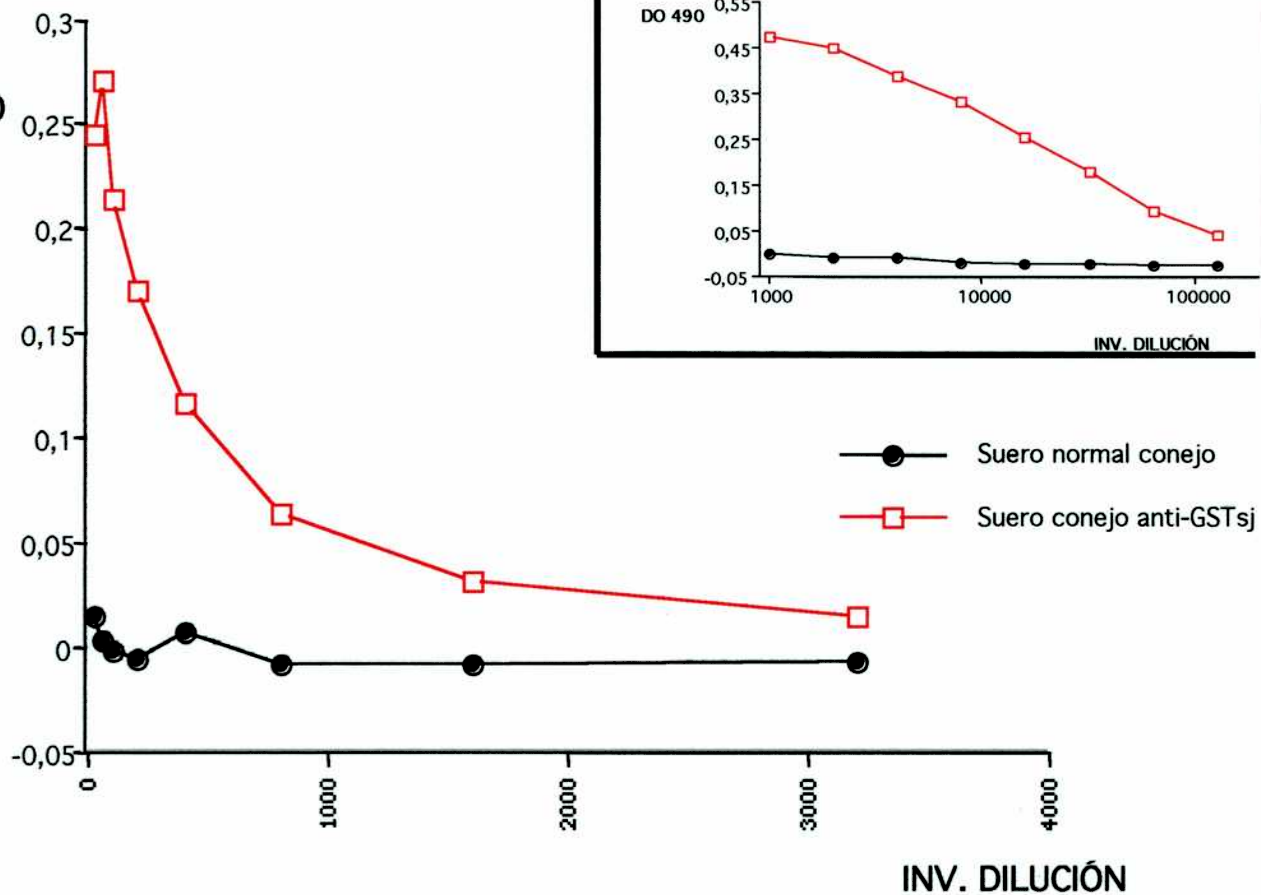
Reactividad del suero anti-GSTsj contra antígenos de epimastigotes de *T. cruzi*:

a) Enzimoinmunoensayo sobre homogenato total de epimastigotes de *T. cruzi* y GSTsj (recuadro) con suero de conejo anti-GSTsj. Como control negativo se utilizó suero normal de conejo (SNC).

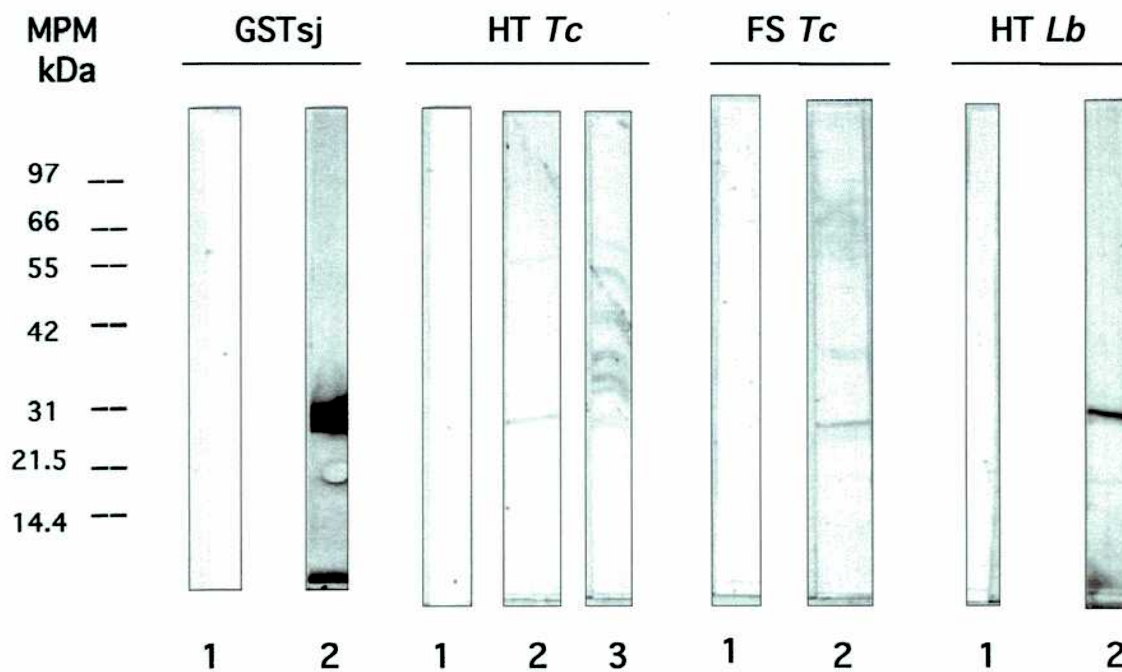
b) Ensayo de “western blot” sobre GSTsj (GSTsj), homogenato total de epimastigotes de *T. cruzi* (HTTc), fracción soluble de epimastigotes de *T. cruzi* (FSTc) y homogenato total de *Leishmania braziliensis* (HTLb) con: 1- suero conejo normal, 2- suero conejo anti-GSTsj y 3- suero conejo anti-epimastigotes de *T. cruzi*. MPM: marcadores de peso molecular.

a)

DO490



b)



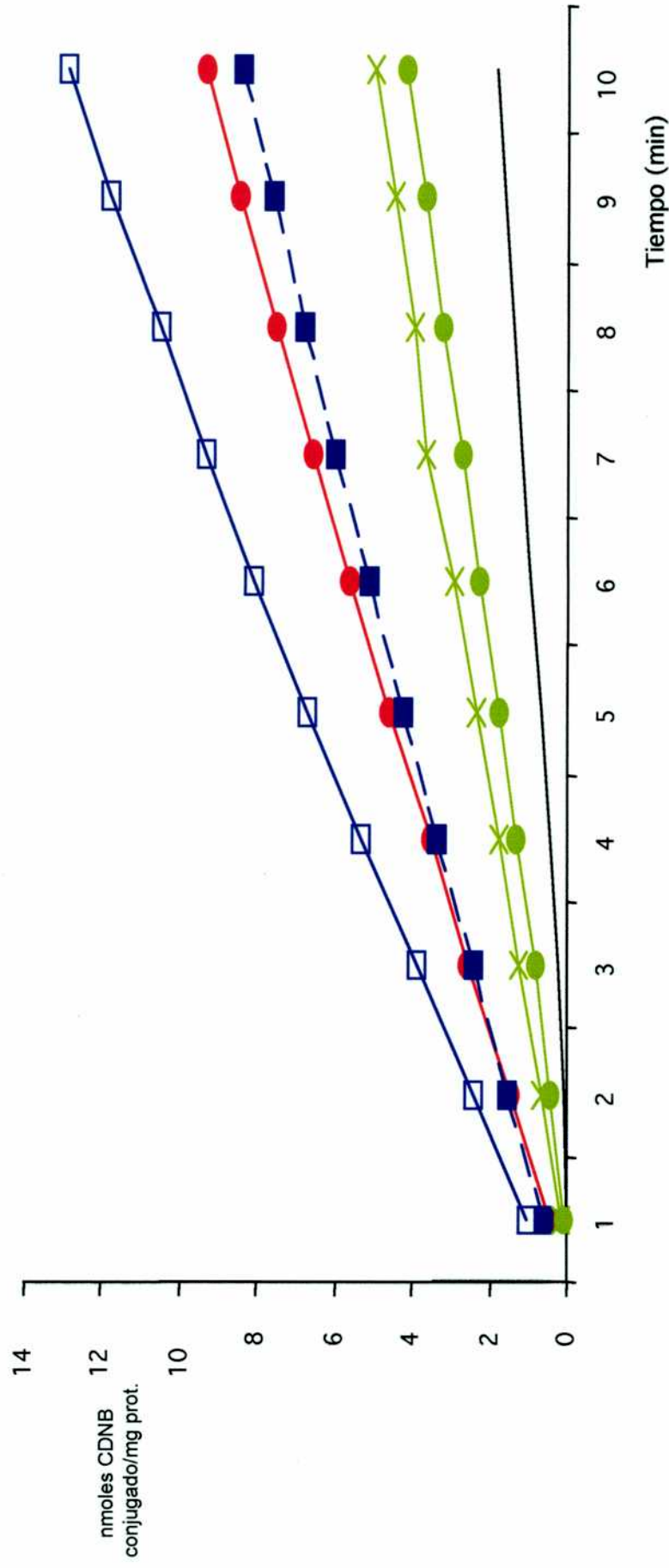


Figura B-2: Actividad de GST en fracción soluble (FS) de *T. cruzi* sometida a diferentes tratamientos de pH y temperatura:

Se muestra un experimento representativo en el cual se midió la actividad de GST utilizando CDNB como sustrato en: 1) FS de epimastigotes de *T. cruzi* sin tratamiento (— □ —), 2) FS sometida a un pH 2.3 durante 5 y 15 minutos y luego neutralizada (— ● — , — ■ — , — × — , — ● — , respectivamente), 3) FS incubada durante toda la noche a 4 °C (— × —) y 4) FS incubada durante toda la noche a 90 °C, posteriormente sometida a pH 2.3 por quince minutos y neutralizada (— ● —). Como control negativo se inactivó la FS durante dos minutos a 90 °C (— —).

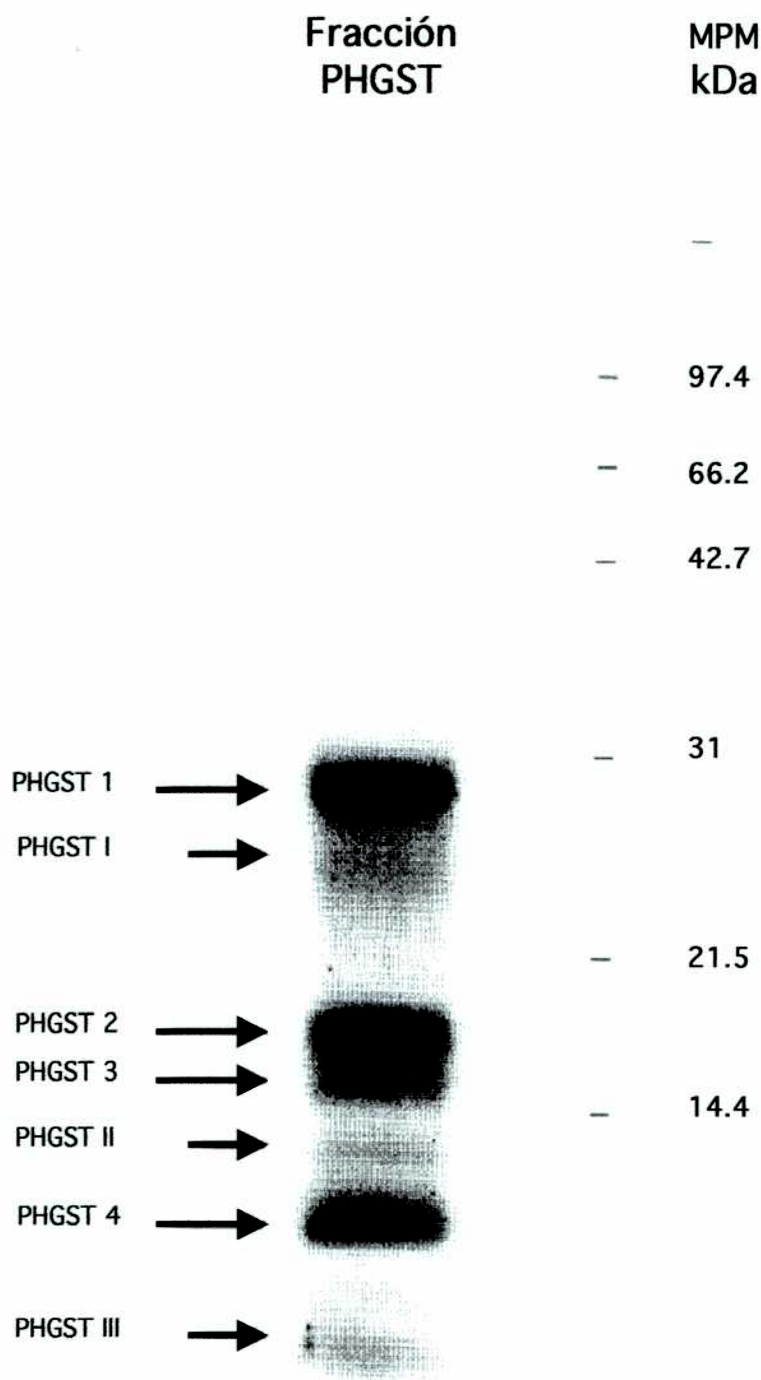


Figura B-3: Perfil electroforético de la fracción PHGST purificada a partir de epimastigotes de *T. cruzi* por cromatografía de afinidad con IgG anti-GSTsj:

La FS de *T. cruzi* fue pasada a través de una columna de afinidad preparada con la IgG purificada a partir del suero de conejo anti-GSTsj. Las proteínas unidas (PHGST) fueron eluidas con pH 2.3, corridas en un gel de poliacrilamida 12 % con SDS de 16 cm de longitud y teñidas con coomassie brilliant blue. MPM: marcadores de peso molecular. Proteínas mayoritarias: PHGST 1, PHGST 2, PHGST 3 y PHGST 4. Proteínas de representación intermedia: PHGST I, PHGST II y PHGST III.

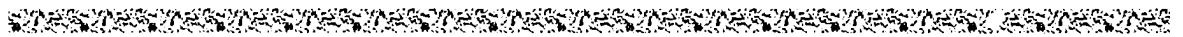


Figura B-4: Caracterización de la secuencia N-terminal de la proteína PHGST 4

Caracterización de la secuencia N-terminal de la proteína PHGST 4:

a) Alineamiento de la secuencia N-terminal de PHGST 4 con las proteínas que presentaron mayor similitud comparando con el programa BLASTP en bancos de secuencias proteicas totales y específicas de *T. cruzi*. En la secuencia N-terminal de PHGST 4 la / indica que hay dos aminoácidos posibles para esa posición y X que no pudo determinarse el aminoácido. Nt PHGST 4 (Tc): N-terminal PHGST 4; Tr Gluc (Tc): transportador de glucosa de *T. cruzi* (nº acceso gb. AAA21207.1); LipDH (Tc): lipoamida deshidrogenasa de *T. cruzi* (sp P90597); Ag Sup (Tc): antígeno de superficie de *T. cruzi* FL-160 (nº acceso pir PH1919); HSP60 (Tc): proteína inducible por calor de 60 kDa de *T. cruzi* (nº acceso pir S61295); FlaB (Arc): flagelina B de *Thermoplasma acidophilum* (nº acceso emb CAC11693.1). Los aminoácidos idénticos a PHGST 4 se muestran en azul y los cambios conservativos en verde. Los números al principio y al final de cada secuencia indican la posición en la proteína completa. Las siglas Mp y Mi luego de la identificación de cada proteína indican la localización en membrana plasmática y mitocondria, respectivamente. %ID: porcentaje identidad; %SIM: porcentaje similitud; E: valor estadístico.

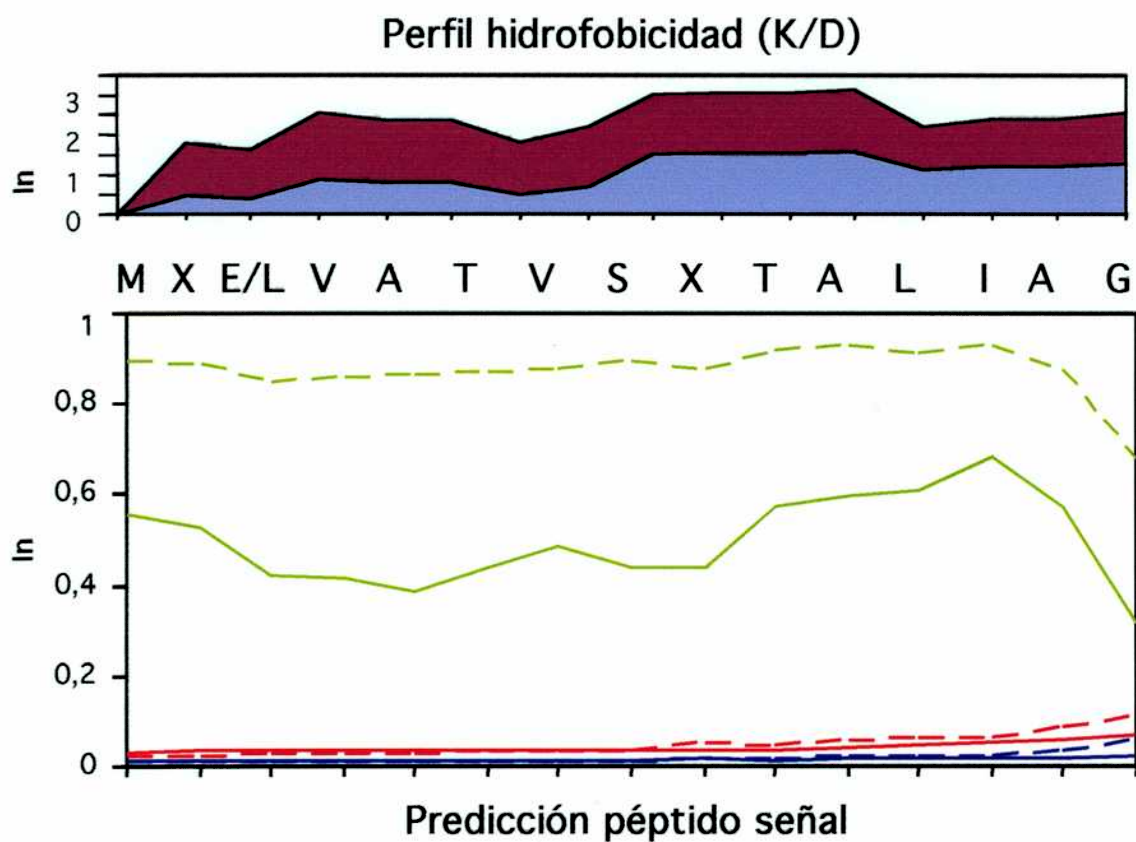
b) El gráfico de áreas superior muestra el perfil de hidrofobicidad de la secuencia según el índice de Kyte y Doolittle para cada aminoácido. Las áreas en color rojo y celeste corresponden al perfil de la secuencia con un residuo Leu y con un residuo Glu en la tercera posición, respectivamente.

El gráfico inferior muestra la probabilidad de la secuencia de ser un péptido señal según el programa SignalP (Nielsen y col., 1997). El valor C, marcado en azul, reconoce los sitios de clivaje frente a otras posiciones de la secuencia, el valor más alto corresponde a la posición +1. El valor S, indicado en verde, reconoce las secuencias de péptido señal, presenta un valor máximo de 1 y es alto en las posiciones previas al sitio de clivaje. El valor Y, indicado en rojo, optimiza la predicción del sitio de clivaje tomando en cuenta los valores C y S. La línea llena corresponde a la secuencia con un Glu y la línea punteada corresponde a la secuencia con una Leu en la tercera posición.

a)

																			%ID	%SIM	E
Nt PHGST4 (Tc)	1	M	X	E/L	V	A	T	V	S	X	T	A	L	I	-	-A	G	15	100	100	
Tr Gluc (Tc)Mp	381	A	S	L	V	A	S	V	S	C	L	L	L	C	-	-G	V	395	40	46	11
LipDH (Tc)Mi	365	M	P	E	V	A	S	V	G	K	S	E	D	E	-	-L	K	379	33.3	46	8.2
Ag.sup (Tc)Mp	492	F	T	L	V	A	T	V	S	I	D	K	A	P	-	-E	K	506	40	40	1.4
HSP60 (Tc)Mi	151	I	V	Q	V	A	T	I	S	A	N	G	D	E	-	-E	L	165	26.6	40	36
FlaB (Arc)Mp	26	M	V	L	V	A	A	V	A	T	V	L	I	H	T	A	G	42	66.6	73.3	68

b)



- El suero anti-GSTsj reconoce eptopes en antígenos de superficie de tripomastigotes de la familia Tc13:

Con el objeto de obtener los genes de los antígenos de *T. cruzi* reconocidos por el suero anti-GSTsj y de identificar otros nuevos pertenecientes a estadios del parásito distintos al epimastigote, se realizó un rastreo con dicho suero sobre una biblioteca genómica de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* construida en el vector λ ZapII (Búa y col., 1999). Se rastrearon un total de 2×10^5 placas de fagos obteniéndose treinta y ocho clones recombinantes reconocidos por el suero anti-GSTsj. Dichos clones fueron denominados PHGST#1 a #38 (nótese que el signo # los diferencia de las proteínas purificadas por inmunoafinidad) y en principio se seleccionó sólo uno de ellos para ser analizado y secuenciado, el clon PHGST#5.

El tamaño del inserto de PHGST#5 fue de 4.5 kb. La secuencia a partir del extremo 5' demostró la presencia de una región codificante de 2391 pb que presentó homología con miembros de la familia Tc13 de la superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes, conteniendo una región de repeticiones codificantes para el motivo característico de esta familia entre las bases 1427 y 2103 (Campetella y col., 1992) (Fig. B-5). Dicha secuencia carecía de la porción 5' del gen. A partir del extremo 3' se secuenciaron 195 pb, encontrándose a 73 bases del sitio EcoRI el inicio de una secuencia SIRE ("short interspersed repetitive element") (Vázquez y col., 2000) e inmediatamente en su extremo 5' la secuencia de inserción característica. La secuencia SIRE obtenida presentó un 72.5 % de homología con la secuencia consenso de la región conservada I (Fig. B-5 secuencia en color

rojo). Esta secuencia repetitiva se encuentra sólo en regiones intergénicas de *T. cruzi* y en algunos casos aporta las secuencias necesarias para poliadenilación o trans-splicing dependiendo de su ubicación con respecto al gen (Vázquez y col., 2000). La presencia del SIRE en el clon PHGST#5 sugeriría la existencia de un marco abierto de lectura en la región intermedia no secuenciada de este clon o la continuación con otro gen hacia el extremo 3' del SIRE en el genoma del parásito.

Para identificar los clones obtenidos en el rastreo inmunológico que difieran del clon PHGST#5, se realizó una amplificación de los treinta y ocho clones por PCR con el oligonucleótido 10R, específico de la familia Tc13, y el oligonucleótido localizado en la región 5' del vector, BTF (Sang y Tothompson, 1994) (Fig. B-5). En treinta y tres de los treinta y ocho clones se obtuvo un producto de amplificación de 130 pb, coincidente con lo obtenido con el clon PHGST#5. Con los cinco clones restantes (PHGST#3, #24, #33, #36 y #37) se amplificó un fragmento de ADN de 350 pb, indicando una extensión de los mismos de 220 pb hacia el extremo 5' con respecto a la mayoría (resultado no mostrado). Estos resultados demuestran que todos los clones reconocidos por el suero anti-GSTs pertenecen a la familia Tc13; sin embargo, la secuenciación completa de los mismos determinará si se trata de diferentes miembros que conservan la localización del sitio EcoRI o de uno único altamente representado en la genoteca. Los resultados obtenidos por la PCR fueron confirmados mediante la hibridación positiva de los distintos clones con la porción 5' del clon PHGST#5 proveniente del corte con la enzima SacI, fragmento PHGST#5 SacI, y en el caso de los clones PHGST#1, #7 y #15 también por

secuenciación del ADN a partir del extremo 5' (resultado no mostrado).

- La familia Tc13 está compuesta por varios miembros que difieren en el número de repeticiones y en la presencia de la secuencia consenso para anclaje por GPI:

El fragmento PHGST#5 SacI fue utilizado para hibridar una genoteca del clon CL Brener de *T. cruzi* construida en cósmidos con el objeto de encontrar la porción 5' del o los genes *Tc13*. Esta sonda hibridó 90 cósmidos en total y siete de los doce con hibridación más intensa demostraron pertenecer al cromosoma III (Hanke y col., 1998). La secuenciación parcial del ADN de tres cósmidos del cromosoma III (32f14, 12e10 y 25h23) con los oligos específicos de PHGST#5 determinó que el gen contenido en los mismos no codificaba para el gen contenido en este clon, sino para otro miembro de la familia Tc13 que fue denominado *Tc13 CL*.

La secuencia de *Tc13 CL* coincidió con un marco abierto de lectura obtenido como producto de la secuenciación del cromosoma III como parte del Proyecto Genoma de *T. cruzi* (Dr. Bojrn Andersson, Uppsala, Suecia, comunicación personal). El gen *TC13 CL* mostró dos sitios EcoRI separados por 171 bases, lo cual concuerda con los dos tipos de clones obtenidos en el rastreo con el suero anti-GSTsj con una diferencia de aproximadamente 220 pb en el extremo 5' (ver sección anterior). Por otro lado, una secuencia de 37 pb proveniente de un fragmento de 300 pb amplificado a partir de la genoteca de *T. cruzi* cepa Tulahuén con los oligonucleótidos BTF-10R y BTR-10R presentó identidad con la

secuencia de *Tc13CL* contenida entre los dos sitios *EcoRI* (resultados no mostrados). En conjunto, estas observaciones indicarían que los sitios *EcoRI* de la porción 5' estarían conservados en estos antígenos de la familia Tc13.

El antígeno Tc13 codificado por el clon PHGST#5, a partir de ahora denominado simplemente PHGST#5, posee 796 aminoácidos y un peso molecular estimado de 84 kDa. A partir de la posición 475 presenta 45 repeticiones de cinco aminoácidos, EPKSA, características de esta familia de antígenos. La figura B-6 b muestra la variabilidad de este motivo en este antígeno y en otros miembros de esta misma familia.

Hasta el momento habían sido descriptos tres miembros de la familia Tc13: Tc13.N5, Tc13.1 y Tc13, todos ellos obtenidos a partir de la cepa CA-I y con secuencias incompletas en la porción N-terminal, como ocurrió con PHGST#5 (Campetella y col., 1992). Por lo tanto, la única secuencia completa de esta familia corresponde a Tc13 CL.

De acuerdo a la secuencia aminoacídica los antígenos Tc13 pueden dividirse en dos categorías: por un lado, Tc13 CL y Tc13.N5 que poseen un único motivo EPKSA y un posible sitio de adición de GPI en el extremo C-terminal (Tc13CL presenta también el péptido señal en el extremo N-terminal) (Gerber y col., 1992) con un 80.9 % de homología entre sí; y por otro, PHGST#5, Tc13.1 y Tc13 que poseen múltiples repeticiones EPKSA y no poseen sitio de adición de GPI (la secuencia hidrofóbica C-terminal es muy corta). De este último grupo los más relacionados son Tc13.1 y Tc13 con un 93.5 % de homología en las regiones que no contienen repeticiones. Si bien PHGST#5 pertenece al segundo grupo, este antígeno posee

mayor homología con Tc13CL (84.9 %), que con Tc13.1 y Tc13, con los cuales presenta un 76 % y un 73.1 %, respectivamente sin tener en cuenta las repeticiones (Fig. B-6 a).

A lo largo de la secuencia de Tc13 CL se pueden observar tres motivos de neuroaminidasa bacterianas característicos de la superfamilia (SXXDXGXTW), los dos primeros completos y el tercero con sólo tres aminoácidos conservados. El resto de los antígenos presentan los motivos en las zonas alineadas correspondientes. Todos los integrantes de la familia Tc13 presentaron también el motivo característico de la superfamilia VTVXNVFLYNR justo antes del comienzo de las repeticiones (Cross y Takle, 1993) (Fig. B-6 a).

Un hecho llamativo es que en los tres representantes del segundo grupo luego del codón de terminación y en el mismo marco de lectura se encuentra codificada la secuencia consenso para clivaje y adición del GPI, conteniendo un segundo codón de terminación coincidente con Tc13CL y Tc13.N5 (Fig. B-6 c). Si bien la falta de la secuencia de adición de GPI podría determinar que estos antígenos no se localicen en la superficie del parásito, es interesante mencionar que en *Toxoplasma gondii* se vio que la falta del ancla de GPI por terminación anticipada de un antígeno de superficie no evitó la aparición del mismo en la superficie celular (Keddes y col., 2000). De todos modos, debido a que no se conocen las secuencias completas, siempre es posible que las secuencias de Tc13 obtenidas correspondan sólo a pseudogenes, como ya ha sido descrito en la superfamilia (Takle y col., 1992). Sin embargo, cabe destacar que todas las secuencias de ADN de Tc13 descritas poseen una zona de poliPy cercana al codón de terminación, probablemente involucrada en el procesamiento del RNA (Fig. B-5)

(Matthews y col., 1994) y que la secuencia genómica de Tc13 CL presenta todas las características de un gen que se transcribe a ARNm: posee codones de terminación en los tres marcos de lectura antes del ATG de iniciación, contiene una región de poliPy y dos posibles sitio de adición del miniexón 182, 151 y 172 bases, respectivamente antes de este codón y posee una zona de poliPy 91 bases después del codón de terminación (Huang y Van der Ploeg, 1991; Matthews y col., 1994).

- El antígeno PHGST#5 fue expresado como proteína de fusión en un sistema heterólogo:

Con el objetivo de confirmar la reactividad específica del suero anti-GSTsj contra el antígeno PHGST#5, se indujo la expresión proteica del mismo con IPTG y el sonicado de las bacterias recombinantes fue utilizado en experimentos de “western blot” revelando con este anti-suero. El suero anti-GSTsj reconoció una proteína de alto peso molecular sólo en el sonicado de PHGST#5 inducido y no en el sonicado de una bacteria conteniendo el plásmido pBluescript sin inserto e inducido de igual manera (Fig. B-7 a). Este resultado fue justamente el esperado, ya que el tamaño de la proteína recombinante sería alrededor de 200 kDa, correspondiendo un 42 % del mismo a la proteína del parásito y el resto a la enzima β -galactosidasa codificada por el plásmido. El suero anti-GSTsj también reconoció una proteína de 35 kDa en ambos sonicados. Si bien la única GST de *E. coli* purificada hasta el momento tiene el peso molecular convencional de 22 kDa (Iizuka y col., 1989) se han purificado en otras bacterias enzimas de la

misma familia cuyo peso molecular está entre 35 y 37 kDa (La Roche y Leisinger, 1990; Bader y Leisinger, 1994). Como control positivo del ensayo se utilizó un sonicado de la bacteria recombinante conteniendo al plásmido pGEX, el cual expresa la GSTsj (Fig. B-7 a).

Con el objeto de obtener en forma pura el antígeno PHGST#5 para una posterior caracterización, el fragmento EcoRI-SacI de pBluescript-PHGST#5 (Fig. B-5) fue sub-clonado en el plásmido de expresión pMalp2X. Este plásmido fue modificado en su extremo 5' con un adaptador para permitir la expresión del inserto en el marco de lectura correcto. Por lo tanto, el antígeno PHGST#5 fue expresado como proteína de fusión a la proteína ligadora de maltosa (MBP, "maltose binding protein"). La inducción de la bacteria recombinante con IPTG 1mM durante 3 hs produjo una proteína de fusión de 130 kDa contenida en la fracción soluble (Fig. B-7 b). La proteína de fusión MBP-PHGST#5 fue purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de amilosa (Fig. B-7 b).

- Los genes que codifican para la familia Tc13 se localizan principalmente en el cromosoma III y en su homólogo de 1020 kpb:

Con el objeto de determinar la localización cromosómica de los genes que codifican para los antígenos de la familia Tc13 se separaron los cromosomas de *T. cruzi* por electroforesis en campo pulsado (PFGE) y se transfirieron a membranas de nylon.

Los cromosomas del clon CL Brener de *T. cruzi* fueron separados en dos condiciones de corrida diferentes que

favorecieron la separación de cromosomas de bajo y alto peso molecular, respectivamente (Fig. B-8 a y b) (Búa y col., 1999). En el "cromoblot" que separó los cromosomas de bajo peso molecular, la sonda PHGST#5 *SacI* hibridó con un cromosoma de 665 kpb, correspondiente al cromosoma III (Fig. B-8 a). Cuando se favoreció la separación de los cromosomas de un peso molecular mayor, PHGST#5 hibridó principalmente el cromosoma III y su homólogo de 1020 kpb (Hanke y col., 1998), sin embargo, también fue capaz de hibridar en otros cromosomas (Fig. B-8 b). En ambos "cromoblots" se obtuvo señal en la zona de compresión (Fig. B-8 a y b).

Cuando se realizaron los ensayos con "cromoblots" provenientes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, a partir de la cual fue obtenido el antígeno PHGST#5, éste hibridó con mayor intensidad al cromosoma de 1020 kpb homólogo del cromosoma III, presentando además hibridación con cromosomas otros tamaños (Fig. A-8 c).

- La hibridización de cromoblots realizados a diferentes tiempos de cultivo con PHGST#5 sugiere que el cariotipo de *T. cruzi* permanece estable a lo largo del ciclo celular:

Por análisis de PFGE se observó en *T. brucei* la pérdida o ganancia de cromosomas con respecto a los stocks parentales cuando se aislaron clones provenientes de la co-transmisión de dos stocks de parásitos en moscas Tse-tse (Tait y col., 1996). Teniendo en cuenta estos antecedentes y que en *T. cruzi* no se realizaron estudios de este tipo, se quiso determinar si a lo largo del ciclo de

vida de este parásito ocurrían rearrreglos cromosómicos. Para llevar adelante este objetivo se hibridaron con PHGST#5 "cromoblots" realizados a partir de epimastigotes tomados a diferentes tiempos de cultivos asincrónicos (Fig. B-8 c) y sincrónicos (Fig. B-8 d).

Los cultivos asincrónicos poseen parásitos en distinta fase del ciclo celular y por lo tanto coexisten cromosomas sin replicar (fase G1), replicados parcialmente (fase S) y ya replicados (fase G2). Si el cariotipo no es estable la localización de los cromosomas podría variar de acuerdo a la etapa del ciclo celular que se utilice para el preparado, ya que en fase exponencial el 70 % del cultivo está en proliferación y en fase estacionaria sólo el 10 %. La sincronización de la replicación del ADN de *T. cruzi* con hidroxilurea permite que la población celular arrestada en G1 entre como una cohorte en fase S, alcanzando el pico de replicación a las 6 hs y entrando en G2 a las 18 hs (Galanti y col., 1994). Sincronizando el cultivo de parásitos con esta técnica se podría estudiar en detalle qué sucede en determinadas fases del ciclo celular.

El patrón de cromosomas separados por PFGE hibridados por PHGST#5 no varió a lo largo del tiempo en días en parásitos no sincronizados, ni tampoco en función del tiempo en horas en los cultivos sincronizados, demostrando una aparente estabilidad del cariotipo del *T. cruzi* en el ciclo celular al menos para el cromosoma III y su homólogo (Fig. B-8 c y d). Tampoco se observaron cambios notorios en el tamaño de los cromosomas de los parásitos sincronizados a lo largo del ciclo celular ya sea por tinción con bromuro de etidio ni mediante la hibridación con diferentes sondas localizadas en cromosomas de distinto tamaño (Dra. J. Búa, comunicación personal).

200 pb

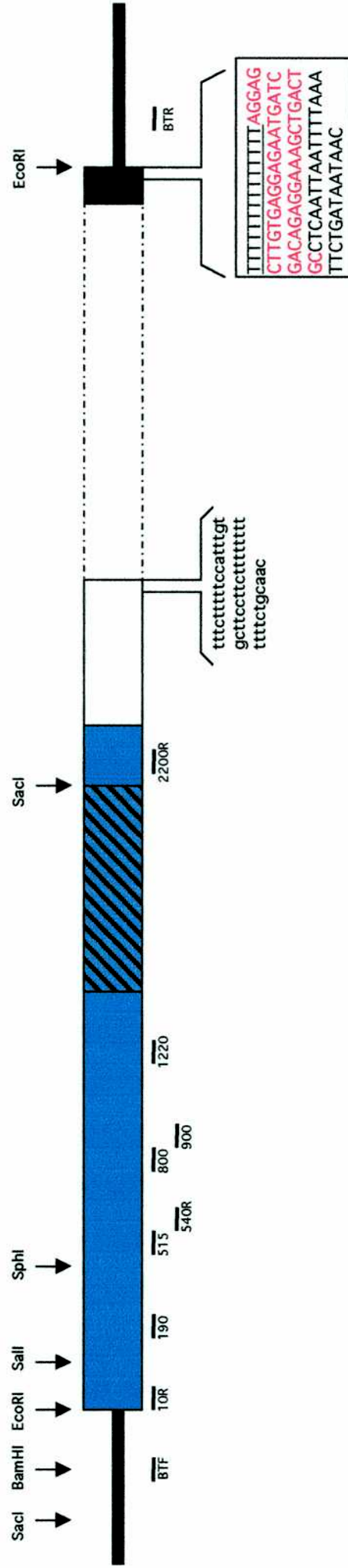


Figura B-5: Esquema del clon PHGST#5 obtenido en el rastreo de una biblioteca genómica de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* con suero anti-GSTsj:

El inserto se encuentra clonado en el plásmido pBluescript en los sitios EcoRI. La zona celeste corresponde a la región codificante para el antígeno PHGST#5. La porción rayada corresponde a las repeticiones típicas de la familia Tc13. El recuadro blanco indica la región 3' UTR de ese gen y en la amplificación se muestra la secuencia de polipéptido. La línea punteada marca la zona de este clon que no fue secuenciada. El recuadro negro muestra la región 3' secuenciada y en la amplificación se muestra la porción que presentó homología con secuencias SIRE (la secuencia subrayada corresponde al sitio de inserción y la secuencia en rojo representa la secuencia consenso 5' del SIRE). Por encima del recuadro se indican algunos sitios de enzimas de restricción. Debajo del recuadro se muestran los oligonucleótidos utilizados para la secuencia del clon. Los oligos específicos de este clon llevan el número correspondiente a la localización en bases a partir del extremo 5', los que poseen la letra R tienen dirección 3' → 5' y el resto 5' → 3'. Los oligos BTR y BTF fueron obtenidos a partir de la bibliografía.

Figura B-6: Alineamiento de PHGST#5 con los miembros conocidos de la familia Tc13 de la superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes

Alineamiento de PHGST#5 con los miembros conocidos de la familia Tc13 de la superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes:

a) Alineamiento aminoacídico de PHGST#5 con diferentes miembros de la familia Tc13: Tc13 CL (clon CL Brener), PHGST#5 (cepa Tulahuén), Tc13.N5, Tc13.1 y Tc13 (cepa CA-I). La única secuencia completa corresponde a Tc13 CL, estando el resto incompletas en su extremo N-terminal. Las barras negras arriba de la secuencia indican los motivos de neuraminidasa. La secuencia recuadrada en negro es el motivo típico de la superfamilia de antígenos de superficie. El recuadro en azul indica el péptido señal en Tc13 CL. Los aminoácidos subrayados en las extensiones C-terminales de Tc13 CL y Tc13.N5 corresponderían al probable sitio de clivaje para la adición de GPI. Los aminoácidos ácidos (DE) se muestran en azul, los básicos (RK) en negro, los hidrofóbicos (AVFPMILW) en rojo y los cargados (STYHCNGQ) en verde. El “*” debajo del alineamiento significa que existen aminoácidos idénticos en todas las secuencias, “:” indica substituciones conservativas y “.” substituciones semi-conservativas.

b) Esquema de las repeticiones típicas de la familia Tc13 para los distintos miembros mostrados en a).

c) Alineamiento de las porciones C-terminales. En PHGST#5, Tc13.1 y Tc13 la porción alineada corresponde a la traducción en marco de lectura luego del codón de terminación indicado con un punto al principio de la secuencia.

[illegible]

b)

PHGST#5 **E**_(G4) **P** **K**_(E3/Y2) **S/P** **A**_(T4)

Tc13.1 **E**_(V10) **P** **K** **S** **A**_(G8/P1)

Tc13 **E** **P** **K** **S**_(A8) **A**_(G8/V1)

c)

Tc13 CL TFSSSLNSS---QWDNSVAGTVRERGLLPPLLLLLGLWGF~~AAA~~
 PHGST#5 .TLSSSLS-SL---QWDNSVAGTMR~~ESGLLPPLLLLLGLWGF~~AAA
 Tc13.N5 TLSSSLNSS---QWDNSVAGTMRGSLLPPLLLLLGLWGF~~AAA~~
 Tc13.1 TLSSSLKFVA~~AESQRND~~VAGTMR~~ESGLLPPL~~LLGLWGF~~AAA~~
 Tc13 TFSSSLNLP---QRDDGVAGTMR~~ESGLLPPLLLLLGLWGF~~AAA
 *

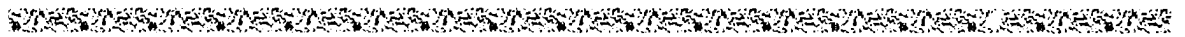


Figura B-7: Expresión del antígeno PHGST#5 en sistemas heterólogos

Expresión del antígeno PHGST#5 en sistemas heterólogos:

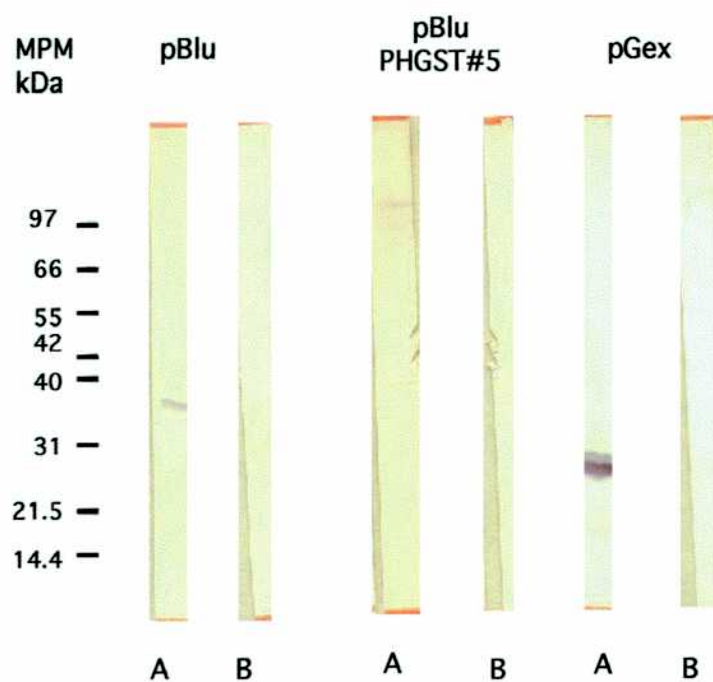
a) Reconocimiento por el suero anti-GSTsj de PHGST#5 recombinante expresado por el plásmido pBluescript:

Los sonicados obtenidos luego de la inducción con IPTG de las bacterias conteniendo pBluescript (pBlu), pBluescript-PHGST#5 (pBlu-PHGST#5) y pGex se corrieron en un gel de poliacrilamida 12% con SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con: A- Suero anti-GSTsj y B- suero normal de conejo.

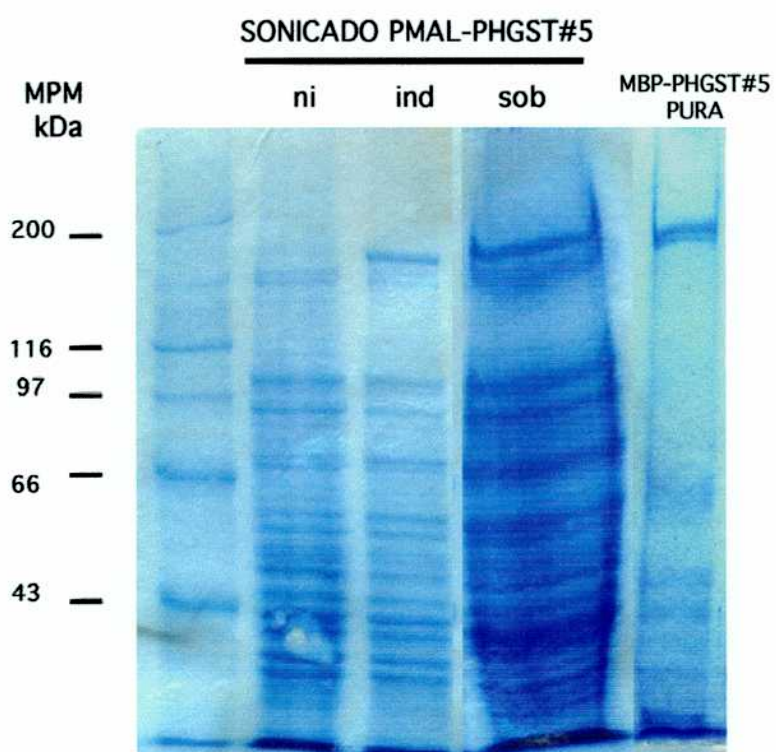
b) Expresión de PHGST#5 en el plásmido pMal y obtención de la proteína recombinante MBP-PHGST#5:

Los sonicados de bacterias recombinantes conteniendo el plásmido pMal-PHGST#5 no inducidas (ni), inducidas con 1mM de IPTG (ind) y el sobrenadante del sonicado inducido (sob) fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida 7.5 % con SDS y teñidos con coomassie R-250. La proteína recombinante MBP-PHGST#5 fue purificada a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad con una columna de amilosa (MBP-PHGST#5).

a)



b)



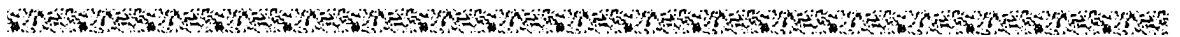


Figura B-8: Localización cromosómica de PHGST#5

Localización cromosómica de PHGST#5:

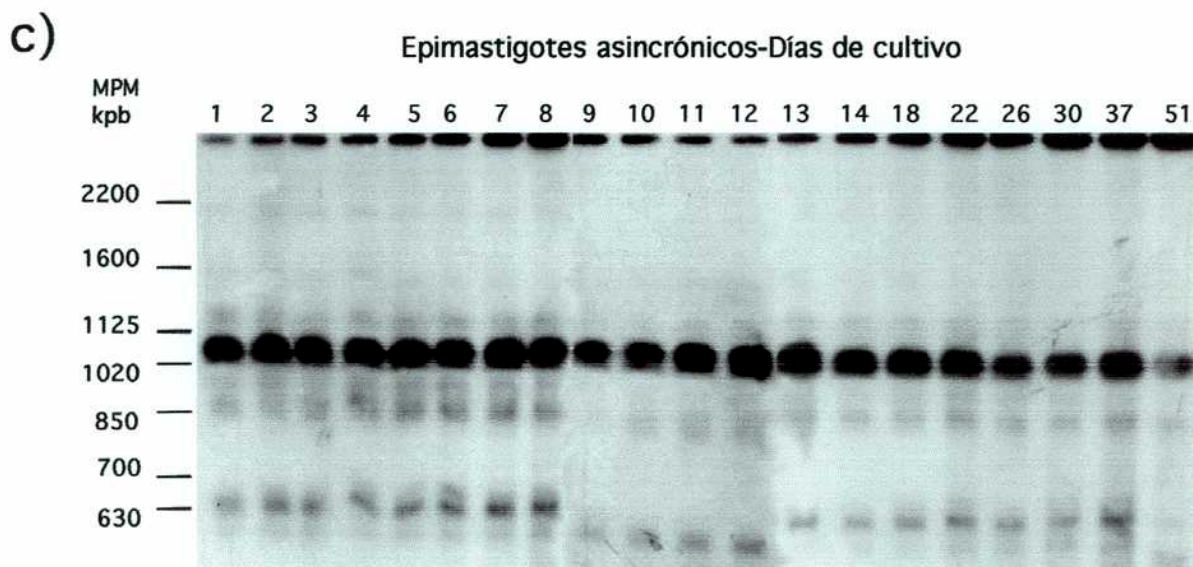
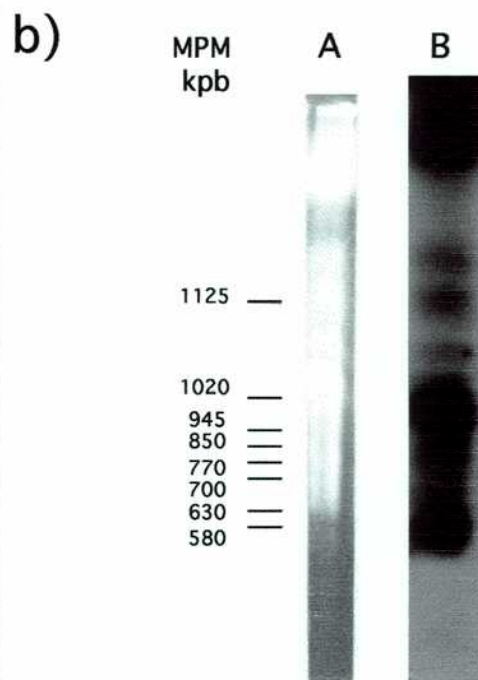
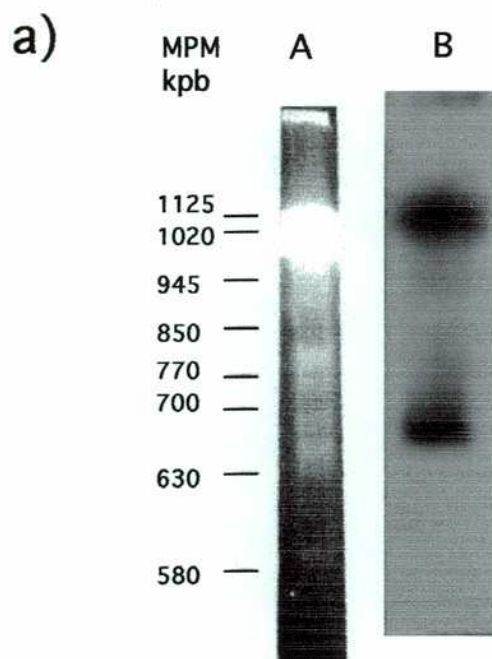
El fragmento PHGST#5 SacI fue utilizada como sonda para hibridizar cromoblots conteniendo:

a) Cromosomas de bajo peso molecular de *T. cruzi* clon CL Brener (A- separación de los cromosomas en gel de agarosa y visualización con bromuro de etidio, B- hibridación con PHGST#5).

b) Cromosomas de alto peso molecular de *T. cruzi* clon CL Brener (A- separación de los cromosomas en gel de agarosa y visualización con bromuro de etidio, B- hibridación con PHGST#5).

c) Cromosomas de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén cosechados en distintos días de un cultivo asincrónico e hibridados con la sonda PHGST#5.

d) cromosomas de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén sincronizados con hidroxurea cosechados cada 30 minutos a lo largo de 12 hs. de cultivo e hibridados con la sonda PHGST#5.



- El antígeno PHGST#5 fue seleccionado para realizar ensayos de inmunoprotección en ratones de la cepa BALB/c:

Si bien el antígeno PHGST#5 fue obtenido en un rastreo de una genoteca de *T. cruzi* con el suero anti-GSTs sugiriendo la presencia de epitopes compartidos con esta enzima, esta proteína no posee homología de secuencia con GSTs. Sin embargo, presenta ciertas características que justifican su evaluación en ensayos de inmunoprotección experimental a fin de definir un nuevo blanco para el control de la transmisión de la infección por *T. cruzi*:

- 1) PHGST#5 es un antígeno de superficie del estadio tripomastigote, presente en el hospedero mamífero.
- 2) La familia Tc13 (grupo 4), a la cual pertenece PHGST#5, no ha sido aun caracterizada en cuanto a su funcionalidad.
- 3) Algunos antígenos pertenecientes a otras familias de la superfamilia de antígenos de superficie presentan funciones reguladoras de la respuesta inmune y poseen epitopes que actúan como blanco de una respuesta celular protectora contra la infección por *T. cruzi* mediada por linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ secretores de IFN- γ (Wizel y col., 1997; Kahn y Wleklinski, 1997; Miller y Kahn, 2001).
- 4) La inmunización con algunos de estos antígenos, como la porción catalítica de la TS (grupo 1) y TSA-1 (grupo 2) reduce la infección por el parásito en modelos experimentales (Costa y col., 1998; Wizel y col., 1998b; Pereira-Chiocola, 1999).

- El antígeno PHGST#5 clonado en el vector para vacuna de ADN pcDNA3.1 se expresó en sistemas eucariotas *in vitro* e *in vivo*:

Con el objetivo de estudiar la respuesta inmune y protectora producida en ratones mediante la inmunización plasmídica con PHGST#5, el fragmento PHGST#5 *SacI* fue clonado en el vector para vacuna de ADN pcDNA 3.1 colocando en su extremo 5' un adaptador conteniendo el codón de iniciación y la secuencia de Kozac (Kozac, 1997) a fin de permitir la expresión del mismo en un sistema eucariota.

La expresión *in vitro* de PHGST#5 fue evaluada mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) de células COS-7 transfectadas con el plásmido recombinante con un suero específico para la familia Tc13 (cedido gentilmente por el Dr. O. Campetella, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín). Se transfectaron monocapas de células COS-7 con pcDNA-PHGST#5, pcDNA sin inserto como control negativo o el plásmido pcM β como control positivo de la transfección. Luego de 48 hs las células fueron fijadas con metanol, realizando posteriormente la reacción de IFI con suero normal de conejo o suero anti-Tc13. Sólo se observaron células positivas con el suero anti-Tc13 sobre las células transfectadas con pcDNA-PHGST#5 (Fig. B-9 c), indicando la expresión del antígeno en las mismas, ya que este antisuero no reaccionó sobre las células transfectadas con el plásmido pcDNA sin inserto (Fig. B-9 b). El suero normal de conejo no reaccionó sobre las células transfectadas con pcDNA (no mostrado) o pcDNA-PHGST#5 (Fig. B-9 a). El control de transfección realizado con pcM β fue revelado positivamente con un anticuerpo monoclonal anti- β -galactosidasa (Fig. B-9 d).

La expresión de PHGST#5 también fue evaluada *in vivo*, inoculando ratones hembras de la cepa BALB/c por vía

intramuscular con pcDNA sin inserto o pcDNA-PHGST#5. Sobre la base de las observaciones realizadas por Forg y col. en relación a la expresión *in vivo* de antígenos clonados en el vector pcDNA (Forg y col., 1998), los animales se sacrificaron luego de 10 días de la inoculación y la expresión de PHGST#5 fue estudiada mediante IFI con el suero anti-Tc13 sobre los cortes del músculo inoculado. Los cortes provenientes de los músculos inoculados con pcDNA-PHGST#5 presentaron células positivas cuando se reveló con el suero anti-Tc13, siendo la fluorescencia citoplasmática con una cierta acumulación en la membrana celular (Fig. B-9 f y g). La expresión citoplasmática de PHGST#5 fue lo esperado, ya que este antígeno carece de la porción N-terminal y por lo tanto del péptido señal; mientras que, la fluorescencia observada en la membrana podría ser explicada por una acumulación de la proteína foránea del lado interno de la membrana plasmática. Los músculos inoculados con pcDNA sin inserto no presentaron células positivas cuando fueron revelados con el suero anti-Tc13 (Fig. B-9 e). Como control negativo se utilizó un suero normal de conejo, el cual no mostró fluorescencia en ninguno de los casos (resultado no mostrado).

- La Inmunización plasmídica con PHGST#5 no desencadenó una respuesta específica de anticuerpos:

Luego de confirmar la expresión de PHGST#5 en sistemas eucariotas *in vitro* e *in vivo*, se inmunizaron ratones hembras de la cepa BALB/c con pcDNA-PHGST#5 o pcDNA sin inserto con el objeto de estudiar la respuesta inmune generada por la

inmunización plasmídica y posteriormente realizar ensayos de inmunoprotección. El protocolo de inmunización utilizado fue seleccionado en base a los antecedentes publicados con respecto a inmunización plasmídica en modelo ratón para la infección por *T. cruzi* (Wizel y col., 1998b; Costa y col., 1998).

Los animales recibieron 5 dosis intramusculares de 50 µg/dosis/ratón de pcDNA o pcDNA-PHGST#5, se sangraron 12 días después de cada dosis y la respuesta específica de anticuerpos fue evaluada por ELISA sobre lisados de tripomastigotes. Los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5 no presentaron anticuerpos específicos contra el parásito luego de cinco dosis. El valor promedio de densidad óptica obtenido con los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5 fue 0.07 +/- 0.01 mientras que los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA presentaron un valor de 0.09 +/- 0.01 (Fig. B-10 a). Los sueros de ratones normales y crónicos utilizados como control negativo y positivo, respectivamente presentaron valores dentro del rango esperado (Fig. B-10 a). La falta de una respuesta humoral específica de estos ratones fue confirmada mediante IFI sobre tripomastigotes y utilizando PHGST#5 recombinante como antígeno en ensayos de ELISA y “western blot” (resultados no mostrados).

La inducción de anticuerpos específicos por la inoculación plasmídica de miembros de la superfamilia de antígenos de superficie demostró tener relación con la cepa de ratón utilizada en los experimentos y con la presencia o no de las repeticiones C-terminales en la proteína expresada (Wizel y col., 1998; Pereira-Chiocola y col., 1999). La inoculación con vacuna de ADN codificando para el antígeno del grupo 2 TSA-1 con y sin las

El fragmento de PHGST#5 inoculado codifica para 45 repeticiones EPKSA, dando origen a una porción C-terminal de la proteína muy hidrofílica. Si bien estas repeticiones generan altos títulos de anticuerpos en otros sistemas (Burns y col., 1992), no presentó estas características cuando la inmunización se llevó a cabo con el ADN codificante en ratones hembras de la cepa BALB/c.

Para estudiar la respuesta celular específica generada por los ratones sometidos a inmunización plasmídica, los mismos fueron inoculados en la almohadilla plantar con la proteína recombinante MBP-PHGST#5. Dicho antígeno fue electroeluido para evitar respuestas generadas por proteínas bacterianas contaminantes, ya que los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5 evaluados por ensayos de "western blot" presentaron reactividad contra una proteína de *E. coli* (resultado no mostrado). El índice de induración de la pata inoculada fue calculado a las 24 y a las 48 hs post-inoculación. El índice de induración de los animales inmunizados con pcDNA-PHGST#5 fue un 9.1 % mayor al de los ratones inmunizados con pcDNA sin inserto tanto a las 24 como a las 48 hs (Fig. B-10 b). Si bien existe una leve diferencia entre el

-Los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5 presentaron una reducción significativa de la parasitemia luego del desafío con formas infectantes del parásito:

Los grupos de ratones inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 y un grupo control sin inmunizar se desafiaron con tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén. Las parasitemias fueron positivas a partir del día 7 post-infección en todos los grupos. Hasta el día 25 post-infección los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5 presentaron parasitemias significativamente menores que los ratones sin inmunizar; mientras que, hasta el día 17 post-infección la disminución fue significativa con respecto al grupo inmunizado con pcDNA (Fig. B-11). El grupo control sin inmunizar presentó el pico de parasitemia en el día 17 post-infección, mientras que los grupos inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 mostraron el pico entre los días 28 y 32 post-infección, no observándose en este momento diferencias significativas entre los tres grupos. A partir del día 34 post-infección la disminución de la parasitemia en el grupo inoculado con pcDNA es significativa con respecto al grupo sin inmunizar

(Fig. B-11). La reducción de la parasitemia en el grupo inmunizado con pcDNA en algunos puntos de la curva puede explicarse por los efectos inmunoestimuladores atribuidos a los motivos CpG no metilados presentes en las secuencias de ADN plasmídico (Tokunaga y col., 1984). Los motivos CpG favorecen la secreción de citoquinas de tipo Th1 (Klinman y col., 1996; Chu y col., 1997), las cuáles son muy importantes para la infección por *T. cruzi* (Zhang y Tarleton, 1996; Hoft y col., 2000; Corral y Petray, 2000).

La sobrevida en los grupos inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 fue del 100%, mientras que fue del 80% en el grupo control sin inmunizar (muere 1/5 en el día 17 post-infección). Sin embargo, para evaluar la sobrevida producida por la inoculación plasmídica de PHGST#5, en experimentos posteriores será necesario aumentar el número de animales y desafiar con mayor número de parásitos, de forma tal de lograr una mayor mortalidad en el grupo control.

- La inmunización plasmídica con PHGST#5 produjo una disminución de la inflamación y parasitismo tisular en miocardio y músculo esquelético:

Los animales que sobrevivieron a la etapa aguda de la infección fueron sacrificados a las 14 semanas post-infección con el objeto de realizar un estudio patológico de miocardio, músculo esquelético, hígado y bazo, dado que en estos órganos se suele alojar la forma amastigote del parásito.

El análisis histológico de los corazones mostró que el 75% y el 100% de los ratones de los grupos controles sin inmunizar e inmunizados con pcDNA, respectivamente, presentaron lesiones de

grado leve y moderado. Por el contrario, sólo el 20% de los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5 presentó lesiones de grado leve (Tabla 1).

El análisis del parasitismo tisular de las células de corazón mostró que al menos el 80% de los ratones de los grupos controles tuvieron nidos de amastigotes, a diferencia del grupo inmunizado con pcDNA-PHGST#5, en el cual sólo el 20% de los animales presentó parásitos en el miocardio (Tabla 2).

El estudio de la inflamación y del parasitismo tisular del músculo esquelético, principal órgano blanco de la cepa Tulahuén (Pizzi y Prager, 1952; Taliaferro y Pizzi, 1955), también mostró una disminución de la infección tisular y de la patología provocados por *T. cruzi*.

Es importante destacar la observación de un mayor grado de lesiones tisulares en músculo esquelético en los ratones inmunizados con pcDNA con respecto al grupo control, ya que el 50% del grupo control sin inmunizar presentó inflamación leve y el 25% moderada, mientras que el 80% de los ratones inmunizados con pcDNA presentaron inflamación moderada (Tabla 1). Este resultado fue llamativo teniendo en cuenta la disminución significativa de la parasitemia durante la fase aguda en los ratones inmunizados con pcDNA (Fig. B-11). Al analizar el parasitismo tisular en músculo esquelético, también se observó este efecto, ya que el 60% de los ratones inmunizados con pcDNA presentó nidos de amastigotes en comparación con un 50% en el grupo control y un 40% en el grupo inmunizado con pcDNA-PHGST#5 (Tabla 2).

Todos los animales mostraron lesiones en el hígado y el bazo, pero mientras que en el grupo inmunizado con pcDNA-PHGST#5

estas lesiones fueron de grado leve, en los grupos sin inmunizar e inmunizado con pcDNA, el 50% y el 40% de los ratones presentaron lesiones de intensidad moderada, respectivamente (Tabla 1). Con respecto al parasitismo en éstos órganos, sólo el 20% del grupo inmunizado con pcDNA presentó nidos de amastigotes (Tabla 2).

En conclusión, el análisis conjunto de la reacción inflamatoria y del parasitismo tisular determinó una disminución de la patología e infección por el parásito en miocardio, músculo esquelético, hígado y bazo en el grupo de ratones que fue sometido a la inmunización plasmídica con PHGST#5. La exacerbación de las lesiones y el parasitismo tisular en los órganos estudiados en el grupo inmunizado con pcDNA en comparación con el grupo sin inmunizar no condice con las curvas de parasitemia observadas para ambos grupos en la fase aguda de la infección (Fig. B-11), si bien aun resta evaluar si esto podría deberse a algún efecto tóxico del lote de pcDNA inoculado.

TABLA 1: Estudio histopatológico en diferentes órganos de ratones inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 infectados crónicamente por *T. cruzi*:

INMUNIZACION	LESION TISULAR ^a	MIOCARDIO	MUSCULO ESQUELETICO	HIGADO/BAZO
SIN INMUNIZAR	ausente	1/4 (25%) ^b	1/4 (25%)	0/4 (0%)
	leve	2/4 (50%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)
	moderada	1/4 (25%)	1/4 (25%)	2/4 (50%)
pcDNA	ausente	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
	leve	3/5 (60%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	moderada	2/5 (40%)	4/5 (80%)	2/5 (40%)
pcDNA-PHGST#5	ausente	4/5 (80%)	0/5 (0%)	0/4 (0/)
	leve	1/5 (20%)	5/5 (100%)	4/4 (100%)
	moderada	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/4 (0%)

^a, Grado de las lesiones tisulares: ausente: ausencia de infiltrado inflamatorio; leve: escasos focos de infiltración mononuclear, moderado: infiltrados inflamatorios confluentes.

^b, n° de ratones con o sin lesiones histológicas /n° ratones totales (% ratones con o sin lesiones).

TABLA 2: Parasitismo tisular en diferentes órganos de ratones inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 infectados crónicamente por *T. cruzi*:

INMUNIZACION	PARASITISMO TISULAR ^a	MIOCARDIO	MUSCULO ESQUELETICO	HIGADO/BAZO
SIN INMUNIZAR	ausente	0/4 (0%) ^b	2/4 (50%)	4/4 (100%)
	leve	4/4 (100%)	2/4 (50%)	0/4 (0%)
	moderado	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
pcDNA	ausente	1/5 (20%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)
	leve	4/5 (80%)	3/5 (60%)	1/5 (20%)
	moderado	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
pcDNA-PHGST#5	ausente	4/5 (80%)	3/5 (60%)	4/4 (100%)
	leve	1/5 (20%)	2/5 (40%)	0/4 (0%)
	moderado	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/4 (0%)

^a, Grado de parasitismo tisular: ausente: no tiene nidos de amastigotes, leve: de 1 a 3 nidos de amastigotes, moderado: de 3 a 6 nidos de amastigotes.

^b, n° de ratones con o sin parasitismo tisular /n° ratones totales (% ratones con o sin parasitismo tisular)

La producción de anticuerpos específicos por los ratones

La producción de anticuerpos específicos por los ratones inmunizados fue evaluada mediante ELISA utilizando como antígenos MBP-PHGST#5, MBP o lisados de tripomastigotes. Cuando se utilizó MBP-PHGST#5 y MBP como antígenos se realizó una competencia de los sueros con exceso de MBP con el objeto de disminuir la reactividad de los mismos contra esta porción de la proteína recombinante y detectar sólo los anticuerpos específicos contra PHGST#5. Los ratones inmunizados con la proteína MBP-PHGST#5 mostraron reactividad tanto contra MBP-PHGST#5 como contra tripomastigotes, mientras que no reaccionaron con MBP. Los sueros de los ratones inmunizados con MBP presentaron una muy alta reactividad contra MBP, mientras que contra MBP-PHGST#5 la reactividad fue un 54% menor que la presentada por los sueros de los ratones inmunizados con la proteína de fusión. Estos sueros no reaccionaron contra tripomastigotes (Fig. B-12 a).

Como controles positivos se utilizaron un suero de conejo anti-Tc13 y sueros de ratones crónicos, los cuáles reaccionaron positivamente con MBP-PHGST#5 y con tripomastigotes pero no contra MBP. Los controles negativos tanto de conejo como de ratón no fueron reactivos contra ninguno de los antígenos (Fig. B-12 a).

Para investigar la inmunidad mediada por células producida por los ratones inmunizados con la proteína recombinante, los ratones fueron inoculados en la almohadilla plantar con lisados de tripomastigotes sanguíneos. Los ratones inoculados con MBP-PHGST#5 mostraron hipersensibilidad retardada a la inoculación del parásito por vía intradérmica, presentando un índice de induración significativamente más alto que los inmunizados con MBP a las 24 hs post-inoculación. A las 48 hs ya no hubo diferencias entre ambos grupos (Fig. B-12 b).

- La inmunización con MBP-PHGST#5 produjo una disminución de la parasitemia luego del desafío con tripomastigotes metacíclicos con respecto al grupo inmunizado con MBP:

Con el fin de evaluar la capacidad inmunoprotectora del antígeno PHGST#5 recombinante, los ratones inmunizados con MBP-PHGST#5, MBP y un grupo control sin inmunizar fueron desafiados con tripomastigotes metacíclicos de acuerdo a los protocolos puestos a punto en nuestro laboratorio (Ruiz y col., 1986; Esteva y col., 1995). Las parasitemias comenzaron a detectarse a partir del día 13 post-infección en todos los grupos. Los ratones inmunizados con MBP-PHGST#5 presentaron parasitemias significativamente más bajas con respecto al grupo

inmunizado con MBP hasta el día 16 y alrededor del día 30 post-infección, lo cual coincidió con los inicios de la infección y el pico de parasitemia, respectivamente (Fig. B-13). La curva de parasitemia del grupo control sin inmunizar fue similar a la obtenida por el grupo inmunizado con MBP (resultado no mostrado).

Dado que no se observó mortalidad alguna en los grupos controles sin inmunizar e inmunizados con MBP, siendo lo esperado en las condiciones utilizadas, entre un 25 y un 30% de mortalidad alrededor del día 21 post-infección, no fue posible interpretar los resultados obtenidos. Las causas del retraso en la aparición del pico de parasitemia (alrededor del día 30 post-infección) y la ausencia de mortalidad en los grupos controles son difíciles de establecer. Sin embargo, cabe mencionar que en estos experimentos el desafío fue realizado 13 días más tarde con respecto al protocolo convencional (Ruiz y col., 1986; Esteva y col., 1995), con lo cual, podría sugerirse al respecto que los ratones serían más resistentes a la infección. Será necesario establecer en futuros ensayos si se requiere un inóculo con mayor número de parásitos para obtener el grado de mortalidad requerido para evaluar el efecto de la inmunización en la sobrevivencia.

El grupo de ratones inmunizados con MBP-PHGST#5 presentó un 20% de mortalidad. Este 20% correspondió a los 2 ratones de un total de 10 que alcanzaron mayores parasitemias ($> 5.8 \times 10^6$), los cuales murieron en los días 20 y 34 post-infección. Es importante mencionar que la inoculación con el antígeno TSA-1 produce una mortalidad del 100% luego del desafío con *T. cruzi*, mientras que el 70% de los ratones desafiados sobreviven cuando

se inmunizan con este antígeno sin las repeticiones C-terminales (Wrightsmann y col., 1994). Si bien es necesario repetir estos experimentos a fin de evaluar si la inmunización con PHGST#5 recombinante aumenta la mortalidad luego del desafío, podría sugerirse que las repeticiones de Tc13 estarían de alguna forma afectando el montaje de una respuesta inmune protectora contra el parásito. La realización de los ensayos de inmunoprotección inoculando PHGST#5 con y sin repeticiones EPKSA podría determinar la veracidad de esta hipótesis.

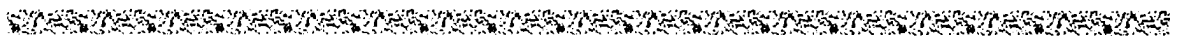


Figura B-9: Expresión de PHGST#5 en sistemas eucariotas
in vitro e *in vivo*

Expresión de PHGST#5 en sistemas eucariotas *in vitro* e *in vivo*:

La expresión de PHGST#5 en un sistema eucariota *in vitro* fue evaluada mediante transfección de monocapas de células COS-7 con los plásmidos pcDNA (b) y pcDNA-PHGST#5 (a y c). Las células fueron fijadas con metanol 48 hs después de la transfección y reveladas con suero de conejo anti-Tc13 (b y c) o suero normal de conejo (a) utilizando un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína. Como control positivo se transfectó con el plásmido pcM β y se reveló con un anticuerpo monoclonal anti- β -galactosidasa (d).

La expresión de PHGST#5 *in vivo* fue evaluada mediante la inoculación de 30 μ g de pcDNA (e) o pcDNA-PHGST#5 (f y g) en ratones hembras de la cepa BALB/c en el músculo *Tibialis anterioris*. Diez días post-inoculación los animales fueron sacrificados y los cortes de los músculos embebidos en parafina fueron revelados con suero de conejo anti-Tc13 y un conjugado fluorescente. En f) se muestra un corte transversal con algunas células teñidas en su citoplasma, mientras que en g) se muestra un corte longitudinal con algunas células con tinción citoplasmática con acumulación en la membrana plasmática.

a) Cel COS-7
pcDNA -PHGST#5



Suero Normal Conejo

b) Cel COS-7
pcDNA



Suero anti-Tc13

c) Cel COS-7
pcDNA -PHGST#5



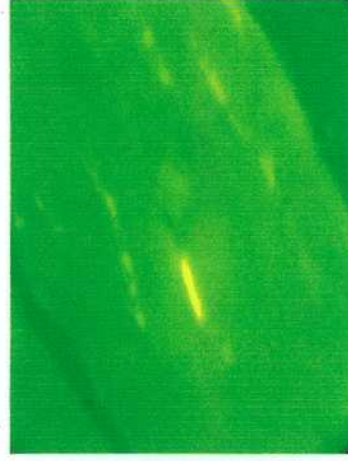
Suero anti-Tc13

d) Cel COS-7
pcM β



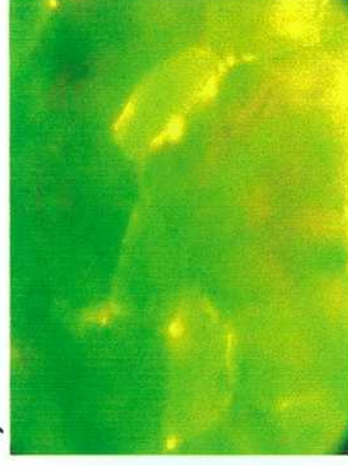
AcMo anti- β Gal

e) Músculo ratón
pcDNA



Suero anti-Tc13

f) Músculo ratón
pcDNA - PHGST#5



Suero anti-Tc13

g) Músculo ratón
pcDNA - PHGST#5



Suero anti-Tc13

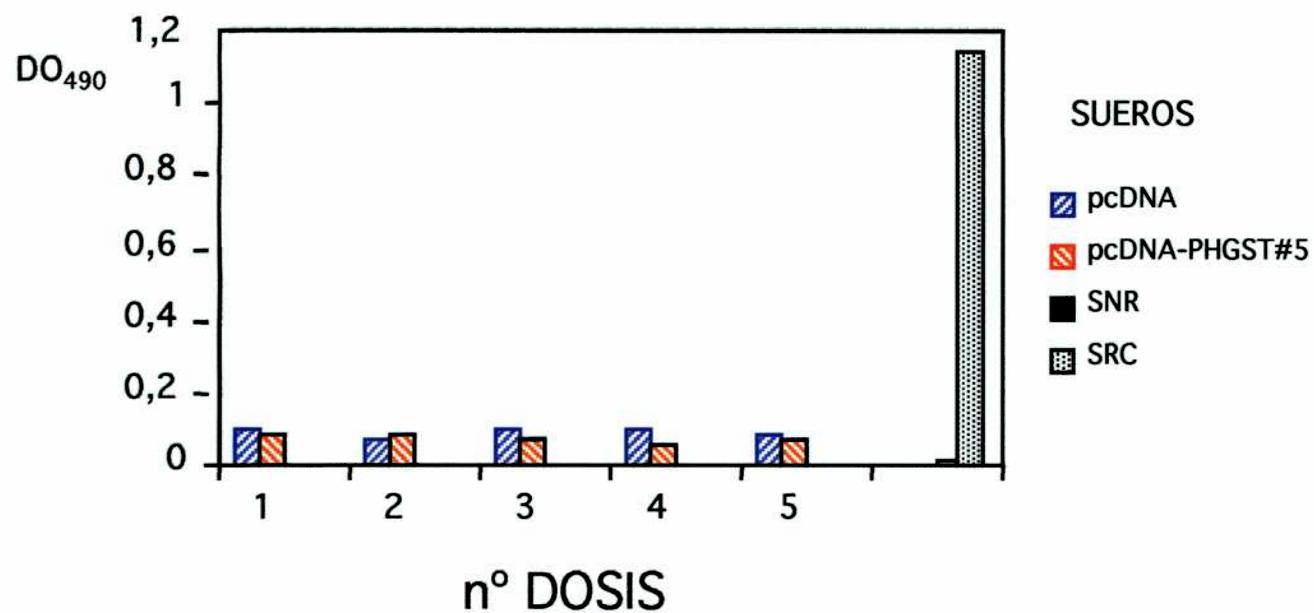
Figura B-10: Respuesta humoral y celular generada por los ratones inmunizados con PHGST#5 plasmídico

Respuesta humoral y celular generada por los ratones inmunizados con PHGST#5:

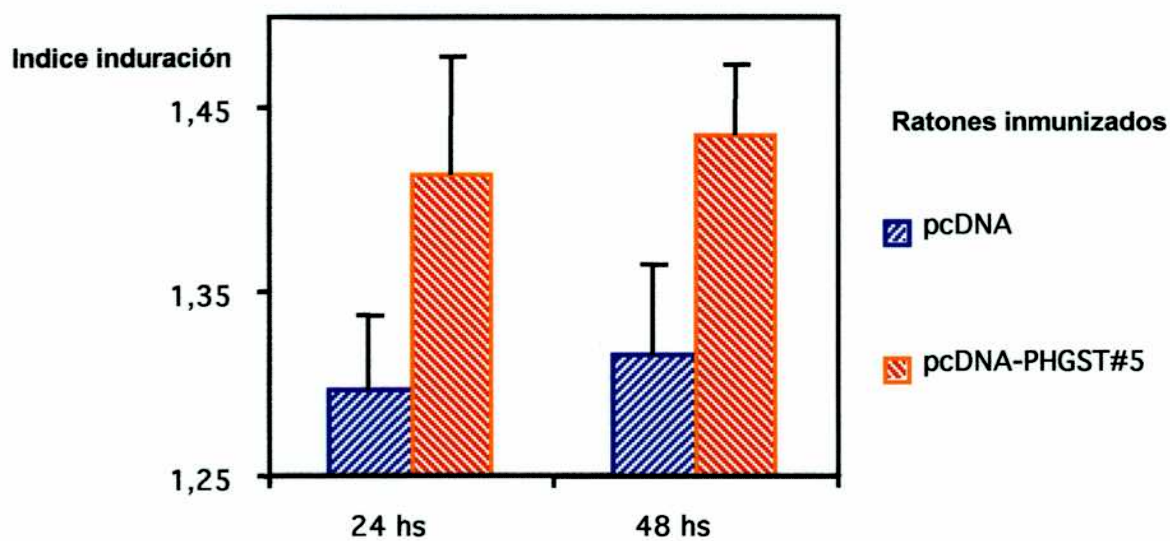
a) Respuesta de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los ratones inmunizados. El título de anticuerpos específicos en los sueros de los ratones inmunizados con cinco dosis de 50 µg de pcDNA o pcDNA-PHGST#5 fueron evaluados mediante la técnica de ELISA utilizando lisados de tripomastigotes como antígeno. La figura muestra un experimento representativo utilizando “pooles” de sueros diluidos 1/100. Como control positivo se utilizó un “pool” de sueros de ratones crónicos y como control negativo un “pool” de sueros de ratones normales.

b) Respuesta de hipersensibilidad retardada en los ratones inmunizados. Veinticinco días después de la última dosis se evaluó la respuesta de hipersensibilidad retardada producida por los ratones inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 luego de 24 y 48 hs de la inoculación de MBP-PHGST#5 en la almohadilla plantar. La reacción cutánea fue medida con un calibre y el índice de induración fue calculado como la relación de la induración de la pata a las 24 o 48 hs con respecto a la medida de la misma antes de la inoculación. El gráfico muestra las medias +/- error standard de la media.

a)



b)



n° parásitos x 10⁶ / ml

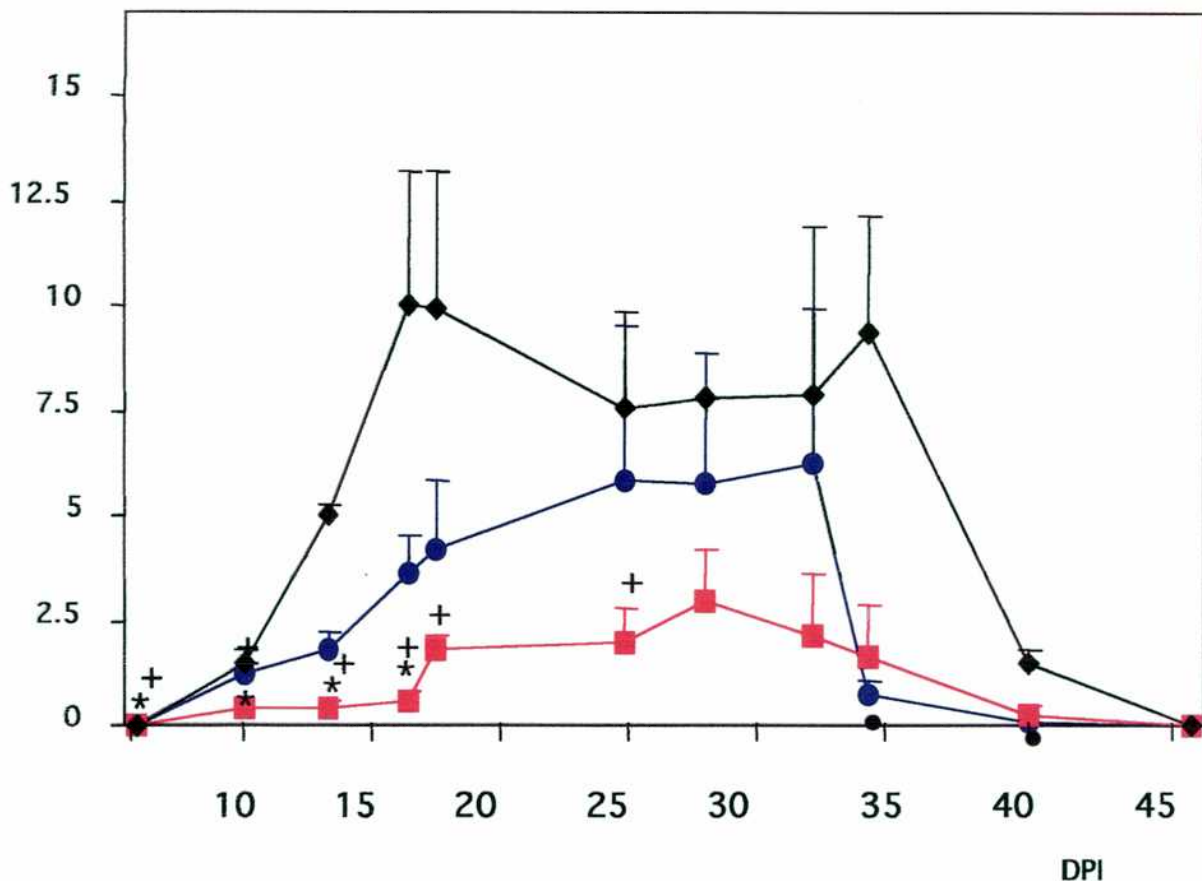


Figura B-11: Curva de parasitemia de los ratones sometidos a inmunización plasmídica con PHGST#5 luego del desafío con tripomastigotes sanguíneos:

Treint y cinco días después de la última dosis los ratones inmunizados con pcDNA (—●—) y pcDNA-PHGST#5 (—■—) y un grupo control sin inmunizar (—◆—) fueron desafiados con 2×10^3 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén. La parasitemia fue medida en 5 μ l de sangre. *, indica que la parasitemia fue significativamente menor en el grupo inmunizado con pcDNA-PHGST#5 con respecto al grupo inmunizado con pcDNA. +, indica que la parasitemia fue significativamente menor en el grupo inmunizado con pcDNA-PHGST#5 con respecto al grupo sin inmunizar. •, indica que la parasitemia fue significativamente menor en el grupo inmunizado con pcDNA con respecto al grupo sin inmunizar. El gráfico muestra las medias $\pm$ error standard de la media. Las diferencias se consideraron significativas con un $P < 0.05$.

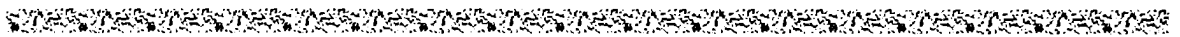


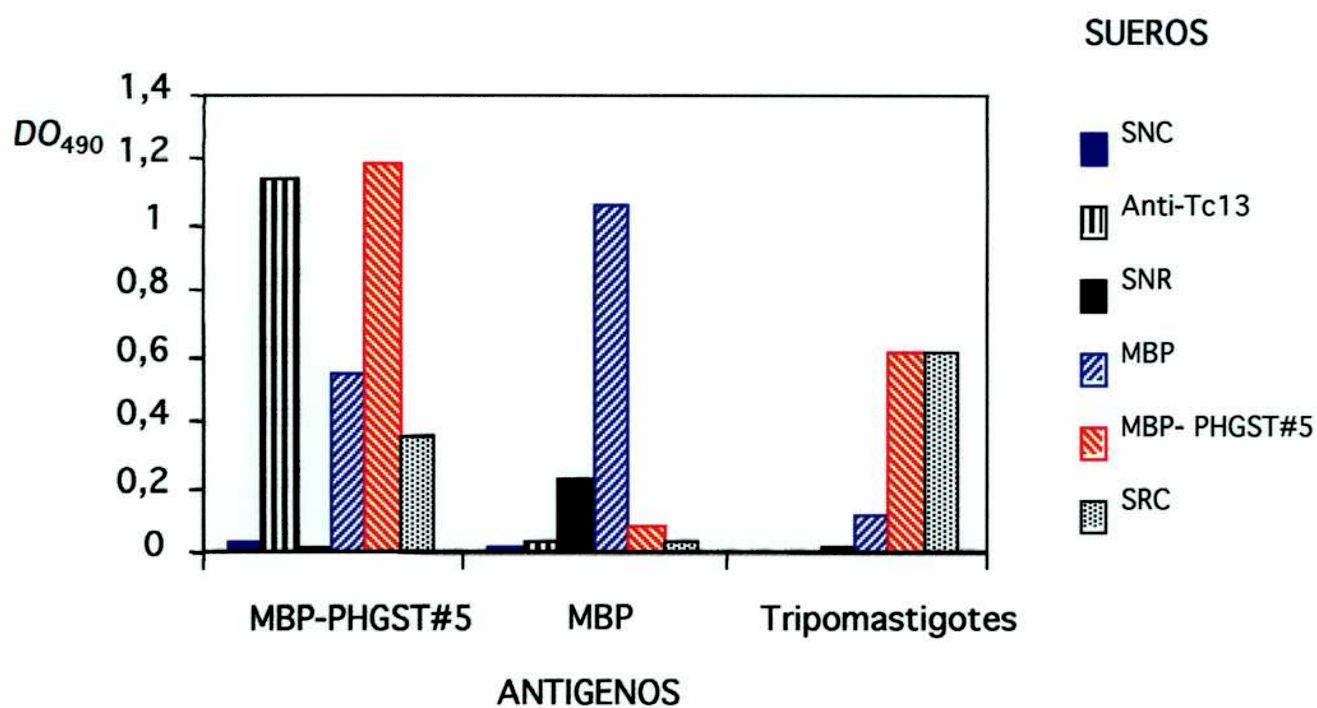
Figura B-12: Respuesta humoral y celular generada por los ratones inmunizados con PHGST#5 recombinante

Respuesta humoral y celular generada por los ratones inmunizados con PHGST#5 recombinante:

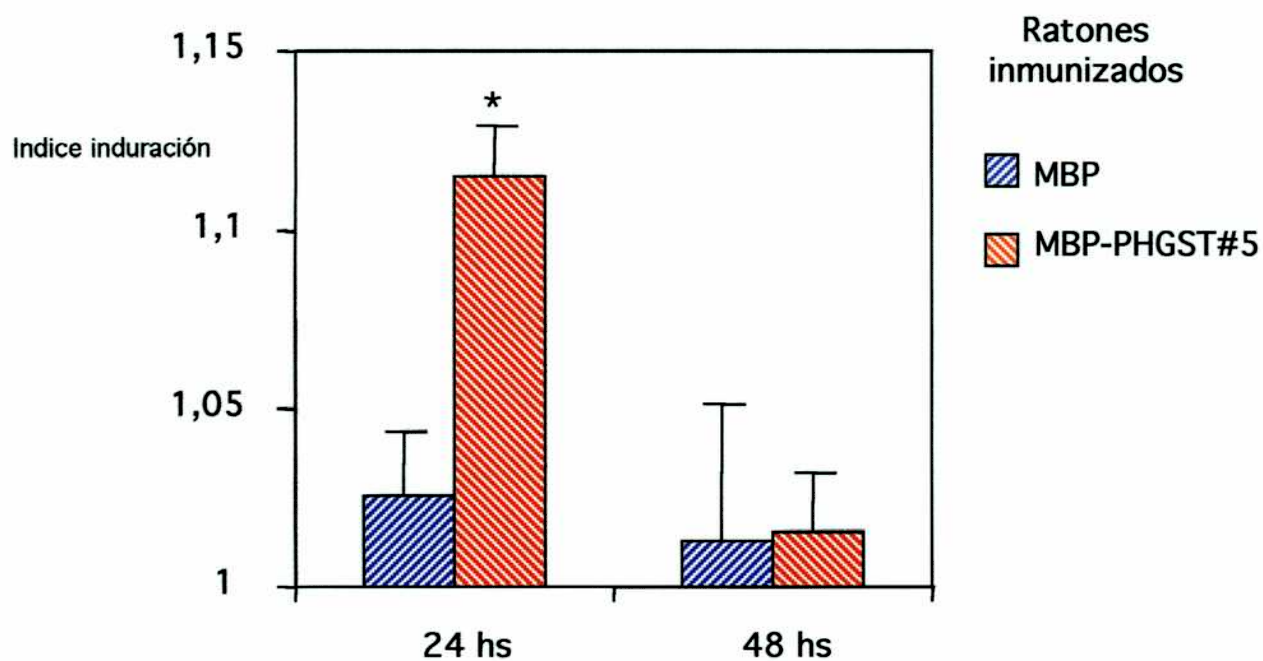
a) Detección de niveles de anticuerpos específicos en los ratones inmunizados con MBP y MBP-PHGST#5 adyuvados con *B. pertussis*. Los sueros de los ratones inmunizados fueron evaluados mediante la técnica de ELISA utilizando como antígenos MBP-PHGST#5, MBP o lisados de tripomastigotes. En la figura se muestra un experimento representativo utilizando “pooles” de sueros de los ratones inmunizados con cinco dosis de las proteínas recombinantes. En los ensayos sobre MBP-PHGST#5 y MBP los sueros de ratón fueron diluidos 1/200 con competencia con MBP (20 µg/ml). Sobre los tripomastigotes los sueros de ratón fueron diluidos 1/100. Como controles positivos se utilizaron un suero de conejo anti-Tc13 y un “pool” de sueros de ratones crónicamente infectados con *T. cruzi* (SRC). Como controles negativos se utilizaron un suero normal de conejo y un “pool” de sueros de ratones normales (SNR). Los sueros de conejo fueron diluidos 1/2500.

b) Respuesta celular específica en los ratones inmunizados con PHGST#5 recombinante. La respuesta de hipersensibilidad retardada producida por los ratones inmunizados con MBP y MBP-PHGST#5 fue evaluada luego de 24 y 48 hs de la inoculación de lisados de tripomastigotes en la almohadilla plantar. La reacción cutánea fue medida con micrómetro y el índice de induración fue calculado como la relación de la induración de la pata a las 24 o 48 hs con respecto a la medida de la misma antes de la inoculación. El * indica que la induración a las 24 hs post-inoculación es significativamente mayor en el grupo inmunizado con MBP-PHGST#5. El gráfico muestra las medias +/- error standard de la media. Las diferencias se consideraron significativas con un $P < 0.05$.

a)



b)



n° parásitos X 10⁶ / ml

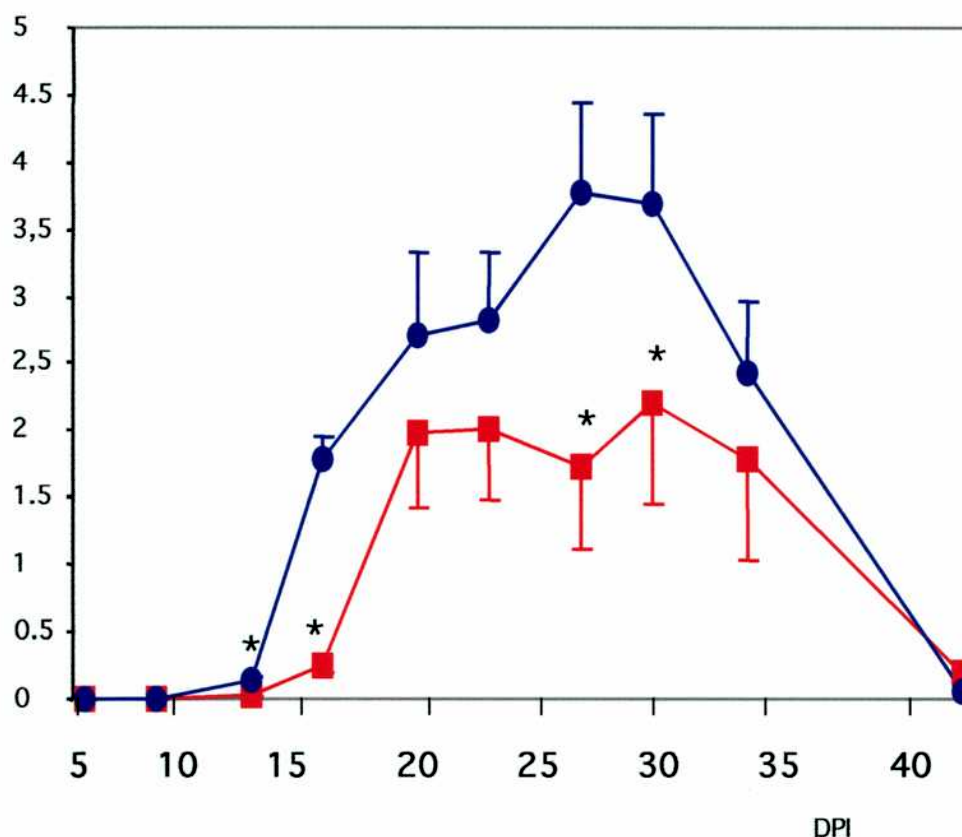


Figura B-13: Curva de parasitemia de los ratones inmunizados con PHGST#5 recombinante luego del desafío con tripomastigotes metacíclicos:

Los ratones inmunizados con MBP (—●—) y MBP-PHGST#5 (—■—) fueron desafiados con 1×10^3 tripomastigotes metacíclicos de la cepa Tulahuén 43 días después de la última dosis. La parasitemia fue medida en 5 μ l de sangre. *, indica que la parasitemia es significativamente menor en el grupo inmunizado con MBP-PHGST#5 con respecto al grupo inmunizado con MBP. El gráfico muestra las medias $\pm$ error standard de la media. Las diferencias se consideraron significativas con un $P < 0.05$.

Materiales y métodos

1) MEDIOS Y SOLUCIONES:

- **Buffer de siembra para geles de proteínas (BS):** Tris-HCl 55 mM pH= 6.8, 1.6 % SDS, 8.3 % glicerol, 0.002 % azul de bromofenol, 5 % 2-mercaptoetanol
- LB: 1% p/v bacto-triptona, 0.5 % p/v extracto de levaduras, 1 % p/v NaCl
- PBS (1 litro): 8 gr ClNa, 0.2 gr KCl, 1.15 gr Na₂HPO₄, 0.2 gr KH₂PO₄
- PBS-5% leche: PBS con 5% p/v de leche descremada
- PBS-1% leche: PBS con 1% p/v de leche descremada
- SSC 20x: 3 M ClNa, 0.3 M Na₃ citrato pH=7
- SM: Tris-HCl 10 mM pH=7.5, 0.1 M ClNa, 10 mM MgSO₄, 0.01 % p/v de gelatina
- TBE 10x: (1 litro) 108 gr Tris base, 55 gr ácido bórico, 40 ml EDTA pH=8
- TBS 10x: 0.25 M Tris-HCl pH=8, 9% p/v NaCl
- TBS-5% leche: TBS 1x con 5% p/v de leche descremada
- TBS-1% leche: TBS 1x con 1% p/v de leche descremada

2) PARASITOS: CULTIVO Y OBTENCION DE SUBFRACCIONES

2.1- Cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*:

Los epimastigotes la cepa Tulahuén, stock Tul 2 y el clon CL Brener de *Trypanosoma cruzi* se cultivaron durante 7 días a 28 °C en un medio monofásico axénico conteniendo 5 g/l de extracto de hígado (Inorp); 4 g/l de extracto de corazón (Inorp); 3 g/l de extracto de carne (Inorp); 3 g/l de extracto de levadura (Difco); 9 g/l de Triptosa (Difco); 4 g/l de Dextrosa (Mallinckrodt, EEUU); 10g/l de Na₂HPO₄; 4 g/l de KCl; 4 g/l de NaCl; 0.02 g/l de Hemina (Sigma, EEUU).

Los tripomastigotes del clon CL Brener de *T. cruzi* se cultivaron en monocapas de células musculares embrionarias bovinas (BESM) con RPMI 1640 (Gibco, EEUU) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino.

Los tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén stock Tul 2 se mantuvieron por pasajes seriados en ratones de la cepa BALB/c.

Los tripomastigotes metacíclicos de la cepa Tulahuén stock Tul 2 de *T. cruzi* fueron obtenidos de las heces de *Triatoma infestans*, previamente alimentadas de ratones BALB/c infectados.

2.2- Preparación de Homogenato Total (HT) y Fracción Soluble (FS) de epimastigotes:

La disrupción de los epimastigotes de la cepa Tulahuén fue llevada a cabo por presión y descompresión en un fraccionador de células Sorvall-Ribi Modelo Rf—1 (Ivan Sorvall Inc, Norwalk, CT, EEUU). El homogenato total obtenido se denominó HT (Segura y col., 1974). En los casos que se utilizó la fracción soluble (FS) del parásito, con excepción de los experimentos en que se midió actividad de GST, ésta resultó ser el sobrenadante de la centrifugación a 105.000 g del homogenato total.

2.3- Preparación de la fracción soluble (FS) de epimastigotes para detectar actividad de GST:

Para medir la actividad de GST la FS fue preparada a partir de epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. El pellet de los epimastigotes se lavó dos veces con Tris 0.1M pH=7.2, ClNa 0.075 M y posteriormente se resuspendió en 1 ml de buffer fosfato de potasio 0.1 M pH=6.5 conteniendo 0.5 mM de PMSF, 1 mM de TLCK y 0.1 mM de EDTA por gramo de parásitos. Se sonicó con pulsos de 30 segundos a 40

watts con microtip en un sonicador Sonifier B-12 Brandson Sonic Power hasta no observar parásitos enteros por microscopio óptico. El sonicado se centrifugó en microcentrífuga a 10.000 x g a 4 °C y el sobrenadante obtenido se centrifugó dos veces durante una hora y media a 105.000 x g. La fracción soluble obtenida presentó una concentración de 16 a 28 mg/ml medida por método de Lowry (Lowry y col., 1951).

2.4) Preparación de lisados de tripomastigotes:

Los tripomastigotes provenientes de cultivos celulares se lavaron con PBS y se resuspendieron en este mismo buffer a una concentración aproximada de 1×10^7 parásitos/ml. Los tripomastigotes se rompieron por congelamiento y descongelamiento hasta no observarse parásitos enteros por microscopio óptico. La concentración de proteínas en el lisado fue determinada por el método de Bradford.

3) MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE GST:

La actividad de GST fue realizada en un volumen final de 1 ml de buffer fosfato de potasio 0.1 M pH=6.5, 5 mM GSH y 1mM CDNB, agregando de 2 a 6 mg de fracción soluble de *T. cruzi* en un volumen máximo de 400 μ l o 30 μ g de la fracción PHGST. La formación del conjugado GSH-CDNB fue medida espectrofotométricamente a 340 nm. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: en un primer paso se mezclaron el buffer, la fracción proteica (la misma cantidad de buffer en el blanco) y el CDNB; luego se centrifugó a 4 C durante 5 minutos a 13500 rpm en microcentrífuga (de esta manera se precipitan las proteínas que pudieron ser desnaturalizadas al agregar el CDNB, el cual está disuelto en etanol); posteriormente se trasladó el sobrenadante a las cuvetas, se llevó la densidad óptica a 340 nm a cero con el blanco y

se inició la reacción con el agregado del GSH en ambas cuvetas. La densidad óptica se registró cada minuto durante diez minutos, siendo lineal durante este tiempo. Como control negativo se utilizó la misma fracción proteica tratada a 90 C durante dos minutos. El coeficiente de extinción molar utilizado fue $9.6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (Habig y col., 1974).

4) OBTENCION DEL SUERO ANTI- GSTsj:

La GSTsj expresada por el plásmido pGEX1 en *E. coli* DH5- α fue purificada mediante cromatografía de afinidad con GSH-agarosa (Sigma, EEUU) (Smith y Johnson, 1988). Dicha proteína se utilizó para inocular tres conejos con el siguiente esquema de inmunización:

DOSIS mg GST Sj	VIA*	ADYUVANTE	DIA
1°	1	ID completo Freund	1
2°	1	ID completo Freund	21
3°	1	ID completo Freund	42
4°	1,5	IP	72
5°	1,5	IP	86
6°	1	ID incompleto Freund	97
7°	1	ID incompleto Freund	118

* ID: intradérmica, IP: intraperitoneal

El título de anticuerpos fue testeado por ELISA sobre GST Sj y sobre HT de *T. cruzi*. Como control negativo se utilizó un suero de conejo normal (SCN) y como control positivo un suero de conejo anti-GST Sj cedido por la Dra. Bianca Zingales, Universidad de San Pablo, Brasil.

5) PURIFICACION DE LA FRACCION PHGST POR CROMATOGRAFIA DE INMUNOAFINIDAD Y SECUENCIACION DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LAS PROTEINAS:

La IgG del suero de conejo anti-GSTsj fue purificada por cromatografía de afinidad por proteína A-Sepharosa (Pharmacia, Suecia) y acoplada a Sepharosa activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia, Suecia) según las especificaciones del proveedor.

La FS de epimastigotes de *T. cruzi* se diluyó a 2 mg/ml en Tris 0.05M pH=8.3, cloruro de sodio 0.15 M conteniendo 50 µg/ml de TLCK y se incubó con la resina anti-GSTsj- Sepharosa durante toda la noche en rotación a 4 °C. Se lavó con el mismo buffer hasta una DO a 280 nm menor a 0.02 y se eluyó con glicina 0.2M pH=2.3, recogiendo fracciones de 1 ml y neutralizando instantáneamente con 60 µl de Tris 2M pH=8.8. La fracción obtenida se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida 12% con SDS y se visualizó mediante tinción con coomassie brilliant blue.

Para realizar la secuencia N-terminal de las proteínas, la fracción PHGST fue diluida en Tris 50 mM pH=6.8, 5% p/v de SDS, 25% p/v de sacarosa, 0.01% de azul de bronofenol y hervida durante 3 min. Luego se sembró en un gel de poliacrilamida 12% con 0.2% de SDS y se corrió a 150 volts con el buffer standard conteniendo 0.2% de SDS y colocando 0.1 mM de tioglicolato en el reservorio superior de la cuba. La electrotransferencia a membranas de PVDF se realizó en la cuba MiniProtean II (BioRad, EEUU) utilizando como buffer Tris 10 mM, glicina 100 mM y 10 % de metanol. Al terminar la transferencia las membranas se colocaron en 20 % de metanol y las bandas proteicas se visualizaron por transiluminación. Las porciones de membrana conteniendo las proteínas transferidas fueron escindidas y enviadas al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (CONICET-UBA) para realizar la secuencia del extremo N-terminal.

6) DESCRIPCION DE LAS GENOTECAS DE *T. CRUZI* UTILIZADAS:

6.1- Biblioteca genómica de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*:

La biblioteca genómica fue construida en el vector λ ZAPII (Stratagene, EEUU) a partir de fragmentos de ADN total de epimastigotes de la cepa Tulahuén digeridos por la enzima EcoRI. Los fragmentos entre 3 y 10 kb fueron clonados en el vector y empaquetados con los extractos adecuados. La genoteca resultó en 8×10^6 clones individuales con un 99.4 % de recombinantes (Búa y col., 1999).

6.2-Biblioteca de ADNc del clon CL Brener de *T. cruzi*:

La biblioteca de ADNc fue construida a partir de ARNm de epimastigotes del clon CL Brener de *T. cruzi* y normalizada. Esta genoteca fue distribuida a los grupos de secuenciación del Proyecto Genoma del *T. cruzi* (Urmenyi y col., 1998). Las secuencias de los clones de esta genotec se encuentran depositados en el GeneBank®, en la sección de ESTs. Los clones de ADNc correspondientes a la TcGRX, 19h22 y 44h9, se solicitaron a la Dra. Lena Åslund de la Universidad de Uppsala, Suecia (Porcel y col., 2000).

6.3- Biblioteca genómica del clon CL Brener de *T. cruzi*:

La biblioteca genómica fue construida en cósmidos a partir del ADN total del clon CL Brener de *T. cruzi*. Esta genoteca contiene 36.864 clones de cósmidos recombinantes independientes con un tamaño de aproximadamente 37 kba que cubren 25 equivalentes genómicos (Hanke y col., 1996). Los clones se encuentran dispuestos en dos filtros de nylon de 22 x 22 cm, los cuales fueron donados por el Dr. Hoheisel, del

Laboratorio de Análisis de Genomas, (Deutsche Krebsforschungszentrum, DKFZ), Heidelberg, Alemania (Hanke y col., 1997).

7) DETECCIÓN DE CLONES EN LAS GENOTECAS:

7.1- Rastreo inmunológico con suero de conejo anti-GSTsj:

La búsqueda de los clones de bacteriófagos recombinantes que expresan antígenos reconocidos por el suero anti-GSTsj se realizó sobre la biblioteca genómica de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* construida en el vector de expresión λ ZAP II. Los fagos se crecieron en la bacteria *E. coli* XL-1 Blue a 42 °C durante aproximadamente 3 hs hasta observar la aparición de playas de lisis. La expresión y transferencia de las proteínas de fusión se realizó colocando sobre la placa de bacterias y fagos durante 2 hs a 37 °C membranas de nitrocelulosa (NC) previamente embebidas en 10 mM isopropil- β -tio-galactopiranosido (IPTG). Los filtros con las proteínas adsorbidas se lavaron con TBS durante 10 min con agitación y se bloquearon con TBS-5% leche durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Los filtros se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente en presencia del suero anti-GSTsj diluido 1/1000 en TBS -1% leche. Este suero fue previamente adsorbido sobre un filtro de NC obtenido por transferencia de un césped de bacterias infectado con λ ZAP II salvaje, de forma de eliminar los anticuerpos dirigidos contra las proteínas bacterianas y virales. Los lavados se efectuaron con TBS 3 veces durante 10 min con agitación a temperatura ambiente. Como segundo anticuerpo se utilizó una anti-inmunoglobulina de conejo acoplada a la enzima peroxidasa (Vector, EEUU) diluida 1/500 en TBS-1% leche durante 1 h. Luego de los lavados en TBS, las NC se transfirieron al sustrato adecuado para el desarrollo del color: α -cloro naftol 0.5 mg/ml, H₂O₂ 0.025% en TBS conteniendo

0.96% de metanol. Una vez alcanzado el nivel de coloración deseado la reacción se detuvo sumergiendo las NC en agua destilada.

Las playas de lisis que resultaron positivas fueron nuevamente sometidas al mismo procedimiento. Los clones sucesivamente purificados por plaqueo y detección por anticuerpos, fueron mantenidos en soluciones madres de alto título en medio SM a 4 °C. La pureza y presencia de un inserto de ADN en los clones detectados se determinó mediante el crecimiento de los mismos en presencia de IPTG como inductor y X-gal como sustrato de la β -galactosidasa (Sambrook y col., 1989).

7.2- Rastreo de la biblioteca genómica del clon CL Brener de *T. cruzi* con sondas radiomarcadas:

Se marcaron de 50 a 200 ng del ADN a ser utilizado como sonda (fragmento amplificado con los iniciadores JS1 y JS2 a partir del ADNc 19h22 ó el fragmento obtenido por la digestión del clon PHGST#5 con la enzima SacI) con α -P³² dCTP mediante sistemas de marcación con iniciadores de 6 o 10 bases al azar ("random priming"). Luego de la cuantificación de la actividad específica del ADN marcado, los filtros conteniendo la genoteca de cósmidos grillada se prehibridaron en 0.5 M fosfato de sodio, pH 7.2, 1mM EDTA, 7 % SDS, 0.1 mg/ml tRNA de levadura, a 65°C, y luego se hibridaron en las mismas condiciones con una concentración de las sondas macadas de 1 Mcpm/ml durante toda la noche en un horno Micro 4 oven (Hybaid, Reino Unido). Los filtros se lavaron en 0.04 M fosfato de sodio, pH 7.2, 0.1 % SDS y se expusieron a filmes de rayos X a -70 °C, utilizando pantallas intensificadoras.

8) CARACTERIZACION DE LOS GENES OBTENIDOS:

8.1- Secuenciación del ADN:

El ADN utilizado para secuenciación se purificó con el *kit* Wizard para minipreparaciones de ADN (Promega, EEUU) según las especificaciones del proveedor. Se secuenciaron ambas cadenas de ADN usando el *kit* Big Dye Fluorescent Terminator (Perkin Elmer, EEUU) en un secuenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer, EEUU). Los oligonucleótidos utilizados para las secuencias fueron los siguientes:

Secuencia de ADNc 19h22 y 44h9:

JS1	5' gagcggataacaatttcacacagg 3'
JS2	5' gccagggttttcccagtcacga 3'

Secuencia genómica del gen *TcGRX*:

<i>TcGRX</i> .For.PCR	5' cacatgggttttgggtaaggg 3'
<i>TcGRX</i> .Rev.PCR	5' cagcctctcatgctcaccg 3'
<i>TcGRX</i> .Rev	5' gtgccgcgttgactcttc 3'
<i>TcGRX</i> 3'UTR	5' ggacaccgcgtctatgaag 3'

Secuencia del clon PHGST#5 y gen *Tc13CL*:

BTR (Sang y Thompson, 1994)

BTF (Sang y Thompson, 1994)

Oligo10R	5' ggtccagtgtgttgaccg 3'
Oligo 190	5' gcgtgtggagcaactcattg 3'
Oligo 515	5' gggccgcgaaggacaat 3'
Oligo 540R	5' tgagctgcattttcccaaggc 3'
Oligo 800	5' gcaaactatgggtttactcttgc 3'
Oligo 900	5' ctctgggactgtcgtac 3'
Oligo 1220	5' gcgagtaaagtcaccattcc 3'

8.2- Experimentos de "southern blot":

El ADN de epimastigotes de la cepa Tulahuén y del clon CL Brener de *T. cruzi* fue obtenido por métodos convencionales (Sambrook y col., 1989). Cinco µg de ADN de la cepa Tulahuén fue sometido a digestión parcial por la enzima PstI durante 1 y 4 hs y a digestión total durante toda la noche a 37 °C en el buffer indicado por el fabricante. El ADN del clon CL Brener fue digerido totalmente con las enzimas EcoRI, BamHI y SacI. El ADN de *T. cruzi* digerido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v con la metodología standard y luego fue depurinizado en HCl 0.25 M, desnaturalizado en NaOH 0.5 M, NaCl 1 M y neutralizado en Tris 1 M, pH 8.0. El ADN fue transferido durante toda la noche a membranas de nylon (Biodyne A, Pall BioSupport, EEUU) según métodos convencionales (Southern, 1975) en solución SSC 2X. El ADN transferido a las membranas de nylon se lavó con SSC 2X y se fijó durante 2 hs a 80 °C.

La sonda utilizada, el fragmento amplificado con los iniciadores JS1 y JS2 a partir del ADNc 19h22, fue radiomarcada e hibridada según las condiciones descriptas en la sección 7.2 de “Materiales y métodos”.

8.3 Preparación e hibridación de “cromoblots”:

Los epimastigotes del clon CL Brener y de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* fueron incluidos en bloques de agarosa conteniendo de 1×10^6 a 20×10^6 parásitos (Henriksson y col., 1993). Para evaluar la estabilidad del cariotipo los epimastigotes de la cepa Tulahuén fueron tomados a distintos días de un cultivo asincrónico o cada 30 minutos durante 12 hs a partir de un cultivo sincronizado con hidroxurea (Galanti y col., 1994). Los cromosomas fueron separados mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) en geles de agarosa al 1 % en tampón 0.5 X TBE a 14 °C, utilizando un equipo Bio-Rad Cheff Mapper (Bio Rad, EEUU).

Condición de corrida para cromosomas menores a 1000 Kpb:

Pulso inicial: 100 seg

Pulso final: 50 seg

Corrida electroforética: 175 Volts durante 40 hrs

Condición de corrida para cromosomas entre 1000 y 2000 Kph:

1° etapa: pulsos de 70 seg a 180 V, durante 18 hrs.

2° etapa: pulsos de 150 seg a 180 V, durante 24 hrs.

Los cromosomas fueron transferidos a membranas Hybond+ (Amersham, Reino Unido) utilizando los procedimientos habituales (Southern, 1975). Los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* y *S. pombe* fueron utilizados como marcadores de peso molecular (Bio Rad, EEUU).

Los “cromoblots” de los parásitos de la cepa Tulahuén asincrónicos y sincronizados con hidroxurea fueron gentilmente cedidos por el Dr. Mario Galindo de la Universidad de Medicina, Santiago de Chile, Chile.

La hibridación de los “cromoblots” con las sondas radiomarcadas fue realizado según el procedimiento descrito en la sección 7.2 de “Materiales y métodos”.

8.4- Reacción de polimerasa en cadena (PCR):

La obtención de la sonda 19h22, la amplificación del gen *TcGRX*, la confirmación de los clonados en los distintos vectores y la amplificación con un iniciador específico de la familia Tc13 a partir de los fagos recombinantes aislados con el suero anti-GSTsj se realizaron siguiendo la metodología convencional de la técnica de amplificación del ADN por la enzima *Taq* Polimerasa (PCR).

La técnica se efectuó utilizando como templado una ínfima porción de una colonia aislada de bacteria recombinante o de un fago recombinante puro sometido a un procedimiento de lisis (2 min a 100 °C en Tris 25 mM pH=9, 50 mM ClK y 0.01% Tween 20). Los iniciadores

específicos utilizados para cada caso fueron los siguientes (ver secuencias en sección 8.1):

Obtención de la sonda 19h22 y confirmación de clonados en vector T: JS1 y JS2

Amplificación del gen *TcGRX*: *TcGRX.For.PCR* y *TcGRX.Rev.PCR*

Confirmación de clonados en el vector pQE: pQEFor y pQERev (Qiagen, EEUU)

Confirmación del clonado de PHGST#5 en vector pMAL: 540R y pMALFor (New England Biolabs, EEUU)

Confirmación del clonado de PHGST#5 en el vector pcDNA: pcDNAFor (Invitrogen, EEUU) y 540R

Amplificación de los fagos reconocidos por el suero anti-GSTsj: BTF y 10R, BTF y 540R

La mezcla de reacción se compuso de 10 pmoles de cada iniciador, 2.5 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega, EEUU), 2 mM de dinucleótidos fosfatos y 15 mM de $MgCl_2$ en el buffer de reacción suministrado por el proveedor. El ADN se amplificó en un ciclador Genius (Techne, EEUU) con un total de 25 a 35 ciclos en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C 1-2 min; anillado de los oligonucleótidos a 55- 60 °C durante 1 min y extensión a 72 °C de 2 a 3 min. La extensión final se realizó durante 3 a 7 minutos a 72 °C. Finalizada la amplificación, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, visualizándose los productos de amplificación bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio. Un patrón de fragmentos de 100 a 1000 pb o de 1 a 12 Kb fue utilizado como marcador de peso molecular.

En el caso de la amplificación de fragmentos de ADN a subclonar en plásmidos de expresión se utilizó como enzima amplificadora la *Pfu* DNA polimerasa (Promega, EEUU) según el protocolo suministrado por el proveedor, ya que introduce menores errores de copia del templado.

Los fragmentos amplificados fueron purificados por el kit Wizard PCR (Promega, EEUU).

8.5- Obtención del extremo 5' del clon PHGST#5 en la cepa Tulahuén:

Con el objeto de obtener la porción 5' faltante en el clon PHGST#5, se pre-amplificaron 100 ng de ADN de fago purificado a partir la genoteca de *T. cruzi* construida en λ ZapII según el protocolo standard (Sambrook y col., 1989) con 100 pmoles de los iniciadores 10R o 540R en las condiciones mencionadas anteriormente. A las mezclas de reacción pre-amplificadas se les agregó el segundo iniciador, BTF o BTR, y se sometió nuevamente al proceso de amplificación. El ADN amplificado fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa 2% y visualizado por bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados fueron escindidos del gel, purificados mediante el *kit* de Wizard PCR (Promega, EEUU) y secuenciados.

8.6- Determinación del tamaño de los insertos de los clones obtenidos por rastreo inmunológico con el suero anti-GSTsj:

Los plásmidos pBluescript recombinantes fueron escindidos del fago λ ZapII coinfectando bacterias *E. coli* XL-1 Blue con dichos fagos individuales y el fago filamentoso ExAssist (Stratagene, EEUU) según el protocolo de Vekris (Vekris, 1994). Los fagos obtenidos como fruto de esta co-infección se utilizaron para infectar bacterias SOL-R (Stratagene, EEUU), obteniendo en este sistema los plásmidos recombinantes (Vekris, 1994). Los mismos fueron sometidos a digestión total con la enzima EcoRI y el tamaño de los insertos fue visualizado mediante geles de agarosa 1% p/v teñidos con bromuro de etidio comparando con los marcadores de peso molecular adecuados.

8.7- Hibridación de los clones obtenidos en el rastreo Inmunológico con el suero anti-GSTsj con el clon PHGST#5:

Los fagos recombinantes se crecieron a 42 °C durante 3 hs sobre un césped de *E. coli* XL-1 Blue. La expresión y transferencia de las proteínas de fusión fue realizada colocando membranas de nylon previamente embebidas en 10 mM de IPTG sobre la placa conteniendo el césped de bacterias con las playas de lisis e incubando durante 2 hs a 37 °C.

Las membranas fueron tratadas según se especificó en la sección 8.2 de “Materiales y métodos” y fueron hibridadas con el fragmento PHGS#5 SacI según el protocolo de la sección 7.2.

Como control positivo se utilizó el fago recombinante PHGST#5 y como control negativo un fago λ Zap II salvaje.

8.8- Números de acceso al Genbank® de las secuencias obtenidas:

ADNc 19h22: AF190801

Secuencia genómica del gen *TcGRX*: AF223386

Secuencia genómica gen *Tc13 CL*: AF091620

Clon PHGST#5: AF092099

9) BUSQUEDA DE HOMOLOGIAS EN BANCOS DE DATOS Y ANALISIS DE SECUENCIAS:

9.1- Comparación de secuencias en bancos de datos:

La comparación de las secuencias con los bancos de datos no redundantes para proteínas o ADN fueron realizadas con los programas

BLASTP o BLASTN, respectivamente en el sitio: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast (Altschul y col., 1990).

La comparación de la secuencia N-terminal de PHGST 4 (15 aa) se realizó con el programa BLASTP utilizando la matriz PAM-30 (9;1) y un valor estadístico E ("expect") de 10000.

Las comparaciones en bancos de datos realizadas con los programas del paquete FASTA (FASTA3, SSERCH y PRSS) (Pearson y col., 1988) fueron realizadas en el sitio: <http://fasta.bioch.virginia.edu>.

Los alineamientos se consideraron estadísticamente significativos con un E menor o igual a 0.03 (Brenner y col., 1998; Altschul, 1998). La significancia estadística también fue evaluada comparando las secuencias de a pares con el programa PRSS, el cual discrimina la existencia de similitud debida exclusivamente a la composición aminoacídica comparando la primera secuencia con una biblioteca generada por una mezcla al azar de los aminoácidos de la segunda secuencia (Pearson y col., 1988).

9.2- Análisis de secuencias proteicas:

El programa SignalP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) fue utilizado para determinar la presencia de péptidos señales (Nielsen y col., 1997).

Las secuencias probables para clivaje y adición de GPI se determinaron utilizando el sitio http://members.ncbi.com/_XMCM/jkronegg/unige/GPI-anchor/

El perfil hidrofóbico de las proteínas fue realizado según el método de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) con el programa Protean (DNASTAR, DNASTAR Inc., Madison, EEUU).

9.3- Modelado molecular de la TcGRX:

El modelado molecular de la TcGRX fue realizado en colaboración con la Dra. Margot Paulino en el Departamento de Químico Física y Matemáticas de la Facultad de Química de la Universidad de la República en Montevideo, Uruguay.

La comparación de la secuencia de la TcGrx se realizó en una base de datos en tres dimensiones utilizando los programas Fasta (Milburn y col., 1998) y Swiss Model (Peitsch y col., 1996). Los alineamientos primarios fueron manualmente modificados a fin de conservar la estructura secundaria y el porcentaje de similitud final alcanzado fue obtenido tomando como reemplazos conservativos aquellos residuos con polaridad o carga electrostática similar. El modelado de la TcGRX fue realizado por reemplazo molecular a partir de la estructura tridimensional obtenida por cristalografía de la GRX3 de *E. coli* y la tiorredoxina del fago T4 utilizando el programa TOM/mdFrodo (Nilsson, 1990), realizando tres pasos de refinamiento del modelo.

10) CLONADOS Y PROTOCOLOS DE INDUCCION Y PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES:

10.1- Clonado del gen TcGRX en el vector de expresión pQE31:

El gen TcGrx fue amplificado por PCR con la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Promega, EEUU) a partir del clon de cósmido 35i22 con los iniciadores TcGRXFor.PCR y TcGRXRev.PCR. El fragmento amplificado fue purificado con el kit Wizard PCR (Promega, EEUU) y clonado en vector pGEM-T easy (Promega, EEUU) utilizando la ligasa de ADN del fago T4 (Promega, EEUU) según las especificaciones suministradas por el proveedor. La obtención de colonias recombinantes fue evaluada por PCR con los iniciadores JS1 y JS2.

El inserto de una colonia de vector pGEM-T recombinante fue obtenido mediante la digestión con la enzima EcoRI y sub-clonado en el vector pBluescript SK+ (Stratagene, EEUU) cortado con la misma enzima. La obtención de colonias recombinantes fue evaluada por PCR con los iniciadores JS1 y JS2.

El inserto de una colonia recombinante de pBluescript fue obtenido mediante digestión con SacI y HindIII y subclonado en el vector de expresión pQE31 (Qiagen, EEUU) digerido con las mismas enzimas. La obtención de colonias recombinantes fue evaluada por PCR con los iniciadores TcGRXFor.PCR y TcGRXRev.PCR.

Todas las transformaciones fueron realizadas en *E. coli* cepa M15 (Qiagen, EEUU).

10.2- Expresión y purificación de la TcGRX recombinante:

Para expresar la TcGRX las bacterias recombinantes, pQE31-TcGRX, se crecieron a 37 °C en medio LB hasta una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.8. Se adicionó IPTG en la concentración indicada en cada experimento (0 a 1 mM) induciéndose la expresión durante 3 hs a 37 °C. Para seguir el proceso de inducción se tomó 1 ml de cultivo de bacterias antes del agregado del IPTG (control no inducido) y después de las 3 hs de inducción (inducido), y el pellet de las bacterias fue resuspendido en 50 μ l de buffer de siembra (BS) hervido 3 min y sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida 15% con SDS en las condiciones standard. Para calcular el volumen de muestra a sembrar en el gel se tuvo en cuenta la siguiente proporción: $6/DO_{600}=\mu$ l de muestra a sembrar. Para determinar la localización de la proteína recombinante, la bacteria precipitada se resuspendió en PBS, se sonicó tres veces durante 10 seg con 10 seg de descanso en un sonicador Sonifier B-12 Brandson Sonic Power y se

centrifugó a 9000 xg durante 20 min. El pellet y 20 µl del sobrenadante fueron resuspendidos en buffer de muestra y sometidos a electroforesis.

La purificación de la proteína recombinante fue realizada a través de cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) en condiciones nativas, utilizando buffer fosfato de sodio 50 mM pH=8, 300 mM ClNa y 20 mM de imidazol y eluyendo en el mismo buffer con 250 mM de imidazol, o en condiciones desnaturalizantes con urea 8M, Tris-HCl 0.01 M pH=8 para el pegado a la columna, y utilizando el mismo buffer con pH=6 y pH=4.5 para el lavado y la elución, respectivamente.

10.3- Expresión de PHGST#5 en pBluescript:

El plásmido pBluescript recombinante PHGST#5 fue escindido según las especificaciones de la sección 8.6 de “Materiales y métodos”.

La bacteria recombinante conteniendo el plásmido pBluescript-PHGST#5 fue inducida durante 3 hs con IPTG 10 mM. Como control negativo se indujo la bacteria conteniendo el mismo plásmido sin inserto y como control positivo el plásmido pGEX-1 (Pharmacia/Biotech, Suecia) con 0.1 mM de IPTG.

Las bacterias no inducidas e inducidas fueron lisadas en BS como se especifica en 10.2 y utilizadas en experimentos de “western blot”.

10.4- Sub-clonado de PHGST#5 en pMalp2:

El fragmento de ADN que codifica para el clon PHGST#5 fue sub-clonado en el sitio EcoRI de un plásmido pMAL-p2X (New England Biolabs, EEUU) previamente modificado con un adaptador en este sitio de restricción (5' aattgaattc 3') de forma tal de conservar el marco de lectura del clon PHGST#5 proveniente de pBluescript. La orientación del mismo en las colonias que resultaron positivas fue corroborada por

análisis de la secuenciación de su ADN y amplificación del inserto usando iniciadores específicos de la síntesis.

10.5- Expresión y purificación de MBP-PHGST#5:

La inducción de las colonias recombinantes se llevó a cabo creciendo las colonias de bacterias *E. coli* recombinantes pMAL-PHGST#5 durante toda la noche a 37 °C en medio LB. Se diluyó el cultivo 10 veces con medio fresco, permitiéndose luego su crecimiento hasta DO_{600} de 0.6. La producción de proteína de fusión fue inducida por el agregado de IPTG a una concentración final de 1 mM, durante 4 hs a 37 °C. El control de la expresión de la proteína recombinante se realizó siguiendo los mismos pasos que en la sección 10.2 de “Materiales y métodos”.

La purificación de MBP-PHGST#5 se realizó a partir del sobrenadante de 9000 xg del sonificado de la bacteria resuspendida en Tris-HCl pH=7.4, 0.2 M ClNa y 10 mM de 2-mercaptoetanol, utilizando una columna de amilosa (New England Biolabs, EEUU) y eluyendo con 10 mM de maltosa. La proteína purificada fue dializada contra PBS.

La proteína MBP fue expresada a partir del plásmido pMalp2 salvaje y purificada en las mismas condiciones.

Para los ensayos de hipersensibilidad retardada la proteína MBP-PHGST#5 pura fue electroeluida en el electroeluto BioRad modelo 422 durante 4 hs a 160 volts en el buffer de corrida de electroforesis convencional. Durante 1 hora adicional se electroeluyó con el mismo buffer pero sin SDS en el reservorio inferior.

10.6- Clonado de PHGST#5 en pcDNA3.1:

El inserto del clon PHGST#5 digerido con BamHI y SacI fue clonado en el vector pQE31 (Qiagen, EEUU) digerido con las mismas enzimas siguiendo los protocolos convencionales (Sambrook y col., 1989).

El fragmento obtenido por la digestión con las enzimas BamHI y KpnI del plasmido pQE31-PHGST#5 fue sometido a una digestión del extremo 3' protuyente con la enzima DNA polimerasa del fago T4 (Promega, EEUU) en las siguientes condiciones: 1.5 µg de ADN, 10 U de enzima, 100 µM de deoxinucleótidos fosfato en el buffer suministrado por el proveedor durante 5' a 37 °C. La enzima fue inactivada con EDTA 0.02 M y el fragmento de ADN fue re-purificado utilizando el kit Wizard clean-up (Promega, EEUU).

El fragmento PHGST#5 con extremo 5' digerido con BamHI y extremo 3' romo proveniente del tratamiento anterior fue clonado en el vector para vacuna de ADN pcDNA3.1(+) (Invitrogen, EEUU) digerido con las enzimas BamHI y EcorRV. La selección de las bacterias recombinantes fue realizada por PCR utilizando los iniciadores específicos de PHGST#5 190 y 540R.

Para poder obtener expresión del antígeno PHGST#5 en el vector pcDNA3.1 en sistemas eucariotas, se introdujo un adaptador conteniendo el ATG de iniciación y la secuencia de Kozak (Kozak, 1997) en el extremo 5' del inserto. El plásmido recombinante pcDNA-PHGST#5 fue digerido con las enzimas HindIII y BamHI para introducir el adaptador. El adaptador estuvo conformado por dos oligonucleótidos complementarios (5' agcttgccaccatggcg 3' y 5' gatccgccatggtggac 3') que al hibridar generaron un sitio HindIII en el extremo 5' y un sitio BamHI en el 3'. Uno de los adaptadores fue fosforilado en su fosfato 5' con la enzima polinucleótido quinasa (Promega, EEUU) según el protocolo suministrado por el proveedor, para permitir su ligación al plásmido recombinante. Las colonias conteniendo el adaptador fueron

seleccionadas mediante PCR con uno de los adaptadores y el iniciador 540R.

10.7- Expresión del antígeno PHGST#5 en sistemas eucariotas *in vitro* e *in vivo*:

La evaluación de la expresión del antígeno PHGST#5 en un sistema eucariota *in vitro* se llevó a cabo mediante transfección de células COS-7. Las células se crecieron en placas de 24 hoyos conteniendo cubreobjetos redondos. Se partió de una concentración de 1.8×10^4 células/hoyo en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino inactivado 30 min a 56 °C (SFB). Luego de 24 hs se cambió el medio de cultivo por medio nuevo 3 hs antes de realizar la transfección.

Por otro lado los plásmidos pcDNA, pcDNA-PHGST#5 y pcM β (Clontech, EEUU) fueron purificados con el kit Plasmid Mega-kit (25) (Qiagen, EEUU). El ADN purificado fue tratado con cloruro de calcio según las especificaciones del kit utilizado, Promega Profection (Promega, EEUU), utilizándose para la transfección 2 μ g de ADN/ hoyo de células COS-7. Luego de 48 hs de cultivo, se tomaron los cubreobjetos con las células adheridas, las cuales se fijaron con metanol durante 15 min a 4 °C y luego se lavaron 4 veces con PBS. Posteriormente se realizó el bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente con PBS-1% leche y después de lavar 4 veces con PBS, las células se incubaron 1h y 30 min a temperatura ambiente con el primer anticuerpo: suero normal de conejo o suero de conejo anti-Tc13 diluidos 1/50 o un anticuerpo monoclonal anti- β -galactosidasa diluido 1/1000 que fue utilizado como control positivo en la transfección con pcM β . Luego de realizar los lavados con PBS, se incubó con el segundo anticuerpo 1/2 h a 37 °C: anti-IgG de conejo conjugada con biotina (DAKO, Dinamarca) o anti-IgG de ratón conjugada con fluoresceína (Sigma, EEUU) diluidos 1/100. En los

hoyos donde se utilizaron los sueros de conejo, luego de los lavados se realizó una incubación adicional con streptavidina-fluoresceína (Vector, EEUU). Los cubreobjetos se montaron con glicerina neutralizada y las células se observaron al microscopio de fluorescencia con un aumento 400x.

La evaluación de la expresión del antígeno PHGST#5 *in vivo* se realizó mediante la inoculación de 30 µg de pcDNA o pcDNA-PHGST#5 en el músculo *Tibialis anterioris* de ratones hembras de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad. Los animales fueron sacrificados a los diez días post-inoculación. Mediante una incisión realizada en la piel de la cara anterior del muslo, se identificó el músculo inoculado y se lo disecó completamente. El músculo fue inmediatamente fijado en formol buffer al 10% por no más de 24 hs. El tejido fue procesado automáticamente en concentraciones crecientes de alcoholes y xilol. Luego, los fragmentos fueron embebidos en parafina, realizándose un taco histológico con Paraplast. Posteriormente se hicieron cortes seriados de entre 3 y 5 µm de espesor, los cuales fueron montados en vidrios xilanizados y secados 24 hs en estufa a 37 °C. Los preparados fueron desparafinados en el momento de usar mediante dos pasajes de 15 min en xilol, 3 min en alcohol 100, 3 min en alcohol 96 y dos pasajes de 5 min en agua. La reacción de inmunofluorescencia se realizó con suero normal de conejo y suero anti-Tc13 en las mismas condiciones utilizadas en la transfección *in vitro*.

11) INMUNIZACIONES Y EVALUACION DE RESPUESTA INMUNE Y PROTECTIVA:

11.1) Esquemas de Inmunización plasmídica con PHGST#5 y experimentos de inmunoprotección:

Para el protocolo de inmunización plasmídica se utilizaron grupos de cinco ratones hembras de la cepa BALB/c de seis semanas de vida. El grupo control se mantuvo sin inmunizar, mientras que un grupo se inmunizó pcDNA y otro grupo con pcDNA-PHGST#5. El ADN fue purificado con el kit Plasmid Mega-kit (25) (Qiagen, EEUU) según las especificaciones del proveedor y resuspendido en PBS en una concentración de 1 mg/ml. Se aplicaron 4 dosis quincenales y una quinta dosis 21 días después de la cuarta en el músculo *Tibialis anterioris* de 50 µg de ADN/ratón/dosis. Las sangrías se realizaron 12 días después de cada dosis y los títulos de anticuerpos específicos fueron evaluados por ELISA. La respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) fue realizada 25 días después de la última dosis. El desafío fue realizado 35 días después de la última dosis, infectando con 2×10^3 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén stock tul 2. La parasitemia fue determinada por microscopía directa en 5 µl de sangre de la cola (Segura y col., 1981). A las 14 semanas post-infección los ratones sobrevivientes fueron sacrificados con el objeto de realizar un análisis patológico de los diferentes órganos.

11.2) Estudio histopatológico de los distintos órganos de los ratones sometidos a Inmunización génica e infectados crónicamente con *T. cruzi*:

Los ratones de los grupos inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 y del grupo sin inmunizar que sobrevivieron al desafío fueron sacrificados 14 semanas post-infección y se les extrajeron muestras de corazón, músculo esquelético, hígado y bazo. Las muestras obtenidas fueron conservadas en formaldehído al 4% en PBS hasta ser procesadas. Posteriormente fueron embebidas en parafina y se realizaron cortes seriados de 4 µm de espesor. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina

y eosina y se observaron cuatro cortes de cada órgano al microscopio óptico evaluando inflamación y parasitismo tisular. La intensidad de las lesiones fueron clasificadas arbitrariamente como: ausente: cuando la vista del tejido fue normal, leve: cuando se encontraron focos escasos de infiltración mononuclear, moderado: cuando se observaron focos inflamatorios confluentes y severo: al observarse infiltración inflamatoria difusa (Ruiz y col., 1986).

11.3) Esquema de Inmunización con PHGST#5 recombinante y experimentos de inmunoprotección:

En el protocolo de vacuna recombinante se inmunizaron grupos de 10 ratones machos de la cepa BALB/c de seis semanas de vida por vía intraperitoneal con 5 dosis semanales de 50 µg/dosis/ratón de MBP-PHGST#5 o MBP como control utilizando *Bordetella pertussis* como adyuvante (1.25×10^9 U/dosis/ratón). Los ratones fueron sangrados 7 días después de la tercera y quinta dosis para evaluar la respuesta de anticuerpos específicos. La DTH fue realizada 21 días después de la última dosis. El desafío fue realizado 43 días después de la última dosis con 1000 tripomastigotes metacíclicos de la cepa Tulahuén stock Tul2.

La parasitemia fue determinada por microscopía directa en 5 µl de sangre de la cola (Segura y col., 1981).

11.4) Respuesta de hipersensibilidad retardada de los ratones Inmunizados con PHGST#5:

Los ratones sometidos a inmunización plasmídica fueron inoculados con 3 µg de MBP-PHGST#5 electroeluido y los inmunizados con los antígenos recombinantes fueron inoculados con 50 µg de lisados de tripomastigotes en la almohadilla plantar de una de las patas traseras.

El espesor de las patas fue medido antes de la inoculación y a las 24 y 48 hs post-inoculación con un micrótopo (Minutoyo, Japón). El índice de induración fue calculado como la relación de la pata inoculada a las 24 y 48 hs con respecto al grosor de la misma pata antes de la inoculación.

12) ANALISIS INMUNOENZIMATICO DE PROTEINAS ELECTROTRANSFERIDAS A NITRATO DE CELULOSA ("WESTERN BLOT"):

En general, los antígenos separados por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS fueron electrotransferidos a membranas de nitrato de celulosa en solución Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20 % v/v de metanol en una cuba de transferencia Mini Protean II (Bio Rad, EEUU) a 40 Volts durante toda la noche a 4 °C. Las proteínas transferidas se visualizaron mediante la tinción reversible con Ponceau 10% (Sigma, EEUU). Las tiras de nitrocelulosa para inmunodetección se lavaron en PBS durante 10' y se bloquearon en PBS-5% leche durante una hora a temperatura ambiente. Las nitrocelulosas bloqueadas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS-1% leche durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavaron 4 veces durante 5 min con PBS, se incubaron 1 hora con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y luego de 4 lavados con PBS se agregó el sustrato para peroxidasa α -cloro naftol 0.5 mg/ml, H₂O₂ 0.025% en PBS conteniendo 0.96% de metanol. Una vez alcanzado el nivel de coloración deseado la reacción se detuvo con agua destilada.

Ensayo de "western blot" con suero anti-GSTsj sobre fracciones parasitarias:

Cuarenta μ g de HT de *T. cruzi*, FS de *T. cruzi* y HT de *Leishmania brasiliensis* (donado por Carlos Pravia, Instituto Nacional de

Parasitología) y 5 µg de GSTsj purificada se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 12% con SDS. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: suero de conejo anti-GSTsj, suero normal de conejo y suero de conejo anti-epimastigotes diluidos 1/1000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Vector, EEUU) en una dilución 1/1000 sobre los HT y la FS y en una dilución 1/5000 sobre la GSTsj pura.

Ensayo de “western blot” con suero anti-GSTsj sobre el clon PHGST#5 inducido:

Los sonicados de las bacterias no inducidas e inducidas con IPTG conteniendo los plásmidos pBluescript, pBluescript-PHGST#5 y pGEX-1 se trataron según se especificó en la sección 10.2 de “Materiales y métodos”. Todos ellos fueron separados mediante electroforesis en un gel 12% de poliacrilamida con SDS. Como anticuerpo primario se utilizaron: suero anti-GSTsj y suero normal de conejo, pre-adsorbidos con bacteria y fago salvaje, diluidos 1/1000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Vector, EEUU) en una dilución 1/1000.

13) ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA):

Los antígenos diluidos en PBS en un volumen final de 50 µl se acoplaron a placas de poliestireno de 96 orificios durante toda la noche a 4 °C en las siguientes concentraciones: HT de *T. cruzi*: 20 µg/ml, GSTsj: 20 µg/ml, lisado de tripomastigotes: 15 µg/ml, MBP-PHGST#5: 10 µg/ml y MBP: 2 µg/ml.

Las placas fueron bloqueadas con PBS-5% leche durante 1 hora a temperatura ambiente. Como control de pegado inespecífico se utilizaron orificios bloqueados solamente con PBS-5% leche.

La dilución de los sueros se realizó en PBS-1% leche en forma seriada en un factor de dos a partir de 1/25 hasta 1/3200 para los sueros anti-GST y suero normal de conejo sobre HT de *T. cruzi*, y a partir de 1/1000 hasta $1/204 \times 10^4$ para estos mismos sueros sobre GSTsj. Los sueros de los ratones inmunizados con vacuna de ADN se combinaron en "pooles" y se diluyeron 1/100, al igual que los controles normales y los sueros de ratones con infección crónica con *T. cruzi*. Los sueros de los ratones inmunizados con proteínas recombinantes se combinaron en "pooles" y se diluyeron 1/200 con competencia con 20 µg/ml de MBP cuando se evaluaron utilizando como antígenos MBP y MBP-PHGST#5 y se diluyeron 1/100 cuando se evaluaron sobre tripomastigotes. Los sueros anti-Tc13 y suero normal de conejo se diluyeron 1/2500 en los ELISAS que se utilizaron MBP, MBP-PHGST#5 y lisados de tripomastigotes como antígenos. La incubación de los sueros se realizó durante una hora a temperatura ambiente.

Luego de tres lavados con PBS se incubó con el segundo anticuerpo: anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo acoplada a la enzima peroxidasa (Vector, EEUU) diluidos 1/2000 y 1/5000 en PBS-leche al 1 % p/v, respectivamente.

Luego de lavar, el revelado se realizó con o-fenilenediamina dihidrocloruro (OPD) 0.4 mg/ml en una solución de buffer citrato pH=5 con 0.024% de H₂O₂. La DO a 490 nm fue medida en un lector de microplaas Microplate Reader 700 (Dynatech, EEUU).

Discusión general

En el Trabajo de Tesis se utilizó a la enzima glutatión-S-transferasa (GST) como hilo conductor para la búsqueda de nuevos posibles blancos para el control de la transmisión de la infección por *T. cruzi*. La selección de esta enzima para encarar esta búsqueda se basó principalmente en tres aspectos:

1) La actividad de GST está presente en *T. cruzi* (Yawetz y Agosin, 1980), e incluso una GST heterodimérica llegó a ser purificada a homogeneidad con propiedades diferentes a las GSTs de mamíferos (Yawetz y Agosin, 1981), pero hasta el momento no fue posible identificar algún gen que codifique para esta enzima

2) La GST es una enzima de detoxificación que forma parte del ciclo del glutatión. Este metabolismo es un punto de gran divergencia entre *T. cruzi* y el hospedero mamífero, especialmente basado en la presencia de la tripanotiona y la enzima tripanotiona reductasa en el parásito, equivalente al sistema glutatión-glutatión reductasa del mamífero (Fairlamb y Cerami, 1992). La identificación de nuevos componentes de este ciclo en el parásito puede permitir la obtención de blancos potenciales para el diseño de drogas tripanocidas.

3) La inmunización con una fracción de *T. cruzi* con actividad de GST induce respuesta protectora en modelos experimentales (Plumas-Marty y col., 1992; Plumas-Marty y col., 1993).

Para identificar en *T. cruzi* proteínas que presentaran relación con GSTs se utilizaron dos metodologías. En la primera parte del trabajo se seleccionaron del banco de datos de ESTs, secuencias de ADNc generadas como producto del Proyecto Genoma, aquellos clones homólogos a GSTs con el objeto de definir nuevos componentes del metabolismo del GSH que pudieran postularse como posibles blancos para el diseño de agentes tripanocidas. En la segunda parte, dado que las GSTs son muy conservadas estructuralmente y sabiendo que existen en *T. cruzi*

antígenos de reactividad cruzada con la GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum* que aun no han sido totalmente caracterizados (Gruber y Zingales, 1992), se utilizó un antisuero contra esta enzima para identificar y obtener aquellos antígenos a fin de evaluarlos en protocolos de inmunoprotección experimental.

La búsqueda en el banco de datos de ESTs permitió identificar dos clones que presentaron un 40% de similitud con una probable GST de *Caenorhabditis elegans*. La secuencia compartida entre ambos clones fue ciento por ciento idéntica. Mediante la hibridación de una genoteca de *T. cruzi* construida en cósmidos con uno de los clones se obtuvo la secuencia del gen completo, el cual se denominó *TcGRX*, ya que la secuencia aminoacídica deducida a partir del gen presentó el patrón completo del sitio activo de las Grxs. El producto de este gen mostró similitud con Grxs bacterianas y GSTs de diversos organismos, pero no con enzimas de mamíferos.

Si bien, en este trabajo de tesis no se realizó la caracterización bioquímica de la *TcGRX* recombinante, debido a que formó cuerpos de inclusión en el sistema heterólogo utilizado, resulta interesante analizar ciertos aspectos en relación con las secuencias proteicas de los bancos de datos con las que la *TcGRX* presenta mayor similitud:

- 1) Las secuencias proteicas de los bancos de datos que presentan mayor identidad con *TcGRX* corresponden a genes cuyos productos aún no han sido caracterizados desde el punto de vista funcional. Así, la secuencia de la GST de *C. elegans*, surgió como producto del Proyecto Genoma de este organismo (Wilson y col., 1994) y la Su(P) de *Drosophila melanogaster*, que presenta un 26.3% de identidad a lo largo de toda la secuencia de *TcGRX*, fue propuesta como posible transportadora de electrones, pero hasta el momento no hay resultados publicados que avalen esta hipótesis (Dr. D. Contamine, comunicación personal).

2) La enzima caracterizada funcionalmente que presenta mayor similitud con la TcGRX es la Grx 2 de *E. coli*, la cual fue clasificada como una Grx atípica debido a su alto peso molecular, baja homología y diferencias bioquímicas con respecto a las Grxs clásicas (Aslund y col., 1994; Vlamis-Gardikas y col., 1997).

3) La TcGRX presenta similitud con GSTs de las clases más ancestrales.

4) La similitud de la TcGRX con dos Grxs cristalizadas, la Grx 3 de *E. coli* y la Trx del fago T4, que también actúa funcionalmente como Grx (Holmgren, 1978), permitió realizar el modelado molecular de una porción de esta secuencia proteica sobre ambos templados sugiriendo que la TcGRX posee la estructura típica de la familia Trx/Grx (Martin, 1995). Esta estructura tridimensional es la misma presente en el dominio N-terminal de las GSTs, en el cual se une el GSH (Martin, 1995).

Según las homologías de secuencia y la probable estructura tridimensional, la TcGRX podría en primer lugar, ser clasificada como Grx dado que contiene la secuencia completa del probable sitio activo característico de estas enzimas. Sin embargo, se quiere resaltar que esta proteína presenta similitud principalmente con una Grx atípica y con clases ancestrales de GSTs, lo cual puede relacionarse con la hipótesis reciente que postula que las GSTs habrían evolucionado a partir de un ancestro de la familia Trx/Grx (Rossjohn y col., 1998; Board y col., 2000). Conjuntamente, esto permite especular que la TcGRX pertenecería a alguna sub-clase intermediaria entre las familias de Grxs y GSTs. La caracterización bioquímica de la misma determinará si puede clasificarse dentro de la misma sub-clase que la Grx 2 de *E. coli*, teniendo en cuenta que esta enzima no posee actividad de GST, no reduce a la ribonucleótido reductasa pero sí posee actividad de tiol transferasa (Vlamis-Gardikas y col., 1997). Por otro lado, cabe mencionar que ciertas clases de GSTs, como la Omega, presentan también las actividades de tiol transferasa y dehidroascorbato reductasa típicas de las Grx (Board y col., 2000). Por lo

tanto, habría que determinar si la TcGRX posee ambas actividades. El hecho que las secuencias proteicas con mayor homología con la TcGRX aun no se hayan caracterizado funcionalmente abre la posibilidad de la existencia de una clase de enzimas todavía no descripta.

Es importante destacar en esta discusión que ya fue purificada y clonada una Grx en *T. cruzi*, la Tc52 (Schoneck y col., 1994; Moutiez y col., 1995), la cual no posee actividad de GST. Esta enzima sólo presenta un 16% de identidad con la TcGRX, específicamente en la región del sitio activo, demostrando que son dos proteínas diferentes.

Los análisis realizados en este trabajo sugieren que la TcGRX podría estar involucrada en el metabolismo del glutatión y/o tripanotona. Esto sumado a que el gen que la codifica se encuentra en copia única y es funcional, ya que la secuencia original proviene de un ARNm, plantea grandes expectativas en descifrar su ubicación en el metabolismo del glutatión en *T. cruzi*. Mediante su caracterización bioquímica se podrá confirmar si la TcGRX es un nuevo blanco posible para el desarrollo de drogas tripanocidas.

En la segunda parte del Trabajo de Tesis se identificaron y caracterizaron antígenos de *T. cruzi* con epitopes compartidos con la GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum* (GSTsj). Si bien filogenéticamente *Trypanosoma* y *Schistosoma* no están relacionados, varios aspectos llevaron a elegir esta enzima como herramienta para identificar componentes en *T. cruzi* como posibles blancos para el control de la transmisión: la estructura tridimensional sumamente conservada que presentan las GSTs, la falta de una completa caracterización de los antígenos del parásito con reactividad cruzada con esta enzima (Gruber y Zingales, 1992) y la facilidad de obtención de la GSTsj en forma pura dado que es expresada por el plásmido comercial pGEX (Pharmacia/Biotech) (Smith y Johnson, 1988).

Mediante cromatografía de afinidad utilizando un suero de conejo anti-GSTsj se purificó una fracción a partir de epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, denominada PHGST, que contiene al menos 10 proteínas con un peso molecular de 8.4 a 56.1 kDa. La fracción PHGST presentó actividad de GST utilizando el sustrato convencional, CDNB. La actividad específica obtenida fue acorde al número de proteínas purificadas y a los datos publicados por otros autores para purificaciones parciales y a homogeneidad de esta enzima (Yawetz y Agosin, 1981; Plumas-Marty y col., 1992).

Si bien la cromatografía de inmunoafinidad puede derivar en la purificación de componentes no relacionados por pegado inespecífico, el rango de pesos moleculares que presenta la fracción PHGST está dentro de lo esperado, ya que las GSTs tienen un peso molecular de aproximadamente 25 a 30 kDa (Mannervick y col., 1985) coincidente con una de las proteínas mayoritarias de la fracción, PHGST1 de 30.2 kDa y una proteína de representación intermedia, PHGST I de 25.7 kDa. Es interesante mencionar, que la purificación de componentes de *T. cruzi* mediante cromatografía de afinidad con GSH agarosa también permitió purificar una fracción con actividad de GST compuesta por tres proteínas, dos de ellas con los mismos pesos moleculares que PHGST 1 y PHGST I (Plumas-Marty y col., 1992). La secuencia N-terminal de PHGST1 mostró que la banda de 30.2 kDa observada en el gel estaba constituida por al menos 4 componentes, siendo el mayoritario la cadena Kappa del anticuerpo desprendido de la columna, y el resto, antígenos probablemente parasitarios de los cuales no pudo determinarse la secuencia aminoacídica.

El peso molecular de PHGST 2 fue 17.5 kDa, y coincide con el peso de una de las subunidades de la única GST de *T. cruzi* purificada a homogeneidad (Yawetz y Agosin, 1981).

La obtención de PHGSTs de bajo peso molecular como, PHGST4 de 10.7 kDa, PHGST II de 12.9 kDa y PHGST III de 8.4 kDa, podría relacionarse con los tamaños de las Grxs y Trxs, que poseen la misma estructura que el dominio N-terminal de las GSTs (Martin, 1995) y tienen un peso molecular de 9 a 12 kDa (Holmgren, 1989).

La secuencia N-terminal de PHGST 4 posee el perfil aminoacídico de un péptido señal característico de una proteína eucariota secretable o de membrana. Esta secuencia no presentó identidad con secuencias N-terminales en los bancos de datos de *T. cruzi*, sugiriendo que la misma aún no ha sido descrita para este parásito. La comparación en bancos de secuencias proteicas totales utilizando SSERCH en lugar de BLASTP demostró la similitud del N-terminal de PHGST 4 con proteínas bacterianas de muy bajo peso molecular ($0.15 < E < 0.51$), algunas de ellas aún no caracterizadas como una proteína probablemente secretable de 134 aa de *Streptomyces coelicolor* (pir/T36126).

La purificación de los distintos componentes de la fracción PHGST y la caracterización bioquímica de los mismos por separado permitirá definir cual o cuales de ellos poseen actividad de GST. Por otro lado, la baja proporción de secuencias con similitud con GSTs publicadas como producto del Proyecto Genoma de *T. cruzi* y la purificación de factores de elongación de la síntesis proteica con actividad de GST mediante cromatografía de afinidad con GSH en este parásito (Plumas-Marty y col., 1992; Billaut-Mullot y col., 1993), sugieren la presencia de una GST en *T. cruzi* que no posee las características convencionales, haciendo muy difícil su obtención por los procedimientos de purificación y biología molecular convencionales.

El rastreo de una biblioteca genómica de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* (Búa y col., 1999) con el suero anti-GSTsj resultó en la selección de 38

clones, todos ellos pertenecientes a la familia Tc13 de la superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes o familia de las transialidasas (Campetella y col., 1992; Frasch, 2000). La homogeneidad de los clones obtenidos fue corroborada por amplificación del ADN con oligonucleótidos específicos de esta familia, hibridación cruzada y en algunos clones mediante secuencia del extremo 5'. Sólo se realizó la secuencia completa de uno de los clones, el clon PHGST#5, por lo tanto, la secuenciación completa de los clones restantes podrá determinar si todos codifican para el mismo antígeno o para distintas variantes de antígenos Tc13 que componen la familia.

Los antígenos de la familia Tc13 no presentan homología con GSTs, y si bien aun no está claramente definida la función de los mismos (Frasch, 2000) lo más probable es que no tengan ningún tipo de relación funcional con esta enzima. La obtención de los mismos en el rastreo inmunológico podría deberse a dos causas, a una reacción inespecífica del suero, dada la gran hidrofiliidad de sus repeticiones C-terminales, EPKSA, presentes en estos antígenos o a la presencia de epitopes de reacción cruzada entre la GSTsj y la familia Tc13. La verificación de esta última hipótesis no es sencilla y no fue desarrollada en este trabajo pero cabe mencionar que la reactividad del suero anti-GSTsj por el antígeno codificado por el clon PHGST#5 fue corroborada en ensayos de "western blot" sobre un sonicado de la bacteria recombinante inducida.

La secuenciación del clon PHGST#5 determinó la ausencia de la porción 5' del gen, al igual que los otros miembros ya descriptos de la familia Tc13 de la cepa CA-I (Campetella y col., 1992). La hibridación de una genoteca de *T. cruzi* construida en cósmidos (Hanke y col., 1996) utilizando como sonda este clon permitió identificar el primer gen Tc13 completo, el cuál fue denominado *Tc13 CL*, por pertenecer al clon CL Brener.

La comparación de las secuencias proteicas deducidas a partir del clon PHGST#5 y del gen *Tc13 CL* con los miembros ya descritos de la familia Tc13 de la cepa CA-I permitió definir dos grupos. Un grupo al cual pertenecen Tc13N.5 y Tc13 CL caracterizado por tener una única repetición EPKSA, la secuencia de anclaje por GPI (Gerber y col., 1992) y el péptido señal en el extremo N-terminal (sólo se observó en la secuencia completa Tc13 CL), y otro grupo compuesto por PHGST#5, Tc13 y Tc13.1 que posee múltiples repeticiones EPKSA y no tienen secuencia para anclaje por GPI. Dado que no se conocen las secuencias de las porciones 5' de los genes que codifican para el segundo grupo, existe la posibilidad que los mismos sean pseudogenes, ya que su presencia fue descrita en la familia de las transialidasas (Takle y col., 1992). La secuenciación completa y el estudio de la expresión de los distintos genes permitirán definir la presencia de pseudogenes en esta familia. Los antígenos Tc13 se localizan en la superficie de los amastigotes y tripomastigotes (Souto-Padrón y col., 1989; Burns y col., 1992) en la zona de la membrana que cubre el cuerpo celular y en el bolsillo flagelar; esta observación llevó a postular la secreción de estos antígenos en este sitio (Souto-Padrón y col., 1989). La presencia de posibles antígenos Tc13 con y sin secuencia de anclaje para GPI sugeriría, por otro lado, la existencia de variedades de membrana y secretables de estos antígenos.

La hibridación de "cromoblots" del clon CL Brener y de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* con el clon PHGST#5 demuestra que los genes de la familia Tc13 se encuentran localizados principalmente en el cromosoma III y su homólogo de 1020 kpb (Hanke y col., 1998) y minoritariamente en cromosomas de otros tamaños. El genoma de *T. cruzi* es muy plástico, variando el cariotipo observado por corridas electroforéticas en campo pulsado de acuerdo a la cepa y a las condiciones de corridas utilizadas (Henriksson y col., 1990; Henriksson y col., 1995; Santos y col., 1997 a). En el clon CL Brener se llegaron a identificar hasta 42 bandas

cromosomales utilizando 13 condiciones de electroforesis diferentes (Henriksson y col., 1995). La localización de los genes *Tc13* en varios cromosomas coincide con lo observado por otros autores (Henriksson y col., 1990; Henriksson y col., 1995) y con la presencia de diversas variantes de estos genes en el parásito (Burns y col., 1992). Si bien los resultados publicados por Henriksson y colaboradores no indican la localización de los mismos en el cromosoma III, en este trabajo de tesis se presentan varias evidencias de este hecho, ya que además del aval de las hibridaciones de “cromoblots” provenientes de dos cepas y dos condiciones electroforéticas diferentes, los clones de la genoteca de *T. cruzi* construida en cósmidos que son más fuertemente reconocidos con la sonda PHGST#5 pertenecen al cromosoma III (Hanke y col., 1998) y la secuencia completa del gen *Tc13 CL* se obtuvo como resultado de la secuenciación de este cromosoma como parte del Proyecto Genoma de *T. cruzi* (Dr. B. Andersson, comunicación personal).

La hibridación de “cromoblots” provenientes de epimastigotes de la cepa Tulahuén cosechados a distintos tiempos de cultivos asincrónicos y sincronizados con hidroxIUrea (Galanti y col., 1994) utilizando como sonda el clon PHGST#5 sugiere una estabilidad del cariotipo de este parásito a lo largo del ciclo celular, ya que el patrón de cromosomas hibridados no varió en función del tiempo de cultivo. La hibridación de estos “cromoblots” utilizando como sondas otros genes de *T. cruzi* como, las histonas H1, H2 y H3, que están localizadas en cromosomas de diferentes tamaños avalan los resultados obtenidos con el clon PHGST#5 (Dra. J. Búa, comunicación personal).

La evaluación del antígeno PHGST#5 en protocolos de inmunoprotección experimental fue avalada por tres hechos fundamentales:

1) La presencia de la familia Tc13 en los estadios amastigote y tripomastigote de *T. cruzi* (Souto-Padrón y col., 1989), ambas formas del parásito presentes en el hospedero mamífero.

2) Las funciones inmunomoduladoras descritas para ciertos antígenos de la superfamilia de antígenos de superficie (Frasch, 1994; Norris y Schrimpf, 1994; Buscaglia y col., 1998).

3) La participación de algunos antígenos de la superfamilia en una respuesta inmune protectora contra la infección por *T. cruzi* (Wizel y col., 1997; Kahn y Wleklinski, 1997; Miller y Kahn, 2001).

La inmunización con PHGST#5 fue llevada a cabo mediante dos enfoques diferentes que involucran distintas tecnologías. Por un lado, se ensayó la inmunización plasmídica o vacuna de ADN, inoculando un plásmido para expresión en eucariotas conteniendo el gen *PHGST#5*, denominado pcDNA-PHGST#5. Por otro lado, se ensayó la inmunización con la proteína recombinante MBP-PHGST#5 proveniente de la expresión de este gen en un sistema procariota. Si bien es inevitable una comparación entre ambas técnicas, no hay que dejar de tener en cuenta que los protocolos utilizados son diferentes en cuanto al sexo de los ratones y a la forma del parásito empleada para el desafío. La inmunización plasmídica fue realizada por vía intramuscular en ratones hembras, ya que en otros sistemas demostraron mejores respuestas que la de los ratones machos (Davis y col., 1993) y la elección del protocolo de inmunización y desafío con tripomastigotes sanguíneos fue basada en los trabajos publicados sobre vacuna de ADN para la infección con *T. cruzi* (Costa y col., 1998; Wizel y col., 1998 b; Sepulveda y col., 2000). La inmunización con la proteína recombinante se llevó a cabo por vía intraperitoneal en ratones machos utilizando *Bordetella pertussis* como adyuvante, tomándose como base la experiencia previa del laboratorio en experimentos de inmunoprotección tanto con fracciones purificadas como con proteínas recombinantes (Ruiz y col., 1986; Esteva y col.,

1995). En base a estos protocolos y con el objeto de simular la infección natural, el desafío se realizó con tripomastigotes metacíclicos (Ruiz y col., 1985; Ruiz y col., 1986; Esteva y col., 1995).

La inmunización génica con PHGST#5 utilizando como vector el plásmido pcDNA3.1 no indujo la producción de anticuerpos específicos. Si bien estos animales mostraron una leve respuesta de hipersensibilidad retardada a la inoculación con MBP-PHGST#5, se considera que la misma no pudo ser bien evaluada debido a un efecto inflamatorio producido por sustancias tóxicas en la preparación de antígeno. La inmunización con MBP-PHGST#5 indujo tanto una respuesta de anticuerpos específicos como una respuesta de hipersensibilidad retardada luego de 24 hs de la inoculación de lisados de tripomastigotes. La falta de inducción de una respuesta humoral específica mediante la inmunización plasmídica con PHGST#5 fue corroborada por varias técnicas, debido a que fue un resultado llamativo dado que la inmunización génica con diversos antígenos tanto de *T. cruzi* como de otros protozoarios generalmente generan una respuesta de anticuerpos (Sedegah y col., 1994; Costa y col., 1998; Nielsen y col., 1999; Spulveda y col., 2000). Sin embargo, la inmunización génica con el antígeno TSA-1 perteneciente al grupo 2 de la superfamilia de antígenos de superficie no generó una respuesta humoral en ratones de la cepa C57 BL/6 cuando se inoculó sin las repeticiones C-terminales (Wizel y col., 1998 b), lo cual indica la importancia de la presencia o ausencia de estas secuencias y la cepa de ratón utilizada.

Tanto la inmunización con el plásmido como la inmunización con la proteína recombinante del antígeno PHGST#5 produjeron una disminución significativa de la parasitemia luego del desafío con formas infectantes del parásito. Mientras que la diferencia de parasitemia se mantuvo a lo largo de toda la curva entre los ratones inmunizados con MBP-PHGST#5 y MBP; los ratones inmunizados con pcDNA-PHGST#5

presentaron una disminución de la parasitemia con respecto al grupo inmunizado con pcDNA sólo en los primeros días de la infección (hasta el día 17 post-infección), manteniendo la diferencia con respecto al grupo control sin inmunizar hasta el día 25 post-infección. La reducción de la parasitemia del grupo inmunizado con pcDNA con respecto al grupo sin inmunizar en algunos puntos de la curva puede ser adjudicada al efecto adyuvante que presentan los motivos CpG presentes en el ADN plasmídico (Tokunaga y col., 1984). Los CpG favorecen la secreción de citoquinas de tipo Th1 (Klinman y col., 1996; Chu y col., 1997), las cuales juegan un rol fundamental en la resistencia a la infección por *T. cruzi* (Zhang y Tarleton, 1996; Hoft y col., 2000).

La sobrevida luego del desafío fue del 100 % en los grupos inmunizados con pcDNA y pcDNA-PHGST#5 y del 80% en el control sin inmunizar, mientras que en el protocolo de vacuna recombinante se obtuvo un 100% de sobrevida en los controles sin inmunizar e inmunizados con MBP y un 80% en el grupo inmunizado con MBP-PHGST#5. Aunque la inmunización con PHGST#5 disminuyó la parasitemia, el 20% de los animales no fue capaz de controlarla, alcanzando parasitemias mayores a los grupos controles y no tolerando la infección. Si bien es necesario realizar experimentos desafiando con mayor número de parásitos a fin de lograr una mayor mortalidad en los grupos controles, estos resultados sugerirían un efecto de MBP-PHGST#5 que podría relacionarse con la hipótesis que postula que la presencia de epitopes inmunodominantes en algunos antígenos de esta superfamilia, como lo son las repeticiones C-terminales, enmascaran los epitopes capaces de generar una respuesta inmune protectora (Frash y col., 1991; Wrightsman y col., 1994; Frash, 2000). En relación a esta hipótesis la sobrevida del 100% en el grupo inmunizado con pcDNA-PHGST#5 podría atribuirse al efecto adyuvante del pcDNA mencionado anteriormente.

Desde el punto de vista histopatológico, la inoculación con pcDNA-PHGST#5 generó menor desarrollo de lesiones en miocardio, músculo esquelético, hígado y bazo, así como también una disminución del parasitismo tisular en la infección crónica por *T. cruzi* en comparación con el grupo control sin inmunizar y el grupo inmunizado con pcDNA.

La disminución de la parasitemia en la fase aguda de la infección en los ratones inmunizados con PHGST#5, tanto en forma plasmídica como recombinante, y la disminución de la patología en la fase crónica observada en los animales inmunizados con vacuna de ADN valorizan el concepto de obtener una vacuna profiláctica que impida el desarrollo de la enfermedad de Chagas, en contraposición con la obtención de una vacuna esterilizante.

La falta de inducción de anticuerpos y la leve respuesta de hipersensibilidad retardada generada por los animales inoculados con pcDNA-PHGST#5, conjuntamente con la obtención de una disminución de la parasitemia y mortalidad en la fase aguda y de la patología en la fase crónica, sugieren la participación de una respuesta celular protectora CD8 Tc1, la cual demostró ser predominante en la inmunización plasmídica con miembros de la superfamilia (Rodrigues y col., 1999). La realización de una caracterización detallada de la respuesta inmune generada por la inmunización con el antígeno PHGST#5, evaluando el perfil de citoquinas producidas, la inmunización con el mismo con y sin las repeticiones C-terminales y el estudio del efecto de la co-inoculación de diversas citoquinas permitirán conocer los mecanismos empleados por este antígeno para dar resistencia a la infección.

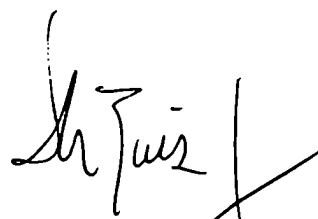
Por último, se puede concluir que la selección de las GSTs para dirigir la definición de nuevos posibles blancos para el control de la transmisión de la infección por *T. cruzi* permitió identificar el gen *TcGRX*, cuyo producto por no poseer contraparte en el mamífero, luego de la

caracterización bioquímica podría postularse como posible blanco para el diseño de drogas e identificar el antígeno PHGST#5, un miembro de la familia Tc13 de la cepa Tulahuén, definiendo su efecto inmunoprotector tanto de la infección como de la patología chagásica, valorizando la obtención de una vacuna terapéutica.



Lic. Gabriela Andrea García

Tesista



Dr. Andrés Mariano Ruiz

Director de Tesis

En ciencia no se puede improvisar, es necesaria una preparación previa, que es larga y exige esfuerzo y dirección acertada.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La selección de las GSTs para dirigir la definición de nuevos posibles blancos para el control de la transmisión de la infección por *T. cruzi* permitió:

- La identificación y caracterización de un nuevo gen de copia única en *T. cruzi*, el gen *TcGRX*, cuyo producto presenta homología con Grxs y GSTs de diversos organismos y no posee contraparte en mamíferos.
- La purificación de una fracción de epimastigotes de *T. cruzi* que posee actividad de GST mediante cromatografía de afinidad con un suero anti-GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum* (fracción PHGST). Dicha fracción está conformada por al menos diez proteínas con pesos moleculares coincidentes con GSTs y Grxs.
- La identificación de un nuevo antígeno de la familia Tc13 de la Superfamilia de Antígenos de Superficie de Tripomastigotes (PHGST#5) con probables epitopes compartidos con la GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum*.
- La identificación de PHGST#5 como un antígeno protector tanto de la infección por *T. cruzi* como del desarrollo de la patología chagásica.

Los resultados presentados en este Trabajo de Tesis alientan a:

- La realización de la caracterización bioquímica de la TcGRX a fin de definir un nuevo posible blanco para el diseño de drogas tripanocidas.
- La separación y caracterización de los componentes de la fracción PHGST con el objeto de identificar la o las proteínas que presentan actividad de GST y compararla con las enzimas de mamíferos.
- Continuar con los ensayos de protección experimental con el antígeno PHGST#5 con la intención de reafirmar y mejorar su capacidad inmunoprotectora contra la infección por *T. cruzi*.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A., Murphy, K. & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787-793.
- Affranchino, J., Ibañez, C., Luquetti, A., Rassi, A., Reyes, M., Macina, R., Aslund, L., Pettersson, U. & Frasch, A. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 34, 221-228.
- Affranchino, J., Pollevick, G. & Frasch, A. (1991). The expression of the major shed *Trypanosoma cruzi* antigen results from the developmentally-regulated transcription of a small gene family. *FEBS Letters*, 280, 316-320.
- Agabian, N. (1990). Trans-splicing of nuclear pre-mRNA. *Cell*, 61, 1157-1160.
- Agüero, F., Verdun, R., Frasch, A. & Sanchez, D. (2000). A random sequencing approach for the analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome: general structure, large gene and repetitive DNA families and gene discovery. *Genome Res*, 10, 1996-2005.
- Agusti, R., Couto, A., Campetella, O., Frasch, A. & Lederkremer, R. (1997). The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two different lipids. *Glycobiology*, 7, 731-735.
- Akira, S. (2000). The role of IL-18 in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12, 59-63.
- Aliberti, J., Cardoso, M., Martins, G., Gazzinelli, R., Vieira, L. & Silva, J. (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.*, 64, 1961-1967.
- Allaoui, A., François, C., Zemzoumi, K., Guilvard, E. & Ouaisi, A. (1999). Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele. *Mol. Microbiol.*, 32, 1273-1286.
- Almeida, D., Carvalho, A., Branco, J., Pereira, A., Correa, L., Vianna, P., Buffolo, E. & Martinez, E. (1996). Chagas disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J. Heart Lung Transplant*, 15, 988-992.
- Altschul, S. (1998). Fundamentals of database searching. En M. Patterson & M. Handel (Eds.), *Trends guide to bioinformatics* (pp. 7-9). Cambridge (UK). Elsevier Science.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- Andersson, B., Aslund, L., Tammi, M., Tran, A., Hoheisel, J. & Pettersson, U. (1998). Complete sequence of a 93.4 kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand-switch region. *Genome Res.*, 809-816.
- Andrade, Z., Andrade, S., Correa, R., Sadigursky, M. & Ferrans, V. (1994). Myocardial Changes in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. Ultrastructural Evidence of Immune Damage and the Role of Microangiopathy. *Am. J. Pathol.*, 144, 1403-1411.
- Antúnez, M. & Cardoni, R. (2000). IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol. Letters*, 71, 103-109.

- Antúñez, M. & Cardoni, R. (2001). Early IFN- γ production is related to the presence of IL-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Manuscrito en preparación.
- Ariyanayagam, M. & Fairlamb, A. (1997). Diamine auxotrophy may be a universal feature of *Trypanosoma cruzi* epimastigote. Mol. Biochem. Parasitol., 84, 111-121.
- Åslund, F., Ehn, B., Miranda-Vizueté, A., Pueyo, C. & Holmgren, A. (1994). Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9813-9817.
- Bader, R. & Leisinger, T. (1994). Isolation and characterization of the *Methylophilus* sp. strain DM11 gene encoding dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase. J. Bacteriol., 176, 3466-3473.
- Basombrio, M. & Besuschio, S. (1982). *Trypanosoma cruzi* culture used as vaccine to prevent chronic Chagas' disease. Infect. Immun., 36, 351-356.
- Ben Younes-Chennoufi, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Tricottet, V., Eisen, H., Reynes, M. & Said, G. (1988). Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82, 77-83.
- Billaut-Mulot, O., Pommier, V., Schoneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., Capron, A. & Ouassii, M. A. (1993). Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1 γ . Nucleic Acids Res., 21, 3901.
- Bitonti, A., Bacchi, C., McCann, P. & Sjoerdsma, A. (1985). Catalytic irreversible inhibition of *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase by substrate and product analogs and their effect in murine trypanosomiasis. Biochem. Pharmacol., 34, 1773-1777.
- Bittencourt, A. (1988). Parasitic infection in pregnancy and the new born. En C Macleod (Ed.), American Trypanosomiasis (Chagas' disease) (pp. 62-86). Oxford. Oxford Medical Publication.
- Blandon, R., Guevara, J. & Johnson, C. (1969). Tránsito esofágico en pacientes con enfermedad de Chagas en Panamá. Arq. Gastroenterol., 189.
- Blocki, F., Ellis, L. & Wackett, L. (1993). MIF protein are theta-class glutathione S-transferase homologs. Protein Sci, 2, 2095-2102.
- Board, P., Coggan, M., Wilce, M. & Parker, M. (1995). Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases. Biochem. J., 311, 247-250.
- Board, P., Baker, R., Chelvanayagam, G. & Jermini, L. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. Biochem. J., 328, 929-935.
- Board, P., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastal, S., Jermini, L., Schulte, G., Danley, D., Hoth, R., Griffor, M., Kamath, A., Rosner, M., Chrunk, B., Perregaux, D., Gabel, C., Geoghegan, K. & Pandit, J. (2000). Identification, characterization and crystal structure of the Omega class glutathione-S-transferase. J. Biol. Chem., 275, 24798-24806.

- Boinain, E. & Rassi, A. (1979). Terapeutica etiologica da doenca de Chagas. Arch. Bras. Cardiol., 32, 395.
- Bond, C., Zhang, Y., Berriman, M., Cunningham, M., Fairlamb, A. & Hunter, W. (1999). Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure based discovery of new natural products inhibitors. Structure, 7, 81-89.
- Borges, A., Cunningham, M., Tovar, J. & Fairlamb, A. (1995). Site directed mutagenesis of the redox-active cysteines of *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Biochem., 228, 745-752.
- Botelho-Chavez, L., Briones, M. & Schenkman, S. (1993). Transialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigote is expressed at the stationary growth phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigote. Mol. Biochem. Parasitol., 61, 97-106.
- Boveris, A., Sies, H., Martino, E. E., Docampo, R., Turrens, J. F. & Stoppani, A. O. M. (1980). Deficient metabolism utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. Biochem. J., 188, 643-8.
- Brandao, A., Urmenyi, T., Rondinelli, E., Gonzalez, A., Miranda, A. & Degraeve, W. (1997). Identification of transcribed sequenced (ESTs) in the *Trypanosoma cruzi* genome project. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) 92, 863-866.
- Brenner, S., Chothia, C. & Hubbard, T. (1998). Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 6073-8.
- Bringaud, F. & Baltz, T. (1993). Differential regulation of two distinct families of glucose transporter gene in *Trypanosoma brucei*. Mol. Cell. Biol., 13, 1146-1154.
- Britto, C., Cardoso, A., Silveira, C., Macedo, V. & Fernandes, O. (1999). Polimerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after treatment. Medicina (Buenos Aires), 59, 176-178.
- Brophy, P. & Pritchard, D. I. (1994). Parasitic helminth glutathione-S-transferase: an update on their potential as targets for immuno and chemotherapy. Exp. Parasitol., 79, 89-96.
- Bruzik, J. & Steitz, J. (1990). Spliced leader RNA sequences can substitute for the essential 5' end of U1 RNA during splicing in a mammalian in vitro system. Cell, 62, 889-899.
- Búa, J., García, G., Galindo, M., Galanti, N. & Ruiz, A. (1999). Correlación entre el mapa transcripcional y el cariotipo. Caracterización molecular de un antígeno de superficie de la familia Tc13. Medicina, 59, 11-17.
- Buchanan, B., Schurmann, P., Decottignies, P. & Lozano, R. (1994). Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. Arch. Biochem. Biophys., 314, 257-260.
- Buetler, T. & Eaton, D. (1992). Complementary DNA cloning, messenger RNA expression, and induction of alpha-class glutathione S-transferases in mouse tissues. Cancer Res., 52(2), 314-8.

- Burgess, D. E. & Hanson, W. L. (1980). *Trypanosoma cruzi*: The T-cell dependence of the primary immune response and the effects of the depletion of T-cells and Ig-bearing cells in immunological memory. *Cell. Immunol.*, 52, 176-186.
- Burkholder, J. E., Allison, T. C. & Kelly, V. P. (1980). *Trypanosoma cruzi* (Chagas) (Protozoa: Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio Grande Valley of Texas. *J. Parasitol.*, 66, 305-311.
- Burns, J., Shreffler, W., Rosman, D., Sleath, P., March, C. & Reed, S. (1992). Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1239-1243.
- Buscaglia, C., Alfonso, J., Campetella, O. & Frasch, A. (1999). Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of protein in blood. *Blood*, 6, 2025-2032.
- Buscaglia, C., Campetella, O., Leguizamon, M. & Frasch, A. (1998). The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. *J. Infect. Dis.*, 177, 431-436.
- Cabeza-Meckert, P., Chambo, J. & Laguens, R. (1991). Presence of cells producing antiheart antibodies in the inflammatory infiltrate of chronic chagasic myocarditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 60, 137-144.
- Campetella, O., Sanchez, D., Cazzulo, J. & Frasch, A. (1992). A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. *Parasitol. Today*, 8, 378-381.
- Cano, M., Gruber, A., Vazquez, M., Cortes, A., Levin, M., Gonzalez, A., Degraeve, W., Rondinelli, E., Zingales, B., Ramirez, J., Alonso, C., Requena, J. & Silveira, J. D. (1995). Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 71, 273-278.
- Carcavallo, R. & Martínez, A. (1985). Biología, ecología y distribución geográfica de los triatomíneos americanos. En R. Carcavallo, J. Rabinovich, & R. Tonn (Eds.), *Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas* (pp. 173-174). Buenos Aires, Argentina. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Servicio Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Acción Social. República Argentina.
- Cardoni, R.L. (1997). La respuesta inflamatoria en la infección aguda con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)*, 57, 227-34.
- Carnieri, E., Moreno, S. & Docampo, R. (1993). Tripanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* in different stages. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 61, 79-86.
- Carpintero, D. (1982). Enfermedad de Chagas-Mazza, la epidemia más importante del continente. *Médico Moderno (Buenos Aires)*, 3, 44.
- Carrillo, C., Cejas, S., Gonzalez, N. & Algranati, I. (1999). *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Lett.*, 454, 192-196.
- Castagnino, H., Cicco, M., Fauth, M. & Thompson, A. (1978). Miocardiopatía embolígena en la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*, 38, 35-39.

Celentano, A. & González Cappa, S. (1988). Enfermedad de Chagas y transfusión sanguínea. Actividad tripanocida del clorhidrato de maprotilina y del violeta de genciana. *Medicina (Buenos Aires)*, 48, 265.

Chagas, C. (1909). Nova Trypanosomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, 1, 159-218.

Chagas, C. (1920). Clinical and anatomo-pathological aspects of American trypanosomiasis. *New Orleans Med. Surg. J.*, 72, 630.

Chagas, C. (1921). American trypanosomiasis: study of the parasite and of the transmitting insect. *Proc. Inst. Med. Chicago*, 3, 220.

Chiari, E., Oliveira, A., Prado, M., Alves, R., Galvao, L. & Araujo, F. (1996). Potential use of W6026 as prophylaxis against transfusion-transmitted American trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 40, 613-615.

Chow, Y., Chiang, B., Lee, Y., Chi, W., Lin, W., Chen, Y. & Tao, M. (1998). Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokines genes. *J. Immunol.*, 160, 1320-1329.

Chu, R., Targoni, O., Krieg, A., Lehmann, P. & Harding, C. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.*, 186, 1623-1631.

Chuenkova, M. & Pereira, M. (1995). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas disease. *J. Exp. Med.*, 181, 1693-1703.

Chuit, R. (1994). Control vectorial de la Enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Acta Toxicol. Argent.*, 2, 36-37.

Clark, D., Albrecht, M. & Arevalo, J. (1994). Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 66, 143-145.

Colli, W. & Alves, M. M. (1999). Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, 94, 37-49.

Corral, R. & Petray, P. (2000). CpG DNA as a Th1-promoting adjuvant in immunization against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, 19, 234-242.

Costa, F., Franchin, G., Pereira-Chiocola, V., Ribeiro, M., Schenkman, S. & Rodrigues, M. (1998). Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*, 16, 768-774.

Coura, J. & Pereira, J. (1984). E follow-up evaluation of Chagas' disease in two endemic areas in Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 79, 107.

Cox, F. (1993). Parasitic Protozoa. In F. Cox (Eds.), *Modern Parasitology. A textbook of parasitology* (pp. 1-23). Blackwell Scientific Publication.

Cremona, M., Sanchez, D., Frasch, A. & Campetella, O. (1995). A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Gene*, 160, 123-128.

- Cremona, M., Campetella, O., Sanchez, D. & Frasch, A. (1999). Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. *Glycobiology*, 9, 581-587.
- Cross, G. & Takle, G. (1993). The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 385-411.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Peiraro, A. & Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 50, 314-352.
- Davis, H., Michel, M. & Whalen, R. (1993). DNA-based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen high levels of circulating antibody. *Human Mol. Genet.*, 2, 1847-1851.
- DeSouza, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, 94, 17-36.
- Dezelee, S., Bras, F., Contamine, D., Lopez-Ferber, M., Segretain, D. & Teninges, D. (1989). Molecular analysis of Ref(2)P, a *Drosophila* gene implicated in sigma *Rhabdovirus* multiplication and necessary for male fertility. *EMBO J.*, 8, 3437-3446.
- Dias, J. (1989). The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 22, 147-156.
- Dictar, M., Sinagra, A., Veron, M., Luna, C., Dengra, C., Rissio, A. D., Bayo, R., Ceraso, D., Segura, E., Koziner, B. & Riarte, A. (1998). Recipients and donors of bone marrow transplants suffering from Chagas disease: management and preventive therapy of parasitemia. *Bone Marrow Transpl.*, 21, 391-3.
- Dirr, H., Reinemer, P. & Huber, R. (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione-S-transferases: Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur. J. Biochem.*, 220, 645-661.
- Docampo, R., Scott, D., Verseci, A. & Moreno, S. (1995). Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.*, 310, 1005-1012.
- Donnelly, J., Ulmer, J., Shiver, J. & Liu, M. (1999). DNA Vaccines. *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 617-648.
- Dumas, C., Ouellette, M., Tovar, J., Cunningham, M., Fairlamb, A., Tamar, S., Olivier, M. & Papadopolou, B. (1997). Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.*, 16, 2590-2598.
- Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B., Holmgren, A., Jönvall, H., Hoog, J. & Brandén, C. (1984). Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.*, 3, 1443.
- Elizari, M. & Chiale, P. (1993). Cardiac Arrhythmias in Chagas' disease. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 4, 596-608.
- Engel, J., Doyle, P. & McKerrow, J. (1999). Efecto anti parasitario de inhibidores de cistein proteasas *in vitro* e *in vivo* en la enfermedad de Chagas experimental. *Medicina (Buenos Aires)*, 59, 171-175.

- Englund, P., Guilbride, D., Hwa, K.-Y., Johnson, C., Li, C., Rocco, L. & Torri, A. (1996). Kinetoplast DNA: structure and replication. En D. Smith & M. Parsons (Eds.), *Molecular biology of parasitic protozoa* (pp. 75-87). New York. IRL Press.
- Esquivel, M., & Segura, E. (1994). Estimación del número de infectados chagásicos en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 54, 91-92.
- Esteva, M., Ruiz, A., Cabeza-Meckert, P., Cazzulo, J. & Segura, E. (1983). Antigens of the microsomal fraction of *Trypanosoma cruzi* which produce pathology in mice. *J. Protozool.*, 30, 168.
- Esteva, M., Porcel, B., Ruiz, A. & Segura, E. (1995). Resistencia contra *Trypanosoma cruzi* de ratones BALB/c por inmunización con una proteína recombinante. VII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.
- Fairlamb, A. & Cerami, A. (1985). Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in Trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 14, 187-98.
- Fairlamb, A., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. & Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 227, 1485-87.
- Fairlamb, A., Henderson, G. & Cerami, A. (1986). The biosynthesis of trypanothione and N1-glutathionyl spermidine in *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 21, 247-257.
- Fairlamb, A. & Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 695-729.
- Fairlamb, A., Smith, K. & Hunter, K. (1992). The interaction of arsenical drugs with dihydropyrimidine and dihydrolipoamide dehydrogenase from arsenical resistant and sensitive strains of *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 53, 223-232.
- Fairlamb, A. (1996). Pathways to drug discovery. *The Biochemist*, Feb/Mar, 11-16.
- Fairlamb, A. (1999). Future prospects for the chemotherapy of Chagas disease. *Medicina (Buenos Aires)*, 59, 179-187.
- Farina, M., Attias, M., Souto-Padron, T. & Souza, W. D. (1986). Further studies on the organization of the paraxial rod of trypanosomatids. *J. Protozool.*, 33, 552-557.
- Ferguson, M. (1997). The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser B*, 352, 1295-1302.
- Fernández-Gómez, R., Esteban, S., Gomez-Corvera, R., Zoulika, K. & Ouassiss, A. (1998). *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J. Immunol.*, 160, 3471-3479.
- Ferrari, I., Lorenzi, H., Santos, M., Brandariz, S., Requena, J., Schijman, A., Vazquez, M., da Silveira, J., Ben-Dov, C., Medrano, C., Ghio, S., Bergami, P. L., Cano, I., Zingales, B., Urmenyi, T. y col. & Levin, M. (1997). Towards the physical map of the *Trypanosoma cruzi* nuclear genome: construction of YAC and BAC libraries of the reference clone T. cruzi CL Brener. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, 92, 843-852.

- Flohe, L., Hecht, H. & Steinert, P. (1999). Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide. *Free Radical Biol. Med.*, 27, 966-984.
- Forg, P., Hoegen, P. V., Dalemans, W. & Schirmacher, V. (1998). Superiority of the ear pinna over muscle tissue as site for DNA vaccination. *Gene Ther.*, 5, 789-797.
- Fouts, D., Ruef, B., Ridley, P., Wrightsman, R., Peterson, D. & Manning, J. (1991). Nucleotide sequence and transcription of a trypomastigote surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 46, 189-200.
- Franchin, G., Pereira-Chiocola, V., Schenkman, S. & Rodrigues, M. (1997). Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote reduces infection in mice. *Infect. Immun.*, 65, 2548-2554.
- Frasch, A., Cazzulo, J., Åslund, L. & Petterson, U. (1991). Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol. Today*, 7, 148-151.
- Frash, A. (1994). Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitology*, 108, S37-S44.
- Frasch, A. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucins families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, 16, 282-286.
- Freilij, H., Storino, R., Alvarez, M. & Pérez, A. (1994). Diagnóstico de laboratorio. En R. Storino & J. Milei (Eds.), *Enfermedad de Chagas* (pp. 343-358). Buenos Aires, Argentina. Doyma Argentina.
- Frohme, M., Hanke, J., Åslund, L., Petterson, U. & Hoheisel, J. D. (1998). Selective generation of chromosomal cosmid libraries within the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Electrophoresis*, 19, 478-481.
- Galanti, N., Dvorak, J., Grenet, J. & McDaniel, J. (1994). Hydroxyurea-induced synchroy of DNA replication in the kinetoplastida. *Exp Cell Res*, 214, 225-230.
- Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Hieny, S., James, S. L. & Sher, A. (1992). The microbiocidal activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.*, 22, 2501-2506.
- Gea, S., Ordoñez, P., Cerban, F., Iosa, D., Chizzolini, C. & Vottero-Cima, E. (1993). Chagas' disease cardioneuropathy. Association of anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-sciatic nerve antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49, 581-588.
- Gerber, L., Kodukula, K. & Udenfriend, S. (1992). Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, 267, 12168-12173.
- Gibson, W. & Miles, M. (1986). The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.*, 5, 1299-1305.
- Gibson, W., Swinkels, B. & Borst, P. (1988). Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.*, 201, 315-325.

- Giniger, A., Retyk, E., Laino, R., Sananes, E. & Lapuente, A. (1992). Ventricular tachycardia in Chagas' disease. *Am. J. Cardiol.*, 70, 459-62.
- Giordano, R., Fouts, D., Tewari, D., Colli, W., Manning, J. & Alves, M. (1999). Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J. Biol. Chem.*, 274, 3461-3468.
- Gomes, Y., Abath, F., Furtado, A., Regis, L., Nakazawa, M., Montenegro, L., Vouldoukis, I., Morin, C. A. & Monjour, L. (1995). A monoclonal antibody against blood forms of *Trypanosoma cruzi* lyses the parasite *in vitro* and inhibits host cell invasion. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 50, 57-69.
- Gomes, Y., Abath, F., Nakazawa, M., Minoprio, P., Vouldoukis, I. & Monjour, L. (1999). Partial protection after immunizing with the TcY72 antigenic preparation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 94, 167-172.
- Gommel, D., Nogoceke, E., Morr, M., Kiess, M., Kalisz, H. & Flohe, L. (1997). Catalytic characteristics of trypanedoxin. *Eur. J. Biochem.*, 248, 913-918.
- Gonzalez, C. S. & Isola, E. D. d. (1994). Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. In R. Storino & J. Milei (Eds.), *Enfermedad de Chagas* (pp. 31-40). Buenos Aires, Argentina: Doyma Argentina.
- Gottlieb, P., Margolis-Nunno, H., Robinson, R., Shen, L., Chimezie, E., Horowitz, B. & Ben-Hur, E. (1996). Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms in blood components with a psoralen and ultraviolet A light. *Photochem. Photobiol.*, 63, 562-565.
- Granzotti, J., Rocha, G., Arevalo, J. & Filho, F. F. (1985). Cardiopatia chagastica em crianças. Relato de dois casos. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 27, 341-345.
- Grippo, J., Holmgren, A. & Pratt, W. (1985). Proof that the endogenous, heat-stable glucocorticoid receptor-activating factor is thioredoxin. *J. Biol. Chem.*, 260, 93-97.
- Grogl, M., & Kuhn, R. (1985). Identification of antigens of *Trypanosoma cruzi* which induce antibodies during experimental Chagas disease. *J. Parasitol.*, 71, 183-191.
- Gruber, A. & Zingales, B. (1992). Cloning of *Trypanosoma cruzi* genes that codify for proteins with glutathione-S-transferase activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 87, 131.
- Guerreiro, C. & Machado, A. (1913). Da reacao de Bordet e Gengou na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnostico. *Brasil Med.*, 27, 225-226.
- Guerrero, S., Flohe, L., Kalisz, H., Montemartini, M., Nogoceke, E., Hecht, H., Steinert, P. & Singh, M. (1999). Sequence, heterologous expression and functional characterization of trypanedoxin I from *Crithidia fasciculata*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 789-794.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione-s-transferases. The first enzymic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139.
- Hammond, D. & Gutteridge, W. (1984). Purine and pyrimidine metabolism in the trypanosomatidae. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 13, 243-261.

- Hanke, J., Sánchez, D. O., Henriksson, J., Aslund, L., Pettersson, U., Frash, A. C. C. & Hoheisel, J. D. (1996). Mapping the *Trypanosoma cruzi* genome: Analyses of representative cosmid libraries. *BioTechniques*, 21, 686-693.
- Hanke, J., Frohme, M., Laurent, J., Swindle, J. & Hoheisel, J. (1998). Hybridization mapping of *Trypanosoma cruzi* chromosomes III and IV. *Electrophoresis*, 19, 482-485.
- Hanson, W., Chien, J., Chapman, W. & Roberson, E. (1976). Immunization of mice with irradiated *Trypanosoma cruzi* grown in cell culture: relation of numbers of parasites immunizing injections and route of immunization to resistance. *Int. J. Parasitol.*, 6, 341.
- Hayes, J. & Pulford, D. (1995). The glutathione-S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30, 445-600.
- Hecker, H., Betschart, K., Bender, M., Burri, M. & Schlimme, W. (1994). The chromatin of trypanosomas. *Int. J. Parasitol.*, 24, 809-819.
- Henderson, G., Ulrich, P., Fairlamb, A., Rosenberg, I., Pereira, M., Sela, M. & Cerami, A. (1988). "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 5374-78.
- Henderson, G., Yamaguchi, M., Novoa, L., Fairlamb, A. & Cerami, A. (1990). Biosynthesis of the trypanosomatid metabolite trypanothione: purification and characterisation of trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry*, 29, 3924-3929.
- Henriksson, J., Aslund, L., Macina, R., Cazzulo, B. F. De Cazzulo, J., Frash, A. & Pettersson, U. (1990). Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 42, 213-224.
- Henriksson, J., Pettersson, U. & Solari, A. (1993). *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp. Parasitol.*, 77, 334-348.
- Henriksson, J., Porcel, B., Rydaker, M., Ruiz, A., Sabaj, V., Galanti, N., Cazzulo, J., Frash, A. & Pettersson, U. (1995). Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 73, 62-74.
- Hernández, S. & Schwarcz de Tarlovsky S. (1999). Arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi*, characteristics and kinetic properties. *Cell. Mol. Biol.*, 45, 383-91.
- Hoare, C. (1972). Capítulo 5. In The Trypanosomas of mammals (pp. 60). Oxford, Inglaterra: Blackwell Scientific Publications.
- Hofflin, J., Sadler, R., Araujo, F., Page, W. & Remington, J. (1987). Laboratory acquired Chagas' disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81, 437-440.
- Hofman, K., Bucher, P., Falquet, L. & Bairoch, A. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.*, 27, 215-219.
- Hoft, D., Schnapp, A., Eickhoff, C. & Roodman, S. (2000). Involvement of CD4+ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 68, 197-204.

- Hoft, D. F., Lynch, R. G. & Kirchhoff, L. V. (1993). Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 151, 7038-7047.
- Holmgren, A. (1978). Glutathione-dependent enzyme reactions of the phage T4 ribonucleotide reductase system. *J. Biol. Chem.*, 253, 7424-730.
- Holmgren, A. (1979). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of *Escherichia coli* glutaredoxin. *J. Biol. Chem.*, 254, 3672-3678.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, 264, 13963-13966.
- Holmgren, A. & Aslund, F. (1995). Glutaredoxin. *Meth. Enzymol.*, 252, 283-292.
- Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, H., Schaub, G. & Brombacher, F. (1998). Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Immunology*, 66, 1208-15.
- Hontebeyrie-Joskowicz M., Said G., Milon G., Marchal G. & Eisen H. (1987). L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol.*, 17, 1027-1033.
- Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J. & Scrimgeour, K. (1993). *Bioquímica* (MC Hidalgo y Mondragón, Trans.). (Primera ed.). Mexico: Prentice-Hall Hispanoamericana S. A.
- Huang, J. & Van der Ploeg L. H. T. (1991). Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.*, 10, 3877-3885.
- Hunter, C. A., Ellis, N. L., Slifer, T., Kanaly, S., Grunig, G., Fort, M., Rennick, D. & Araujo, F. G. (1997). IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 158, 3311-6.
- Hunter, C. A., Slifer, T., & Araujo, F. (1996). Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect. Immun.*, 64, 2381-2386.
- Hunter, K., Strobos, C. & Fairlamb, A. (1991). Inhibition of polyamine biosynthesis in *Crithidia fasciculata* by DL- α -difluoromethylornithine and DL- α -difluoromethylarginine. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 46, 35-44.
- Ibáñez, C., Affranchino, J. & Frasch, A. (1987). Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 25, 175-184.
- Ibáñez, C. F., Affranchino, J.L.; Macina, R.A.; Reyes, M.B.; Leguizamón S.; Camargo, M.E.; Aslund, L.; Petterson, U. and Frasch, A.C.C. (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30, 27-34.
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1989). Purification and some properties of glutathione-S-transferase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 171, 6039-6042.

Jackman, S., Hough, D., Danson, M., Stevenson, K. & Opperdoes, F. (1990). Subcellular localisation of dihydrolipoamide dehydrogenase and detection of lipoic acid in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem., 193, 91-95.

Jazin, E., Bontempi, E., Sánchez, D., Aslund, L., Henriksson, J., Frasch, A.C.C. & Pettersson, U. (1995). *Trypanosoma cruzi* exoantigen is a member of a 160 kDa gene family. Parasitology, 110, 61-69.

Jockers-Scherubl, M.C., Schirmer, R.H. & Krauth-Siegel, R.L. (1989). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. Eur. J. Biochem., 180, 267-72.

Jorg, M. & Oliva, R. (1980). Presencia de tripomastigotes en sangre menstrual de mujeres con tripanosomiasis cruzi. Rev. Arg. Parasitol., 1, 128.

Jost, L., Turin, M., Etchegoyen, F., Leiguarda, R., Taratuto, A. & Iotti, R. (1977). Meningoencefalitis chagásica en pacientes con tratamiento inmunosupresor por trasplante renal. Rev. Neurol. Arg., 3, 425.

Kahn, S. & Wlekinski, M. (1997). The surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* encode a superfamily of variant T cell epitopes. J. Immunol., 159, 4444-4451.

Kalil, J. & Cunha-Neto, E. (1996). Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? Parasitol. Today, 12, 396-399.

Kaur, K., Emmett, K., McCann, P., Sjoerdsma, A. & Ullman, B. (1986). Effects of DL-a-difluoromethylornithine on *Leishmania donovani*. J. Protozool., 33, 518-521.

Keddes, M., Gerold, P., Azzouz, N., Blaschke, T., Shams-Eldin, H., Muhlberger, E., Holder, A., Klenk, H., Schwarz, R. & Eckert, V. (2000). Processing and localisation of a GPI-anchored *Plasmodium falciparum* surface protein expressed by the baculovirus system. Eur. J. Cell Biol., 79, 52-61.

Kierszenbaum, F. & Budzko, D. (1975). Immunisation against experimental Chagas disease by using culture forms of *Trypanosoma cruzi* killed with the solution of sodium perchlorate. Infect. Immun., 12, 461.

Kierszenbaum, F., Wirth, J., McCann, P. & Sjoerdsma, A. (1987). Arginine decarboxylase inhibitors reduce the capacity of *Trypanosoma cruzi* to infect and multiply in mammalian host cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 4278-4282.

Klinman, D., Yi, A., Beaucage, S., Conover, J. & Krieg, A. (1996). CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete IL-6, IL-12 and INF- γ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 2879-2883.

Koberle, F. & Alcantara, F. (1960). Mecanismo do destrucao neuronal do sistema nervoso periferico na molestia de Chagas. Hospital (Rio de Janeiro), 57, 173-178.

Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by nucleotides in positions +5 and +6. EMBO J., 16, 2482-2492.

Krauth-Siegel, R., Enders, B., Henderson, G., Fairlamb, A. & Schirmer, R. (1987). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: purification and characterization of the crystalline enzyme. Eur. J. Biochem., 164, 123-128.

- Krauth-Siegel, R. & Schoneck, R. (1995). Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *FASEB J.*, 9, 1138-1146.
- Krauth-Siegel, R. & Ludemann, H. (1996). Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 80, 203-208.
- Krauth-Siegel, R. & Coombs, G. (1999). Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. *Parasitol. Today*, 15, 404-409.
- Kumar, S. & Tarleton, R. (1998). The relative contribution of antibody production and CD8+T cells function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.*, 20, 207-216.
- Kyte, J. & Doolittle, F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.
- La Roche, S. & Leisinger, T. (1990). Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dehalogenase structural gene, a member of the glutathione-S-transferase supergene family. *J. Bacteriol.*, 172, 164-171.
- Lane, J., Olivares-Villagomez, D., Vnencak-Jones, C., McCurley, T. & Carter, C. (1997). Detection of *Trypanosoma cruzi* with the polymerase chain reaction and in situ hybridization in infected murine cardiac tissue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56, 588-595.
- Laranja, F., Días, E., Nobrega, G. & Miranda, A. (1956). Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, 14, 1035-1060.
- Laucella, S., Salcedo, R., Castanos-Velez, E., Riarte, A., de Titto, E., Patarroyo, M., Orn, A. & Rottemberg, M. (1996). Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.*, 18, 227-239.
- Laucella, S., de Titto, E., Segura, E., Orn, A. & Rottemberg, M. (1996). Soluble cell adhesion molecules in human Chagas' disease: association with disease severity and stage of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55, 629-634.
- Lauricella, M., Stariolo, R., Gurtler, R. & Segura, E. (1999). Demostración de *Trypanosoma cruzi* en poblaciones peridomesticas de *Triatoma infestans* y *Triatoma guasayana* de La Rioja. *Medicina (Buenos Aires)*, 59, 43.
- Ledesma Patiño O., Meneclier, C. R., Kalalo, E., Lugones, H., Acevedo, A. M. & Barbieri, G. (1992). Actualizaciones en la enfermedad de Chagas. Simposio Satélite. Organismo Oficial del Congreso Nacional de Medicina.
- Levin, M., Mesri, E., Bernarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P., Ruiz, A., Kahan, A., Rosembaum, M., Torres, H. & Segura, E. (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41, 530-538.
- Liebau, E., Eckelt, V., Wildenburg, G., Teesdale-Spittle, P., Brophy, P., Walter, R. & Henkle-Duhrsen, K. (1997). Structural and functional analysis of a glutathione-S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochem. J.*, 324, 659-666.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Fan, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Ludemann, H., Dormeyer, M., Sticherling, C., Stallmann, D., Follman, H. & Krauth-Siegel, R. (1998). *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin like protein in African trypanosomas. FEBS Lett., 431, 381-385.

Lueder, D. & Phillips, M. (1996). Characterization of *Trypanosoma brucei* g-glutamylcysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione (diglutathionylspermidine). J. Biol. Chem., 271, 17485-17490.

Lugones, H., Ledesma, O., Peralta, F., Marteleur, A., Voza, P., Falendi, S. & Barbieri, G. (1979). Enfermedad de Chagas. Anales Nestlé, 132, 124-135.

Macedo, V. (1980). Forma indeterminada da doença de Chagas. J. Bras. Med., 38, 34.

Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H., Bishop, J., Falcone, F., Gavrilescu, C., Montgomery, J., Santori, M., Stern, L., Wang, Z., Ullu, E. & Tschudi, C. (2000). A new twist in trypanosoma RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. RNA, 6, 163-169.

Mannervick, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. & Jornvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 7202-7206.

Marinho, C. R. F., Imperio-Lima, M. R., Grisoto, M. G. & Alvarez, J. M. (1998). Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas disease. Infect. Immun., 67, 308-318.

Marsh, I. & Bradley, M. (1997). Substrate specificity of trypanothione reductase. Eur. J. Biochem., 243, 690-694.

Marteleur, A. & Barbieri, G. (1984). Utilización del método de capilares para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas aguda. Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas (pp.17). Huerta Grande, Córdoba (Argentina).

Martin, J. (1995). Thioredoxin - a fold for all reasons. Structure, 3, 245-250.

Masai, E., Katayama, Y., Kubota, S., Kawai, S., Yamasaki, M. & Morohoshi, N. (1993). A bacterial enzyme degrading the model lignin compound β -etherase is a member of the glutathione-s-transferase superfamily. FEBS Lett., 323, 135-140.

Matthews, J., Wakasugi, N., Virelizier, J., Yodoi, J. & Hay, R. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- κ B by reduction of a disulfide bond involving cysteine 62. Nucleic Acids Res., 20, 3821-3830.

Matthews, K., Tschudi, C. & Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomas. Gene Dev., 8, 491-501.

Maya, J., Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J., Tellez, R., Gaule, C. & Morello, A. (1997). Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., 86, 101-106.

Mazza, S. (1936). Casos crónicos de la enfermedad de Chagas determinados en Jujuy. V Congreso Argentino de Medicina, (pp. 1-3). Santa Fé (Argentina).

- Mazza, S., Montana, A., Benitez, C. & Juzín, E. (1936). Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por la leche de la madre con enfermedad de Chagas. Publ. MEPR, 28, 41-46.
- Mazza, S. (1941). Tratamiento de la enfermedad de chagas. Prens. Med. Arg., 28, 1579.
- Mazza, S. (1943). Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Pastrongylus seai* y *Psamulester coreodes* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infestación por *T. cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de *Triatoma infestans*. Prensa Médica Arg., 30, 1583-1595.
- McCabe, R., Meagher, S. & Mullins, B. (1991). Gamma interferon supresses acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infection in cyclosporin-treated mice. Infect. Immun., 59, 1633-1638.
- McCarthy, D., Naverrete, S., Wilett, W., Babbitt, P. & Copley, S. (1996). Exploration of the relationship between tetrachlorohydroquinone dehalogenase and the glutathione-S-transferase superfamily. Biochemistry, 35, 14634-14642.
- McTigue, M., Williams, D. & Tainer, J. (1995). Crystal structures of Schistosomal drug and vaccine target: glutathione-S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. J. Mol. Biol., 246, 21-27.
- Menezes, H. (1971). Aplicacao de vacina viva avirulenta de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 13, 144.
- Meyer, Z. B. C., Cramer, S., Trumfheller, C., Fleischer, B. & Frosch, S. (1997). *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma ($\text{INF-}\gamma$) production. Clin. Exp. Immunol., 110, 378-85.
- Mignogna, G., Allocati, N., Aceto, A., Piccolomini, R., Ilio, C. D., Barra, D. & Martini, F. (1993). The amino acid sequence of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*, a prototype of a new class of enzyme. Eur. J. Biochem., 211, 421-425.
- Milburn, D., Laskowski, R. & Thornton, J. (1998). Sequences annotated by structure: a tool to facilitate the use of structural information in sequence analysis. Protein Eng., 11, 855-859.
- Miller, A. & Kahn, S. (2001). The SA85-1.1 protein of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen. Infect. Immun., 68, 3574-3580.
- Mitchell, G., Garcia, E., Davern, K., Tiu, W. & Smith, D. (1988). Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of resistance to *Schistosoma japonicum* in mice. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82, 885-889.
- Moncayo, A. (1994). Iniciativa de los Países del Cono Sur. Acta Toxicol. Argent., 2, 34-35.
- Montemartini, M., Kalisz, H., Kiess, M., Nogoceke, E., Singh, M., Steinert, P. & Flohe, L. (1998). Sequence, heterologous expression and functional characterization of a novel tryparedoxin from *Crithidia fasciculata*. Biol. Chem., 379, 1137-1142.
- Morello, A. (1988). The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol., 90 C, 1-12.

- Morris, S., Tanowitz, H., Wittner, M. & Bilezikian, J. (1990). Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation*, 82, 1900-1909.
- Moutiez, M., Meziane-Cherif, D., Aumercier, M., Sergheraert, C. & Tartar, A. (1994). Compared reactivities of trypanothione and glutathione in conjugation reactions. *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 2641-2644.
- Moutiez, M., Aumercier, M., Schoneck, R., Meziane-Cherif, D., Lucas, V., Aumercier, P., Ouaisi, A., Sergheraert, C. & Tartar, A. (1995). Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.*, 310, 433-437.
- Moutiez, M., Quemener, E., Sergheraert, C., Lucas, V., Tartar, A. & Davioud-Chavert, E. (1997). Glutathione-dependent activities of *Trypanosoma cruzi* p52 makes it a new member of the thiol-disulphide oxidoreductase family. *Biochem. J.*, 322, 43-8.
- Mukhopadhyay, R., Dey, S., Xu, N., Gage, D., Lightbody, J., Ouellette, M. & Rosen, B. (1996). Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 10383-10387.
- Muller, E. & Buchanan, B. (1989). Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin m gene of *Anacystis nidulans*. *J. Biol. Chem.*, 264, 4008-4014.
- Muñoz-Fernández, M. A., Fernández, M. A. & Fresno, M. (1992). Synergism between tumor necrosis factor- α and Interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.*, 22, 301-307.
- Nabors, G. & Tarleton, R. (1991). Differential control of INF- γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, 146, 3591-8.
- Nakamura, H., Nakamura, K. & Yodoi, J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 351-369.
- Nasser, J., Gómez, L., Sánchez, D., Guerin, M. & Basombrio, M. (1997). Immunogenicity of the recombinant SAPA protein of *Trypanosoma cruzi* for mice. *J. Parasitol.*, 83, 76-81.
- Nickell, S. P., Stryker, G. A. & Arevalo, C. (1993). Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J. Immunol.*, 150, 1446-57.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & Heijne, G. V. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. *Prot. Eng.*, 10, 1-6.
- Nielsen, H., Lauemoller, S., Christiansen, L., Buus, S., Fomsgaard, A. & Petersen, E. (1999). Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect. Immun.*, 67, 6358-6363.
- Nilsson, O. (1990). Molecular conformational space analysis using computer graphics: going beyond FRODO. *J. Mol. Graph.*, 8, 192-200.

Nogoceke, E., Gommel, D., Kiess, M., Kalisz, H. & Flohe, L. (1997). A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.*, 378, 827-836.

Nogueira, N. & Cohn, Z. (1977). *Trypanosoma cruzi*: uptake and intracellular fate in normal and activated macrophages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26, 194-203.

Nogueira, N., Gordon, S. & Cohn, Z. (1977). *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. *J. Exp. Med.*, 146, 157-171.

Nordstrand, K., Aslund, F., Homgren, A., Otting, G. & Berndt, K. (1998). NMR structure of *Escherichia coli* glutaredoxin 3-glutathione mixed disulfide complex: implications for the enzymatic mechanism. *J. Mol. Biol.*, 286, 541-552.

Norris, K. & Schrimpf, J. (1994). Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 62, 236-243.

Norris, K., Schrimpf, J. & Szabo, M. (1997). Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. *Infect. Immun.*, 65, 349-357.

O'Sullivan, M., Zhou, Q., Li, Z., Durham, T., Rattendi, D., Lane, S. & Bacchi, C. (1997). Polyamine derivatives as inhibitors of trypanothione reductase and assessment of their trypanocidal activities. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 2145-2155.

Ondarza, R., Iturbe, A., Hurtado, G., Tamayo, E., Ondarza, M. & Hernandez, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a eukaryote with trypanothione metabolism instead of glutathione metabolism. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 47-52.

Opperdoes, F. & Michels, P. (1991). The evolutionary origin of glycosomes. *Parasitol. Today*, 7, 105-109.

OPS (1999). VIIIª Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Eliminación de *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Tripanosomiasis Americana por Transfusión. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR). 16 al 18 de marzo 1999. Tarija, Bolivia.

Pearson, W. & Lipman, D. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 2444-8.

Peitsch, M. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 274-279.

Pemble, S. & Taylor, J. (1992). An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-Theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem. J.*, 287, 957-963.

Pemble, S., Wardle, A. & Taylor, J. (1996). Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.*, 319, 749-754.

Pereira, M., Mejia, J., Ortega-Barria, E., Matzilevich, D. & 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, 179-191.

Pereira-Chioccola, V., Costa, F., Ribeiro, M., Soares, I., Arena, F., Schenkman, S. & Rodrigues, M. (1999). Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. *Parasite Immunol.*, 21, 103-110.

Pereira Barreto, M. (1985). Reservorios del *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Factores biológicos y ecológicos de la enfermedad de Chagas. En R. U. Carvalho (Eds.). Tomo II (pp. 275-288).

Persson, K., Åslund, L., Grahn, B., Hanke, J. & Heby, O. (1998). *Trypanosoma cruzi* has not lost its S-adenosylmethionine decarboxylase: characterization of the gene and the encoded enzyme. *Biochem. J.*, 333, 527-537.

Petray, P., Rottenberg, M. E., Grinstein, S. & Orn, A. (1994). Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.*, 16, 193-9.

Pickett, C. & Lu, A. (1989). Glutathione-S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Ann. Rev. Biochem.*, 58, 743-764.

Pinto Dias J. C. (1982). Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Trabajo de Tesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Pinto Dias J. C., Briceño-Leon, R. & Storino, R. (1994). Aspectos sociales, económicos, políticos, culturales y psicológicos. En R. Storino & J. Milei (Eds.), *Enfermedad de Chagas* (pp. 527-548). Buenos Aires. Doyma Argentina.

Pizzi, T. & Prager, R. (1952). Inmunidad a la sobreinfección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Inform. Parasit. Chilenas*, 7, 20-21.

Plata, F., Garcia-Pons, F. & Wiertzerbin, J. (1987). Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*. Synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma *in vivo*. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, 138, 397-415.

Plumas-Marty, B., Verwaerde, C., Loyens, M., Velge, P., Taibi, A., Cesbron, M. F., Capron, A. & Ouassiss, M. A. (1992). *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology*, 104, 87-98.

Plumas-Marty, B., Taibi, A., Pessoa, H., Verwaerde, C., Loyens, M., Pommier, V., Velge, P., Capron, A. & Ouassiss, A. (1993). *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins (TcGBP): protection induced by native proteins in an experimental model and analysis of the antibody response. *Res. Immunol.*, 144, 553-563.

Porcel, B., Tran, A., Tammi, M., Nyarady, Z., Rydaker, M., Urmenyi, T., Rondinelli, E., Pettersson, U., Andersson, B. & Åslund, L. (2000). Gene Survey of the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Genome Res.*, 10, 1103-1107.

Powis, G., Kirkpatrick, D., Angulo, M. & Baker, A. (1998). Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chem. Biol. Interact.*, 111-112, 23-34.

- Rassi, A., Borges, C., Rezende, J., Carneiro, O., Salum, J., Ribeiro, I. & Paula, O. D. (1958). Fase aguda da Doença de Chagas, aspectos clinicos observados em 18 casos. *Rev. Goiana Med.*, 4, 161.
- Rezende, J.(1988). Manifestações digestivas da doença de Chagas. En R. Dani & L. Castro (Eds.), *Gastroenterología Clínica* (pp. 1387-1411). Rio de Janeiro. Guanabara.
- Riarte, A., Luna, C., Sabatiello, R., Sinagra, A., Schiavelli, R., Rissio, A. D., Maiolo, E., García, M., Jacob, N., Pattin, M., Lauricella, M., Segura, E. & Vazquez, M. (1999). Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. *Clin. Infect. Dis.*, 29, 561-7.
- Riveau, G., Poulain-Godefroy, O., Dupre, L., Remoue, F., Mielcarek, N., Loch, C. & Capron, A. (1998). Glutathione-S-transferase of 28 kDa as major vaccine candidates against schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro), 93, 87-94.
- Rodrigues, M., Riberao, M., Pereira-Chioccola, V., Renia, L. & Costa, F. (1999). Predominance of CD4 TH1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect. Immun.*, 67, 3855-3863.
- Romaña, C. (1935). Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas: conjuntivitis equinocefálica unilateral (hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *Publicación de la M.E.P.R.A.*, 22, 16-28.
- Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S., Allocati, N., Masulli, M., Llio, C. D. & Parker, M. (1998). A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications. *Structure*, 6, 721-734.
- Rottemberg, M., Rodriguez, D. & Orn, A. (1992). Control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice deprived of T-cell help. *Scand. J. Immunol.*, 36, 261-268.
- Ruiz, A.(1983). Antígenos de la Fracción Flagelar de *Trypanosoma cruzi* e Inmunoprotección experimental. Trabajo de Tesis. Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Ruiz, A., Esteva, M., Meckert, P. C., Laguens, R. & Segura, E. (1985). Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 42, 299-309.
- Ruiz, A., Esteva, M., Riarte, A., Subías, E. & Segura, A. (1986). Immunoprotection of mice against *Trypanosoma cruzi* with lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. *Immunol. Lett.*, 12, 1-4.
- Ruiz, A., Esteva, M., Subías, E., Moreno, M., Rosenstein, A., Velázquez, E. & Segura, E. (1990). Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* II. Immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity purified antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30, 115.
- Ruiz, A., Búa, J. & Segura, E.(1994). Antígenos del *Trypanosoma cruzi*: Perspectivas futuras. En R. Storino & J. Milei (Eds.), *Enfermedad de Chagas* (pp. 629-640). Buenos Aires, Argentina. Doyma Argentina.

- Rushmore, T. & Pickett, C. (1993). Glutathione-S-transferases, structure, regulation and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.*, 268, 11475-11478.
- Russel, M., Model, P. & Holmgren, A. (1990). Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribo synthesis. *J. Bacteriol.*, 172, 1923.
- Russomando, G., Tomassone, M. D., Guillen, I. D., Acosta, N., Vera, N., Almirón, M., Candia, N., Calcena, M. & Figueredo, A. (1998). Treatment of congenital Chagas disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual (2 ed.). New York, EEUU. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sang, J. & Thompson, N. (1994). A efficient procedure for obtaining long cDNA clones from phage library secreening. *Biotechniques*, 17, 447-451.
- Santos, M., Cano, M., Schijman, A., Lorenzi, H., Vazquez, M., Levin, M., Ramirez, J., Brandao, A., Degrave, W. & Silveira, J. D. (1997 a). The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, 92, 821-828.
- Santos, M., Garg, N. & Tarleton, R. (1997 b). The identification and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein-1, a member of the trans-sialidase gene superfamily. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 86, 1-11.
- Santos, M., Lorenzi, H., Porcile, P., Carmo, M. D., Schijman, A., Brandao, A., Araya, J., Gomes, H., Chiurillo, M., Ramirez, J., Degrave, W., Levin, M. & Silveira, J. D. (1999). Physical mapping of a 670 kb region of cromosomes XVI and XVII from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* encompassing the genes for two immunodominant antigens. *Genome Res.*, 9, 1268-1276.
- Schenkman, Š., Eichinger, D., Pereira, M. & Nussenzweig, V. (1994). Structural and functional properties of Trypanosomas trans-sialidase. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 499-523.
- Schöneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Gras-Masse, H., Capron, A. & Ouaisi, A. (1994). *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione-S-transferase. *Biol. Cell*, 80, 1-10.
- Schöneck, R., Billaut-Mulot, O., Numrich, P., Ouaisi, M. & Krauth-Siegel, R. (1997). Cloning, sequencing and functional expresion of dihydrolipoamide dehydrogenase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.*, 243, 739-747.
- Schwarcz de Tarlovsky, M., Hernandez, S., Bedoya, A., Lamme, E. & Isola, E. (1993). Polyamines in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 30, 547-558.
- Schwartz, D., & Cantor, C. (1984) . Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37, 67-75.
- Scott, M., Bahr, G., Moddaber, F., Afchain, D. & Chedid, L. (1984). Adjuvant requirements for protective immunization of mice using a *Trypanosoma cruzi* 90 K cell surface glycoprotein. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 74, 373-377.

- Scott, M., Neal, R. & Woods, N. (1985). Immunization of marmosets with *Trypanosoma cruzi* cell surface glycoprotein (GP90). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79, 451-454.
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. & Hoffman, S. (1994). Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 9866-9870.
- Segura, E. L., Cura, E. N., Paulone, I., Vazquez, C. & Cerisola, J. A. (1974) . Antigenic makeup of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 21, 571-574.
- Segura, E., Paulone, I., Cerisola, J. & Cappa, S. G. (1976). Experimental Chagas disease: protective activity in relation with subcellular fractions of the parasite. *J. Parasitol.*, 62, 131-133.
- Segura, E., Esteva, M., Quintans, C., Montoro, L. & Weissembacher, M. (1981). Infección con *Trypanosoma cruzi* en ratones congenitamente atímicos. *Medicina (Buenos Aires)*, 41, 328-332.
- Segura, E., Cura, E., Sosa Estani, S., Andrade, J., Lansetti, J., de Rissio, A., Campanini, A., Blanco, S., Gurtler, R. & Alvarez, M. (2000). Long-term effects of a nationwide control program on the seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection in young men from Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62, 353-62.
- Sepulveda, P., Hontebeyrie, M., Liegeard, P., Mascilli, A. & Norris, K. (2000). DNA-based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.*, 68, 4986-4991.
- Shames, S. L., Fairlamb, A. H., Cerami, A. & Walsh, C. T. (1986). Purification and characterization of trypanothione reductase from *Chritidie fasciculata* a newly discovered member of the family of disulphide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry*, 25, 3519-26.
- Shames, S., Kimmel, B., Peoples, O., Agabian, N. & Walsh, C. (1988). Trypanothione reductase of *Trypanosoma congolense*: gene isolation, primary sequence determination, and comparison to glutathione reductase. *Biochemistry*, 27, 5014-5019.
- Sherratt, P., Pulford, D., Harrison, D., Green, T. & Hayes, J. (1997). Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochemical J.*, 326, 837-846.
- Shikanai-Yasuda, M., Marcondes, C. B. & Guedes, L. (1991). Possivel transmission of acute Chagas disease in Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 13, 351.
- Silva-Barbosa S. D., Cotta-de-Almeida V., Riederer I., De Meis J., Dardenne M, Bonomo A. & Savino W. (1997). Involvement of laminin and its receptor in abrogation of heart graft rejection by autoreactive T cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol.*, 159, 997-1003.
- Silva, J., Twardzik, D. & Reed, S. (1991). Regulation of *Trypanosoma cruzi* Infections *in vitro* and *in vivo* by Transforming Growth Factor β (TGF- β), *J. Exp. Med.*, 174, 539-545.

- Silva, J. S., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Mohler, K. M., Anderson, D. & Reed, S. G. (1992). Interleukin 10 and Interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.*, 175, 169-174.
- Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene*, 67, 31-40.
- Smith, K., Nadeau, K., Walsh, C. & Fairlamb, A. (1992). Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. *Protein Sci.*, 1, 874-883.
- Smith, T. (1963). L-arginine carboxy-lyase of higher plants and its relation to potassium nutrition. *Phytochemistry*, 2, 241-252.
- Soderberg, B., Sjöberg, B., Sonnerstam, U. & Branden, A. (1978). Three-dimensional structure of thioredoxin induced by bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 5827-5830.
- Sosa Estani S., Segura, E., Porcel, B., Ruiz, A., Velazquez, E. & Yampotis, C. (1998). Chemotherapy with benznidazole in children in undetermined phase of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59, 526-529.
- Sosa Estani S. & Segura, E. (1999). Tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normatización actual en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 59, 166-170.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- Souto-Padron, T., Reyes, M., Leguizamon, S., Campetella, O. & Frasch, A. (1989). *Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite. *Eur. J. Cell. Biol.*, 50, 272-278.
- Souza, M. & Roitman, I. (1971). Protective effects of *Leptomonas pessoai* against the infection of mice by *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Microbiol.*, 2, 187.
- Spinella, S., Liegeard, P. & Joskowicz, M. H. (1999). *Trypanosoma cruzi*: Predominance of IgG2a in non-specific humoral response during experimental Chagas disease. *Exp. Parasitol.*, 74, 46-56.
- Stoppani, A. (1999). Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*, 59, 147-165.
- Storino, R. & Milei, J. (1986). Capítulo 6. En *Miocardopatía chagásica crónica, un enfoque para el clínico general* (pp. 137). Buenos Aires, Argentina. Club de Estudio.
- Storino, R., Milei, J., Beigelman, R. & Ferrans, V. (1992). Enfermedad de Chagas: doce años de seguimiento en área urbana. *Rev. Arg. Cardiol.*, 60, 205.
- Storino, R. (1994). Chagas transfusional. En R. Storino & J. Milei (Eds.), *Enfermedad de Chagas* (pp. 279-291). Buenos Aires, Argentina. Doyma Argentina S.A.
- Storino, R. & Jorg, M. (1994). Vías de infección y aspectos clínicos. En R. Storino & J. Milei (Eds.), *Enfermedad de Chagas* (pp. 185-208). Buenos Aires, Argentina. Doyma Argentina S.A.

- Stuart, K. (1991). RNA editing in trypanosomatid mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 327-344.
- Tabor, H. & Tabor, C. (1975). Isolation, characterization and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 250, 2648-2654.
- Taelman, H., Schechter, O., Marcelis, L., Sonnet, J., Kazyumba, G., Dasnoy, J., Haeghele, K., Sjoerdsma, A. & Wery, M. (1987). Difluoromethylornithine, an effective new treatment of Gambian trypanosomiasis. Results in five patients. *Am. J. Med.*, 82, 607-613.
- Tait, A., Buchanan, N., Hide, G. & Turner, C. (1996). Self-fertilisation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 76, 31-42.
- Takle, G., O'Connor, J., Young, A. & Cross, G. (1992). Sequence homology and absence of mRNA defines a possible pseudogene member of the *Trypanosoma cruzi* gp85/sialidase multigene family. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 56, 117-127.
- Taliaferro, W. & Pizzi, T. (1955). Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 96, 199-226.
- Tan, K., Chelvanayagam, G., Parker, M. & Board, P. (1996). Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT-2: catalysis with different substrates involves different residues. *Biochem. J.*, 319, 315-21.
- Tanaka, Y., Tanowitz, H. & Bloom, B. (1983). Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. *Infect. Immun.*, 41, 1322-31.
- Tarleton, R. & Kuhn, R. (1983). Changes in cell population and immunoglobulin-producing cell in the spleen of mice infected with *Trypanosoma cruzi*: Correlation with parasite-specific antibody response. *Cell Immunol.*, 80, 392.
- Tarleton, R. (1990). Depletion of CD8+ T cells increase susceptibility and reserves vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, 144, 717.
- Tarleton, R. L. (1993). Pathology of American trypanosomiasis. En K. S. Warren (Eds.), *Immunology and molecular biology of parasitic infections* (pp. 64-71). London. Blackwell Sc Pub.
- Tarleton, R., Sun, J., Zhang, L. & Postan, M. (1994). Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.*, 62, 1820-1829.
- Tarleton, R., Zhang, L. & Dows, M. (1997). Autoimmune rejection of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasitic-specific response to infected host tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3932-3937.
- Tarleton, R. & Zhang, L. (1999). Chagas disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today*, 15, 94-99.
- Teixeira, A., Teixeira, M. & Santos Buch, C. (1975). The immunology of experimental Chagas'disease. IV. Production of lesions in rabbit similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am. J. Pathol.*, 80, 163-180.

- Tetaud, E., Bringaud, F., Chabas, S., Barrett, M. & Baltz, T. (1994). Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 8278-8282.
- Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.
- Tokunaga, T., Yamamoto, H. & Shimada, S. (1984). Antitumor activity of doxyribonucleic acid fraction from mycobacterium bovis BCG. 1. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.*, 72, 955.
- Toung, Y., Hsieh, T. & Tu, C. (1993). The glutathione S-transferase D genes. A divergently organized, intronless gene family in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 268, 9737-9746.
- Trishmann, T. M. (1986). *Trypanosoma cruzi*: Early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, 62, 194-201.
- Tromelin, A., Moutiez, M., Meziane-Cherif, D., Aumercier, M., Tartar, A. & Sergheraert, C. (1993). Synthesis of non reducible inhibitors for trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.*, 3, 1971-1976.
- Truyens, C., Angelo-Barrios, A., Torrico, F., Damme, J., Heremans, H. & Carlier, Y. (1994). Interleukin -6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of its paradoxical increase by anti IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infect. Immun.*, 62, 692-6.
- Urbina, J., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazard, K., Piras, M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P. & Ryley, J. (1996). Cure of short and long-term experimental Chagas disease using D0870. *Science*, 273, 969-971.
- Urmenyi, T., Bonaldo, M., Soares, M. & Rondinelli, E. (1998). Construction of a normalized cDNA library for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46, 542-544.
- Van der Kop, D., Schuyer, M., Scheres, B., Van der Zaal, B. & Hooykaas, P. (1996). Isolation and characterization of an auxin-inducible glutathione-S-transferase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 30, 839-844.
- Van-Voorhis, W., Barret, L., Koelling, R. & Farr, A. (1993). FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contains two distinct epitopes that mimic nervous tissues. *J. Exp. Med.*, 178, 681-694.
- Vanhamme, L. & Pays, E. (1995). Control of gene expression in Trypanosomas. *Microbiol. Rev.*, 59, 223-240.
- Vattuone, N., Szarfman, A. & Gonzalez-Cappa, S. (1973). Antibody response and immunoglobulin levels in human with acute or chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76, 45-47.
- Vázquez, M., Ben-Dov, C., Lorenzi, H., Moore, T., Schijman, A. & Levin, M. (2000). The short interspersed repetitive element of *Trypanosoma cruzi*, SIRE, is part of VIPER, an

unusual retroelement related to long repeat retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 97, 2128-2133.

Vekris, A. (1994). Simplified *in vivo* subcloning for easy handling of large sets of lambda ZAP clones. *Nucleic Acid Res.*, 22, 4842-4843.

Verdun, R., Di Paolo, N., Urmenyi, T. P., Rondinelli, E., Frasch, A. C. C. & Sanchez, D. O. (1998). Gene discovery through Expressed Sequence Tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 66, 5393-5398.

Vespa, G., Cunha, F. & Silva, J. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.*, 62, 5177-82.

Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, A. & Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart. J.*, 127, 151-161.

Vlami-Gardikas, A., Åslund, F., Spyrou, G., Bergman, T. & Homgren, A. (1997). Cloning, overexpression and characterization of glutaredoxin 2, an atypical glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 272, 11236-11243.

Wells, W., Xu, D., Yang, Y. & Rocque, P. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J. Biol. Chem.*, 265, 15361-15364.

Wendel, S. (1998). Transfusion-transmitted Chagas'disease. *Curr. Opin. Hematol.*, 5, 406-411.

Wilce, M. & Parker, M. (1994). Structure and function of glutathione-S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1205, 1-18.

Wilkinson, S., Meyer, D. & Kelly, J. (2000). Biochemical characterization of a trypanosoma enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem. J.*, 352, 755-761.

Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J. & col. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature*, 368, 32-38.

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

Wizel, B., Nunes, N. & Tarleton, R. (1997). Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TCL response. *J. Immunol.*, 159, 6120-6130.

Wizel, B., Palmieri, M., Mendoza, C., Arana, B., Sidney, J., Sette, A. & Tarleton, R. (1998 a). Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Clin. Investig.*, 102, 1062-1071.

Wizel, B., Garg, N. & Tarleton, R. (1998 b). Vaccination with trypomastigote surface antigen 1 encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.*, 66, 5073-5081.

- Wood, F. (1942). The persistence of *Trypanosoma cruzi* in dead cone nose bugs. Am. J. Trop. Med., 22, 613.
- Wright, M., Harrison, R., Melder, A., Newport, G. & Mitchell, G. (1991). Another 26-kilodalton glutathione-S-transferase of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol., 49, 177-180.
- Wrightsmann, R., Dawson, B., Fouts, D. & Manning, J. (1994). Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. J. Immunol., 153, 3148-3154.
- Wrightsmann, R. & Manning, J. (2000). Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. Vaccine, 18, 1419-1427.
- Yang, W., Waite, G. & McManus, D. (1995). Antibodies to *Schistosoma japonicum* (asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. Biochem. Biophys. Res. Co., 212, 1029-1039.
- Yawetz, A. & Agosin, M. (1980). Glutathione-s-transferase and drug metabolism in *Trypanosoma cruzi* : in vivo and in vitro formation of thioethers. Comp. Biochem. Physiol., 66, 265-267.
- Yawetz, A. & Agosin, M. (1981). Purification of the glutathione-S-transferase of *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol., 683, 237-243.
- Zeledón, R. (1972). Los vectores de la enfermedad de Chagas en América. Simposio Internacional sobre enfermedad de Chagas. Oficina Panamericana de la Salud. UNDP/World bank/WHO (pp. 327). Buenos Aires, Argentina.
- Zhang, L. & Tarleton, R. (1996). Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. Eur. J. Immunol., 102-109.
- Zingales, B., Rondinelli, E., Degraeve, W., da Silveira, J.F., Levin, M., Le Paslier, D., Modabber, F., Dobrohotov, B., Swindl, J., Kelly, J.M., Aslund, L., Hoheisel, J., Ruiz, A.M., Cazzulo, J.J., Petterson U. & Frasch, A.C.C. (1997). The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. Parasitol. Today, 13, 16-22.
- Zuniga, C., Palau, T., Penin, P., Gamallo, C. & Diego, J. D. (1997). Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. Trop. Med. Int. Health., 2, 482-487.