

Tesis de Posgrado

Clonado y caracterización de un antígeno rico en aminoácidos ácidos de *Trypanosoma cruzi* y su posible rol en la inmunopatogenia de la cardiopatía chagásica crónica

Ghio, Sergio Claudio

2003

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:

Ghio, Sergio Claudio. (2003). Clonado y caracterización de un antígeno rico en aminoácidos ácidos de *Trypanosoma cruzi* y su posible rol en la inmunopatogenia de la cardiopatía chagásica crónica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3535_Ghio.pdf

Cita tipo Chicago:

Ghio, Sergio Claudio. "Clonado y caracterización de un antígeno rico en aminoácidos ácidos de *Trypanosoma cruzi* y su posible rol en la inmunopatogenia de la cardiopatía chagásica crónica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3535_Ghio.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales*

*"Clonado y caracterización de un antígeno rico en aminoácidos
ácidos de Trypanosoma cruzi y su posible rol en la
inmunopatogenia de la cardiopatía chagásica crónica"*

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

Sergio Claudio Ghio

*Director: Dr. Mariano Levin
Director Asistente: Dra. Gabriela Levitus*

Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas

*Instituto de Investigaciones en Ingeniería
Genética y Biología Molecular
INGEBI UBA/CONICET*

2003

Nº 3 5 3 5

CLONADO Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTÍGENO RICO EN AMINOÁCIDOS ÁCIDOS DE *Trypanosoma cruzi* Y SU POSIBLE ROL EN LA INMUNOPATOGENIA DE LA CARDIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA

Resumen

Se ha postulado la hipótesis de un origen autoinmune para explicar la etiología de la enfermedad de Chagas. Este proceso autoinmune podría ser el resultado de una respuesta inmune cruzada contra componentes específicos de células cardíacas que comparten epítopes con antígenos de *Trypanosoma cruzi* (mimetismo molecular). En trabajos anteriores demostramos que los anticuerpos de pacientes crónicos, inmunopurificados con el péptido correspondiente a los 13 aa C-terminales de la proteína ribosomal P2 β de *T. cruzi* (TcP2 β), alteraron la frecuencia de latidos de cardiocitos en cultivo ya que también podían reconocer el segundo bucle de los receptores cardíacos (M₂ muscarínicos y β -adrenérgicos). Lo mismo ocurrió con los inmunopurificados contra un péptido correspondiente a la proteína ribosomal P0 (TcP0). Tanto los epítopes parasitarios como los del hospedador reconocidos por estos anticuerpos estaban formados por secuencias aminoacídicas ácidas. En la búsqueda de nuevos antígenos que pudieran producir este tipo de reacción cruzada, se propuso el rastreo de ESTs (Expressed Sequence Tags) producidos en el Proyecto Genoma *T. cruzi* que codificaran para proteínas ricas en secuencias ácidas. De este modo se aisló un EST de 718 pb. Se obtuvo la secuencia completa del gen que denominamos *garp* (glutamic acid rich protein) de 3500 pb, que es de copia única y origina un único ARNm de aproximadamente 4 kb. Según la comparación de secuencias se encontró una identidad de hasta 72 % con secuencias de *T. brucei*. La proteína es de 130 KDa, y según ensayos de Western blot e inmunofluorescencia se localiza en el citoplasma del parásito. Aproximadamente el 20 % de los sueros de pacientes con la

enfermedad de Chagas crónica fueron capaces de reconocer la proteína recombinante GARP, y todos ellos lo hicieron con la región más C-terminal de la proteína, que contiene los aminoácidos ácidos. La inmunización con la proteína recombinante GARP provocó la aparición de anticuerpos dirigidos contra toda la proteína. Estos anticuerpos no modificaron la frecuencia de latidos de los cardiocitos en cultivo, y consecuentemente los ratones no sufrieron alteraciones electrocardiográficas.

Como un método alternativo de inmunización, ensayamos la metodología de inmunización con ADN. Con esta técnica de inmunización se pretendía reflejar mejor la situación de la infección crónica, ya que la presentación constantes de los antígenos parasitarios por las células musculares del hospedador podría ser mas adecuada para estudiar la patogenicidad de la enfermedad. Para poner a punto esta metodología, realizamos inmunizaciones con las proteínas ribosomales TcP2 β y TcP0. Las inmunizaciones de ADN con TcP2 β , TcP0 y GARP generaron anticuerpos capaces de reconocer epítopes diferentes a los reconocidos en la infección natural. Los anticuerpos no provocaron alteraciones en la frecuencia de latidos de cardiocitos en cultivo ni se observaron alteraciones electrocardiográficas tales como las ocurridas cuando ratones fueron inmunizados con proteínas recombinantes TcP2 β y TcP0. Por tanto concluimos que la inmunización con ADN es capaz de generar anticuerpos que reconocen epítopes diferentes a los inducidos por inmunizaciones con proteínas recombinantes o por la infección natural, lo cual es de utilidad al momento de generar una vacuna contra *T. cruzi*.

Palabras claves: *garp* (glutamic acid rich protein), *Trypanosoma cruzi*, inmunización con ADN, proteínas ribosomales P.

CLONING AND CHARACTERIZATION OF AN ACID AMINOACID RICH ANTIGEN OF *Trypanosoma cruzi* AND ITS ROLE POSSIBLE IN THE IMMUNOPATHOGENY OF THE CHRONIC CHAGAS' HEART DISEASE

Abstract

The hypothesis of an autoimmune origin has been postulated to explain the etiology of the Chagas' heart disease. This autoimmune process could be the result of an immune response capable of cross-reacting to specific components of heart tissues that share epitopes with antigens of *Trypanosoma cruzi* (molecular mimicry). As we have previously reported, antibodies of chronic patients, recognizing a peptide corresponding to the 13 aminoacid C-terminus (peptide R13) of the *T. cruzi* ribosomal P2 β protein (TcP2 β) altered the frequency of cardiomyocyte beating culture. These antibodies were also able to recognize the second extracellular loop of the G-protein coupled receptors (M2 muscarinic and β -adrenergic receptors). Antibodies immunopurified against the C-terminus of the *T. cruzi* ribosomal P0 protein (TcP0) present a similar functional and physico-chemical features. Both the parasitic and the host epitopes recognized by these antibodies are composed of acidic sequences. In the search of new antigens that could produce this type of cross-reaction, we looked for ESTs (Expressed Sequence Tags) in the Genome Project of *T. cruzi* coding for acidic residues rich proteins. So we identified a EST of 718 bp. The complete sequence of the gene (3500 bp) was obtained and we named it *garp* (glutamic acid rich protein). This gene exists in a single copy and gives origin to only transcript of approximately 4 kb. Its sequence was compared with database, finding a identity up to 72% with *T. brucei* sequences. The protein has 130 KDa, and both Western blot and immunofluorescence assays located it into cytoplasm. Approximately 20% of the sera of chronic chagasic patients were capable to recognize the recombinant

protein GARP, and all of them recognized only the C-terminus of GARP, which contains the acidic sequences. When we immunized mice with the recombinant protein GARP, we achieved antibodies against the whole protein GARP. With anti-GARP serum we carried out assays on beating rat cardiomyocytes. With neither of the antisera beating frequency was altered and immunized mice with high anti-GARP titers showed no electrocardiographic alterations.

As alternative method of immunization, we assayed immunizations with DNA plasmids. With this immunization technique we attempted to reflect better the situation of the chronic infection, since the constant presentation of the parasitic antigens from the host's muscular cells could be more appropriate to study the pathogenicity of the disease. To set up this methodology we achieved immunizations with DNA coding genes of ribosomal TcP2 β and TcP0 proteins. The DNA immunizations with TcP2 β , TcP0 and GARP generated antibodies capable to recognize different epitopes to those obtained in the natural infection. No alterations in cardiocytes culture nor electrocardiographics recording in mice were observed. In contrast, immunization with TcP2 β and TcP0 recombinant proteins generated functionally active antibodies. So we conclude that DNA immunization is useful to generate antibodies against epitopes that are different than the antibodies obtained in immunization with recombinant protein o in the natural infection. This could be useful to generate a vaccine against *T. cruzi*.

Key words: *garp* (glutamic acid rich protein), *Trypanosoma cruzi*, DNA immunization, ribosomal P proteins

Agradecimientos:

Bueno..., ésta es una de las peores partes, ya que uno siempre se olvida de alguien que también fue importante en esta etapa. Por eso les pido que sepan disculpar los que no aparezcan en este listado; pero de algo pueden estar seguros, que si pasaron y me relacione con ustedes, fue porque fueron importantes para mí.

Mi agradecimiento para el Dr. Héctor Torres y la Dra. Mirtha Flawiá por haberme permitido realizar esta tesis en este instituto y por brindarme su afecto y amistad.

Al Dr. Mariano Levin por aceptarme en su laboratorio y permitirme realizar esta tesis.

A la Dra. Gabriela Levitus por haber aceptado ser mi Directora Asistente y haberme guiado y ayudado en todo momento, y también por ser una mina piola y divertida.

A los otros doctores del laboratorio Alejandro Schijman y Martín Vázquez, con los que me inicié y fueron mis maestros en todo momento. A Ale por su amistad, su predisposición para ayudar en todo momento. A Martín con quien me divertí mucho y que no solo me enseñó biología molecular, ahora gracias a él abro mi computadora y conecto y desconecto cosas (aunque no siempre vuelva a funcionar).

A Hernán Lorenzi, que comenzamos juntos en este laboratorio y con quien me divertía mucho mientras trabajábamos, haciendo coritos cantando, silbando, o en las fiestas haciendo coreografías, siempre con su buena onda y buen humor, aunque a veces se ponía monofásico...

A Claudia Ben Dov que si bien en un tiempo me sacaba de quicio, siempre fue muy solidaria ayudando a todo el mundo en lo que estaba a su alcance.

A Evelina Mahler por ser muy piola y siempre con sus excentricidades gastronómicas y del buen beber, y por que siempre predispuesta a ayudarme en lo que podía.

A Sonia Lafón por su buena onda y por estar con buena predisposición para ayudarme cuando la necesitaba.

A Juan Burgos porque siempre me ayudó en todo lo que pudo y siempre me divierte con sus salidas oportunas.

A Vanina Grippo por su torta de manzanas buenísima, porque se bancó lo peor del trabajo con los ratones y haberme ayudado mucho en los experimentos de esta tesis.

A Romina Volcovich aunque callada, me ayudó en muchas cosas.

A Verónica Dos Santos Ferreira por su cálida amistad, por restituir el saludo con un beso en el laboratorio, por ser divertida y muy buena amiga.

A Vivian Labovsky por sus salidas y risotadas que me divertían, y por ayudarme con la microscopía y por las galletas de arroz.

A Ken Kobayashi que también fue mi maestro, que siempre me sorprendía porque todos los días me enseñaba algo nuevo y que ahora que se fue, se extraña.

A Julián Taranda que a pesar de que no pensamos igual siempre me aguanta y soporta en los buenos y malos momentos.

Jorge Flores por estar siempre alegre y ser muy solidario.

A Germán Robledo que también me divierte aunque hable bajito y le tenga que pedir que me repita.

A Amy Curto que también estuvo bien dispuesta en ayudarme y por tener muy buena onda.

A Martín Edreira que me ayudó con las levaduras y el doble híbrido.

A los que pasaron por el lab: Cecilia Medrano porque confió en mí y por su buena onda; Mariana Catalani que siempre me divierte con sus mails; Francisco Quintana un buen amigo que se extraña; Darío Lemos mi primer aprendiz, porque aprendió bien... y por ser un tipo agradecido; Alfredo Panebra con quien compartía la mesada y charlas amenas; Silvia Brandariz por su constante alegría y buena onda; Dan Kaplan que también influyó en mis comienzos, me enseñó y

ayudó cuando lo necesité; Ines Ferrari por sus locuras; Maxi Juri Ayub por ser un buen tipo y compartir divertidos momentos durante el trabajo.

A los nuevos del lab: Cristian, Catalina, Ignacio y Natalia.

A los del grupo Papa porque fue y será mi segundo laboratorio, al cual iba a pedir cosas, consejos y otras yerbas... Fernando Bravo, Juan Pablo Luppi, Sonia Wirth, Alicia Zelada, Marina Clemente, Paola Vetere, Silvia Lede, Alejandro Suyama, María Eugenia Segretin, Roberto Curilovic, Natalia Modena, Erika Stiefel y Alejandro Mentaberry.

A Marta Judewics que me persiguió todos los días para que escribiera esta tesis.

A Irma, Mary, Alicia y Mariano, porque me tienen que enseñar como mandar un fax cada vez que voy y por tener buena predisposición para hacerlo.

A los de los demás laboratorios: Daniel Portal por ser muy buen tipo, Cristina Paveto, Claudio Pereyra, Guille Alonso, Guille Lobo, Maxi D'angelo, Catalina Guida, Isabel Santori, Diego Gelman que siempre está sonriendo, Flavio Junqueira, Jorge Muschietti, Laura Cabanas, Diego Wrieger, Pablo Gargantini, Mariana Gallo, Mariana Lozada y Agustina Massella.

A Gladys, Mary, Leonor y Francisco por tener buena onda y siempre dispuestos a ayudar en lo que necesite.

A mis amigos: Luis, Félix, Marcelo, Leandro, Joaquín, Carlos y Guille porque me soportan y apoyan en la buenas y en las malas, y me han hecho y me hacen pasar gratos momentos.

A mis padres Betty y Tito, a mi hermana Rosana y a mi abuela Juana.

Bueno... a todos muchas gracias...

Serge

Abreviaturas y unidades utilizadas

aa	Aminoácidos
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN copia
ARNasa	Ribonucleasa A
BSA	Seroalbúmina bovina
c.s.p.	Cantidad suficiente para
cm	Centímetros
CPA	Célula presentadora de antígeno
Da	Dalton
ddNTP	Dideoxitrinucleótidos
dNTPs	Deoxitrinucleótidos
DO	Densidad óptica
ECG	Electrocardiograma
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
fmoles	Femtomoles
g	Fuerza de gravedad
gr.	Gramos
IPTG	Isopropiltiogalactósido
kb	Kilopares de bases
M	Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligramos
min.	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mseg	Milisegundos
N	Normal
° C	Grados centígrados (Celsius)
p/v	Peso en volumen
pb	Pares de bases
pmoles	Picomoles
r.p.m.	Revoluciones por minuto
seg.	Segundos
SFB	Suero fetal bovino
TEMED	N, N, N', N'- tetremetilenodiamina
U	Unidades
V	Voltios
v/v	Volumen en volumen
W	Watts
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros

μCi	Microcurie
μF	Microfaradios
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar

INTRODUCCION

<i>La enfermedad de Chagas</i>	1
<i>El parásito: Clasificación, morfología y ciclo de vida</i>	3
<i>Fases de la enfermedad</i>	7
<i>Diagnóstico</i>	11
<i>Características del Orden Kinetoplastida</i>	13
<i>Clonado de genes de T. cruzi</i>	17
<i>Antígeno JL7</i>	18
<i>Antígeno JL5</i>	18
<i>Antígeno JL52</i>	18
<i>Proteínas ribosomales P</i>	19
<i>Autoinmunidad en la Enfermedad de Chagas</i>	20
<i>Inmunización con ADN</i>	24
<i>Inmunidad celular</i>	32
<i>Respuesta Humoral</i>	34
<i>Modos de administración</i>	35

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

<i>Hipótesis de trabajo</i>	36
<i>Objetivos</i>	38

MATERIALES Y MÉTODOS

<i>Soluciones y medios utilizados</i>	40
<i>Plásmidos</i>	42
<i>Bacterias</i>	42
<i>Levaduras</i>	42
<i>Mantenimiento de las cepas</i>	43
<i>Cepa de referencia de T. cruzi</i>	43
<i>Preparación de bacterias E. coli DH5α competentes para transformación con plásmidos</i>	43
<i>Cortes con enzimas de restricción</i>	44
<i>Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa de bajo punto de fusión</i>	44
<i>Subclonado en plásmidos</i>	44
<i>Subclonado en el plásmido pGEM-T Easy</i>	45
<i>Transformación de bacterias competentes DH5α con ligaciones de plásmidos</i>	45
<i>Análisis de los plásmidos recombinantes (Quick minipreps)</i>	46
<i>Extracción de ADN plasmídico</i>	46
<i>Rastreo radiactivo de plásmidos recombinantes</i>	47
<i>Marcado radiactivo de oligonucleótidos para el rastreo de insertos</i>	47
<i>Hibridación de los filtros con oligonucleótidos marcados radiactivamente</i>	48
<i>Secuenciación automática</i>	48

<i>Secuenciación manual</i>	49
<i>Amplificación por PCR de los insertos para subclonado</i>	50
<i>Electroforesis en geles nativos de agarosa</i>	51
<i>Producción de proteínas en el sistema pMAL</i>	51
<i>Purificación de las proteínas recombinantes sistema pMAL</i>	51
<i>Producción de proteínas en el sistema pGEX</i>	52
<i>Detección de cuerpos de inclusión</i>	52
<i>Determinación de la concentración de proteínas</i>	53
<i>Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida</i>	53
<i>Tinción de los geles con Coomassie blue</i>	54
<i>Electrotransferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa</i>	54
<i>Revelado inmunoenzimático</i>	55
<i>Obtención de lisado de Escherichia coli</i>	55
<i>Patrones de peso molecular</i>	56
<i>Determinación de anticuerpos por la técnica de ELISA</i>	56
<i>Determinación de isotipos</i>	56
<i>Inmunización de ratones con proteínas recombinantes</i>	57
<i>Preparación de extractos de proteínas totales de Trypanosoma cruzi a partir de lisados de epimastigotes</i>	58
<i>Western blot con extractos de proteínas totales de Trypanosoma cruzi y competición con proteínas recombinantes</i>	58
<i>Preparación de ARN total de Trypanosoma cruzi</i>	59
<i>Electroforesis con ARN para Northern blot</i>	59
<i>Transcripción reversa de ARN total de Trypanosoma cruzi</i>	60
<i>Preparación de ADN total de Trypanosoma cruzi</i>	60
<i>Electroforesis con ADN digerido con enzimas de restricción para Southern blots</i>	61
<i>Preparación de bloques de Trypanosoma cruzi para electroforesis de campos pulsados</i>	61
<i>Electroforesis en campos pulsados (PFGE)</i>	61
<i>Preparación de sondas radiactivas</i>	62
<i>Hibridización con sondas radiactivas</i>	63
<i>Fraccionamiento celular de Trypanosoma cruzi por centrifugación diferencial</i>	63
<i>Preparación de epimastigotes para la localización de la proteína por inmunofluorescencia</i>	64
<i>Transfección de células COS-7 con lipofectaminas.</i>	65
<i>Detección de los productos de expresión en células COS-7 transfectadas</i>	65
<i>Inmunización de ratones con plásmidos recombinantes</i>	66
<i>Toma de colectas y obtención de los sueros de ratones inmunizados con plásmidos recombinantes</i>	67
<i>Toma de electrocardiogramas</i>	67
<i>Cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal</i>	68
<i>Precipitación de IgG totales a partir de sueros con 40 % de sulfato de amonio</i>	70
<i>Ensayo de actividad funcional de anticuerpos en cultivo de cardiocitos (frecuencia de contracción)</i>	70

<i>Sistema de doble híbrido en levaduras para la determinación de interacción entre proteínas</i>	71
<i>Cotransformación de levaduras</i>	72
<i>Detección de interacción en doble híbrido con X-gal</i>	73
 RESULTADOS	
<i>Obtención del EST y del gen completo</i>	74
<i>Caracterización genética de garp</i>	80
<i>Análisis de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen garp</i>	85
<i>Expresión del gen garp</i>	88
<i>Reconocimiento de GARP en lisados de parásitos</i>	96
<i>Localización celular de GARP</i>	97
<i>Inmunofluorescencia en epimastigotes de T. cruzi</i>	98
<i>Ensayos funcionales sobre cardiomiocitos de ratas neonatas</i>	101
<i>Inmunización con ADN</i>	101
<i>Interacción entre proteínas ribosomales P</i>	115
 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	
<i>Discusión</i>	120
<i>Conclusiones</i>	130
<i>Firma del Doctorante, Director Asistente y Director de Tesis</i>	131
 BIBLIOGRAFÍA	
<i>Bibliografía</i>	132

Introducción

La enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas es una dolencia infecciosa de naturaleza endémica y evolución clínica esencialmente crónica. Es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos hematófagos, siendo el principal vector en nuestro país el *Triatoma infestans*, conocido comúnmente como vinchuca (Fig. 1). Tanto la enfermedad como el ciclo de vida del agente transmisor fueron descubiertos por el investigador Carlos Chagas, del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, Brasil (1909).

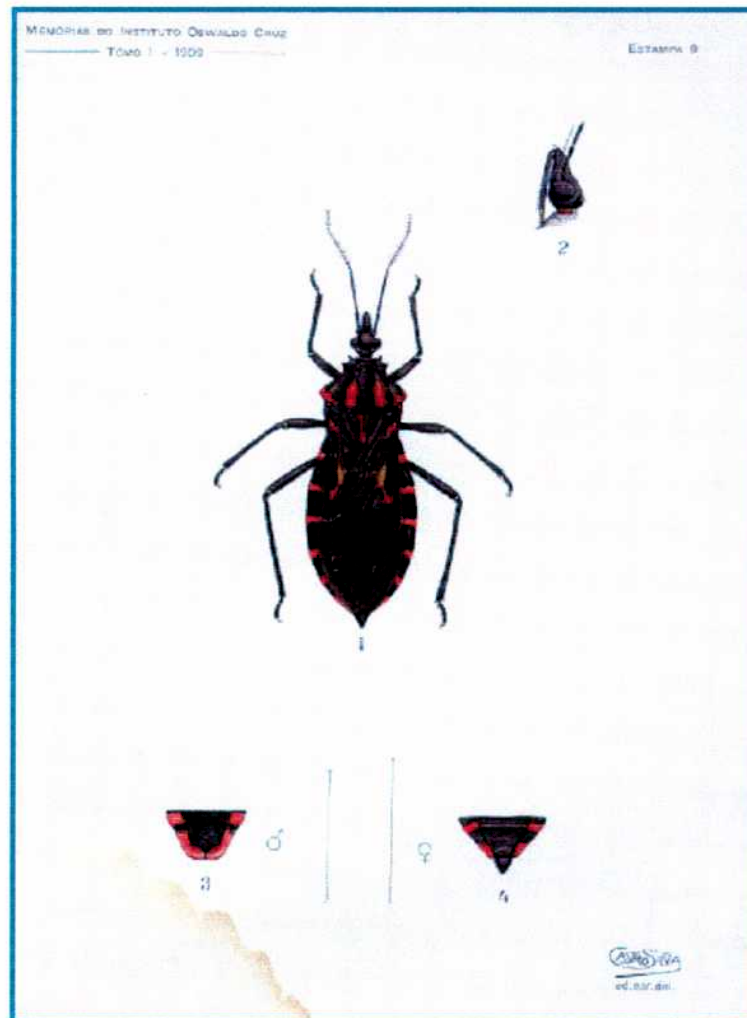


Figura I: Dibujo de un vector (*Conorhinus megistus*) publicado en 1909 por Carlos Chagas (Chagas, 1909)

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades parasitarias más serias de Latinoamérica, con un impacto social y económico más importante que los causados por la malaria, leishmaniasis y esquistosomiasis. Su distribución geográfica se extiende desde México hasta el sur de la Argentina y se superpone con las áreas donde habitan los vectores. Se considera que entre 16 y 18 millones de personas están infectadas por *T. cruzi*, alrededor de 60.000 mueren por año debido a la enfermedad y que 100 millones (aproximadamente el 25 % de la población de Latinoamérica) viven en zona de riesgo.

El Banco Mundial calculó en 1993 una pérdida económica anual debida a la enfermedad equivalente a más de U\$S 6.500 millones por año (WHO, 1997; Schofield & Dias, 1999). De acuerdo al UNDP Human Development Report el promedio anual per capita del PBI en Latinoamérica es de U\$S 2.966. Así, las pérdidas económicas para el continente debido a la mortalidad temprana e incapacidad por esta enfermedad en adultos jóvenes económicamente productivos, alcanza actualmente los U\$S 8.156 millones, lo que equivale al 2,5 % de la deuda externa de todo el continente en 1995 (WHO 2001).

La incidencia de la endemia está condicionada, además, al nivel socioeconómico de la región y, en particular, al tipo de viviendas precarias de las poblaciones rurales, ya que la vinchuca encuentra un hábitat favorable en las grietas de las paredes de barro y techos. Por otro lado, los movimientos migratorios de áreas rurales a urbanas que ocurrieron en Latinoamérica en los años 70s y 80s cambiaron el patrón epidemiológico tradicional de la enfermedad, la cual se transformó en una infección urbana que puede transmitirse también por transfusión de sangre. En este sentido, la prevalencia de bolsas infectadas en bancos de sangre varía entre 3 y 53 %, dependiendo de la ciudad, y en muchos casos es mayor a la correspondiente a HIV y hepatitis B y C (WHO, 2001).

La prevención y control se llevan a cabo a través del combate sistemático del vector con insecticidas, la educación sanitaria, la construcción o mejoramiento de

las viviendas, la eliminación de los animales domésticos infectados, el uso de mosquiteros y el control y descarte de las bolsas de sangre contaminada.

El décimo encuentro de la Iniciativa del Cono Sur para la eliminación de la enfermedad de Chagas fue realizado en Montevideo en marzo de 2001. Según los datos aportados, la tasa de infestación de viviendas en la Argentina ha decaído de 6,1 % en 1992 a 1,2 % en 2000, mientras que la tasa de infección en edades de 0-4 años ha decaído de 1,7 % en 1992 a 0,9 % en 2000. Los datos también indican que la transmisión vectorial se ha interrumpido en 13 de las 19 provincias endémicas de nuestro país. Países como Chile y Uruguay han sido declarados libre de transmisión vectorial en 1999 y 1997, respectivamente.

El parásito: clasificación, morfología y ciclo de vida:

La ubicación sistemática del *Trypanosoma cruzi* es la siguiente (Hoare, 1972; Levine y col., 1980):

Reino	Protista
Phylum	Sarcomastigophora
Sub-phylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	Trypanosoma
Subgénero	Schizotrypanum
Especie	cruzi (Chagas, 1909)

El orden Kinetoplastida comprende organismos flagelados que poseen una estructura mitocondrial particular, denominada kinetoplasto. Este consiste de una red de moléculas de ADN formada por 5.000 a 10.000 minicírculos entrelazados y por unos 20 a 50 maxicírculos (Simpson, 1987). Durante su ciclo biológico, el *T. cruzi* presenta tres estadios: amastigote, epimastigote y

tripomastigote, los cuales se distinguen por la posición relativa del kinetoplasto respecto del núcleo y las características del flagelo (Brenner, 1973).

♦ El **epimasigote** es la forma flagelada replicativa en el intestino medio del insecto vector. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el kinetoplasto es anterior al núcleo celular. (Fig. II)

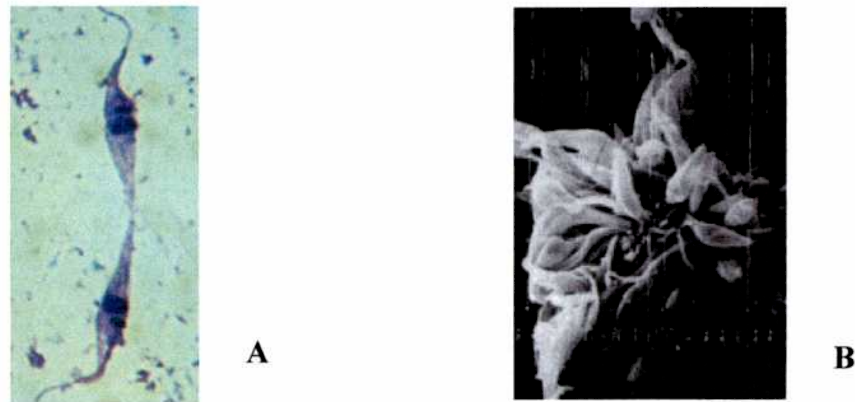


Figura II: Fotografías de epimastigotes vistos en microscopio óptico (A) y microscopio electrónico de transmisión (B)

♦ El **tripomastigote** es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospedadores. El flagelo emerge del extremo apical posterior y el kinetoplasto es posterior al núcleo celular. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero, y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en el insecto, que son las formas infectivas (Fig. III).

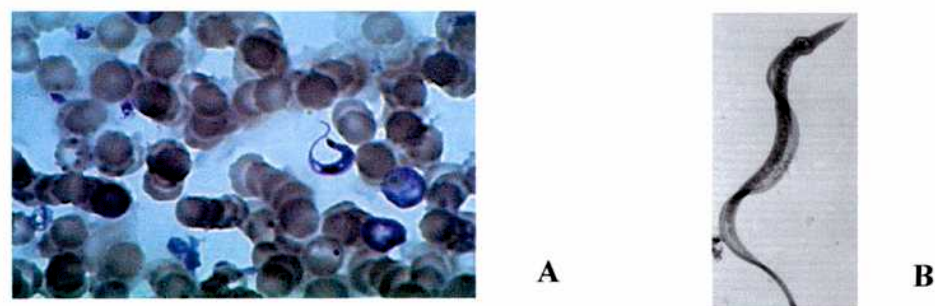


Figura III: Fotografías de tripomastigotes vistos en microscopio óptico (A) y microscopio electrónico de transmisión (B)

♦ El **amastigote** es la forma no flagelada, de localización intracelular en vacuolas acídicas (Ulises de Carvalho y col., 1989) y replicativa en el citoplasma del hospedador (Ley y col., 1990) (Fig. IV)

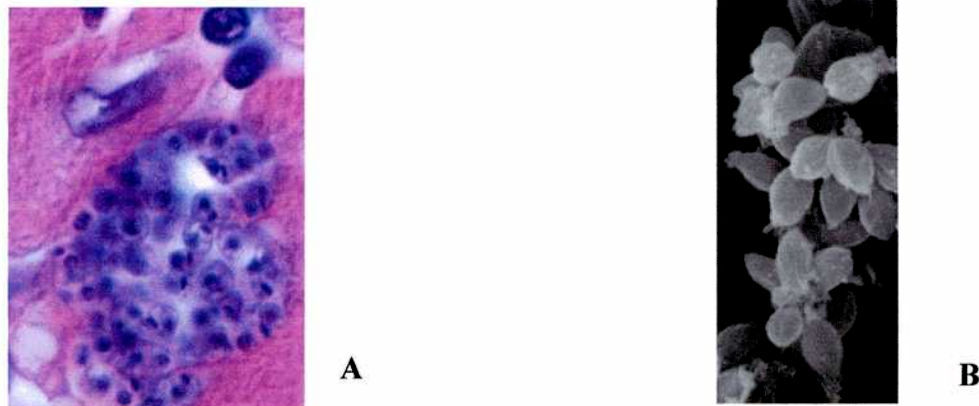


Figura IV: Fotografías de amastigotes vistos en microscopio óptico (A) y microscopio electrónico de transmisión (B)

El estadio de *T. cruzi* que es ingerido e infeccioso para el vector es el tripomastigote sanguíneo (G), que obtiene de la sangre del hospedador vertebrado (Fig. V). En el intestino del insecto (A), los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes, los cuales se adhieren a la pared intestino medio y se dividen por fisión binaria. En la porción final del intestino los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos los cuales son evacuados con las heces. Los vectores defecan mientras se alimentan, y las heces contaminadas (C) penetran fácilmente en las heridas producidas por la misma persona al rascarse en la zona de la picadura. También es muy común la penetración del parásito vía mucosa, especialmente a través de la mucosa ocular. El tripomastigote metacíclico entra así al hospedador vertebrado (D), para luego infectar diferentes tipos celulares. Dentro de las células, los parásitos se diferencian en amastigotes, se dividen hasta romper las células, son liberados e infectan a las células vecinas.

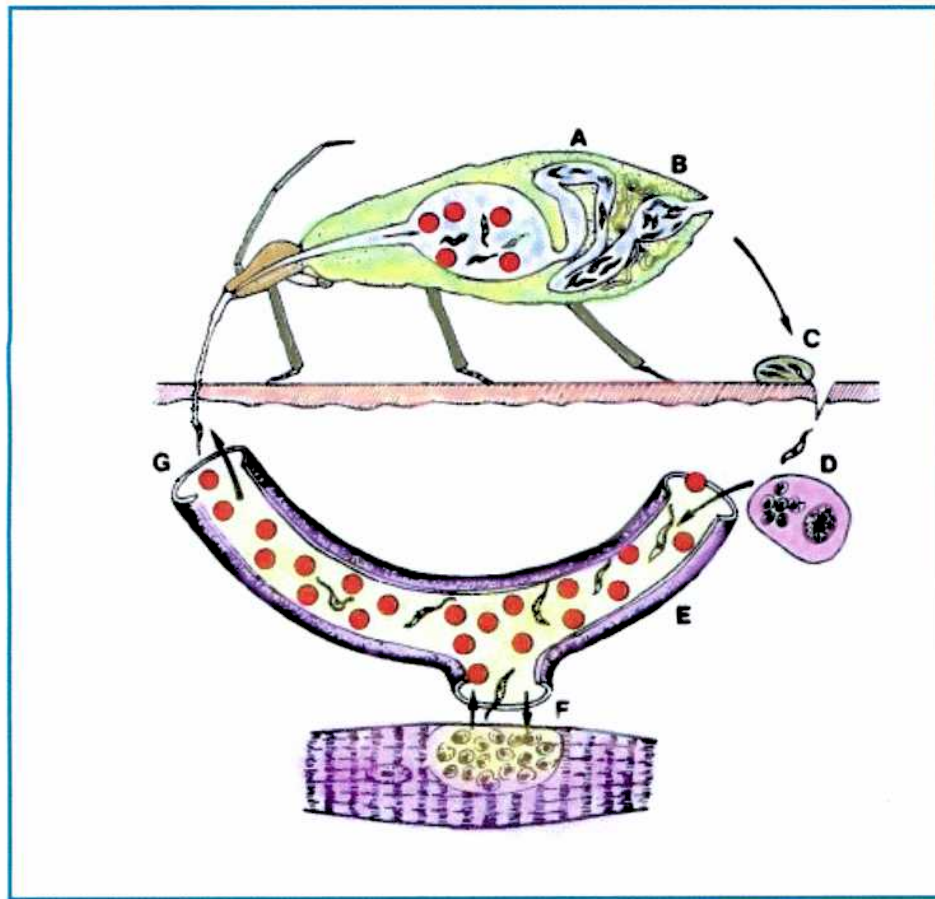


Figura V: Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi

En algunas células infectadas, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, los que eventualmente alcanzan la corriente sanguínea (E) y desde donde tienen acceso para infectar otros tejidos (F). Dentro de los mismos se replican como amastigotes, los cuales (como en el paso D) pueden diferenciarse en tripomastigotes y volver a la corriente sanguínea, desde donde pueden ser ingeridos por el vector (G).

Como se mencionó anteriormente, la principal vía de infección es la vectorial, aunque también es importante el contagio por transfusión de sangre. Otras vías de transmisión incluyen la congénita, la debida a infección accidental del laboratorio y la causada por trasplante de órganos infectados.

Fases de la enfermedad

La infección en humanos ocurre en tres fases: aguda, indeterminada y crónica.

La **fase aguda** aparece inmediatamente después de la infección y dura entre 1 a 2 meses. Durante esta fase se produce una multiplicación parasitaria intensa y sobreviene una reacción inmune en respuesta a esta agresión. Esta reacción humoral determina la aparición de anticuerpos detectables por las reacciones serológicas específicas. En la mayoría de los casos la infección tiene lugar durante la primera década de la vida del individuo, encontrándose las mayores frecuencias de casos agudos hasta los 5 años de edad. La mayoría de los infectados (alrededor del 90%) no presenta manifestaciones clínicas. Cuando éstas ocurren, puede aparecer fiebre de intensidad variable, malestar general, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia. También es frecuente la observación de la reacción inflamatoria en el sitio de inoculación, conocida como chagoma, y el edema inflamatorio unilateral de los párpados (signo de Romaña), que ocurre en 10 a 20 % de los casos agudos (Fig. VI).



Figura VI: Niño con signo de Romaña (WHO, 2001)

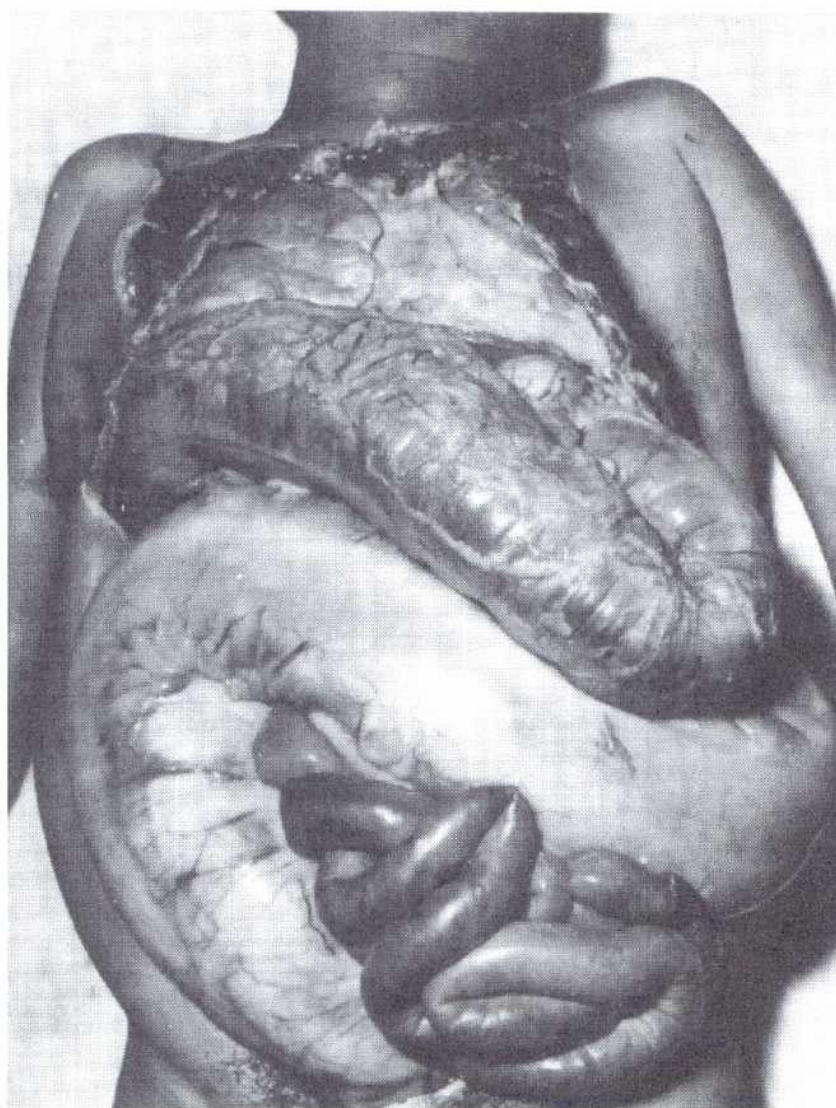
El compromiso cardíaco (miocarditis aguda) también puede ser una manifestación clínica de esta etapa. Ocurre con una frecuencia variable y la

mayoría de las veces es reversible, aunque algunos casos pueden evolucionar hacia formas graves y fulminantes (Santos-Buch y col., 1985; Laranja y col., 1956; Rosembaum, 1964). Las escasas autopsias realizadas en pacientes con miocarditis chagásica aguda muestran parásitos en el interior de las miofibras. El daño miocárdico es difuso, con miocitólisis, cambios degenerativos de las fibras miocárdicas y marcada infiltración celular intersticial. Como en otras miocarditis infecciosas agudas, la insuficiencia cardíaca congestiva y las arritmias ventriculares y auriculares son los hallazgos más frecuentes: extrasístoles polimorfas, taquicardia ventricular e incluso el aleteo ventricular pueden preceder a la fibrilación ventricular. La imagen electrocardiográfica puede ser indistinguible de la de un infarto agudo de miocardio por cardiomiopatía isquémica (Elizari y col., 1993). La muerte se produce como consecuencia de taquiarritmias ventriculares refractarias, insuficiencia cardíaca congestiva o tromboembolismo sistemático. La meningo-encefalitis puede ser otra de las complicaciones que ocurren en niños de corta edad.

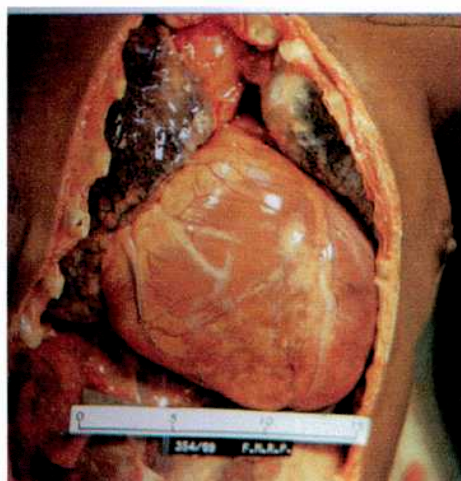
A la **fase indeterminada** ingresan los pacientes que han superado el cuadro agudo inicial. Se caracteriza por ser asintomática, con electrocardiograma en reposo y radiografía de tórax normal. Con el tiempo (5 a 20 años), pueden aparecer manifestaciones lesionales, generalmente electrocardiográficas. Otros métodos más sensibles (ergometría, Holter de 24 horas, ecocardiografía, estudios electrofisiológicos, radioisotópicos y hemodinámicos) pueden revelar anormalidades. Los estudios anatomopatológicos ponen de manifiesto lesiones generalmente de tipo inflamatorio. Durante esta fase y la siguiente (crónica), la parasitemia es muy baja, resultando negativa según los métodos parasitológicos convencionales (ver más adelante). Sin embargo, las pruebas serológicas constituyen las herramientas usuales de diagnóstico, ya que se mantienen positivas durante toda la vida del individuo.

La **fase crónica** aparece después de un período de silencio que puede durar varios años. Las lesiones irreversibles de la fase crónica afectan a órganos internos como el corazón (principalmente), esófago y colon, y el sistema nervioso periférico (Fig. VII). A pesar de que hasta el momento se desconocen los factores que determinan cual será el curso de la infección, se cree que el tipo de cepa infectante (Lambrecht, 1965; Peralta, 1980), la cantidad de parásitos inoculados, la existencia de reinfecciones (Santos-Buch y col, 1985) y la susceptibilidad del hospedador (Wrightsmann y col, 1982), podrían ser factores de importancia en el desarrollo de los síntomas clínicos de la enfermedad crónica.

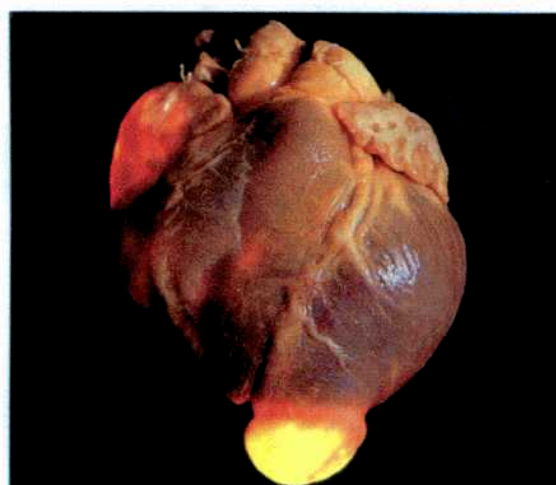
La manifestación más frecuente e importante en nuestro país de la Enfermedad de Chagas Crónica es la **Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC)** (Rosemabaum, 1964). La CCC se manifiesta con frecuencia en la tercer o cuarta década de vida del individuo infectado. Se trata de una enfermedad cardíaca altamente incapacitante, progresiva e irreversible prácticamente en la totalidad de los casos. Aproximadamente el 90% de los pacientes con CCC mueren dentro de un lapso de 5 años luego de su diagnóstico. Esencialmente se trata de una panmiocarditis, que en estadios avanzados presenta un marcado agrandamiento de las cavidades cardíacas, hipertrofia, deterioro de la función sistólica, disturbios en la conducción y arritmias. La CCC se caracteriza por la presencia de una necrosis microfocalizada y diseminada. Los cardiomiocitos se observan necrotizados o hialinizados, pero más frecuentemente se observa la presencia de cicatrices de tejido conectivo denso que reemplazan fibras necrotizadas. Este proceso se denomina fibrosis y se encuentra acompañado por la presencia de un infiltrado celular de tipo inflamatorio (células mononucleadas). La localización de los infiltrados también es panmiocárdica y microfocalizada.



Megacolon



Cardiomegalia



Aneurisma apical

Figura VII: Algunos de los síntomas desarrollados por pacientes chagásicos crónicos

En una primera etapa los focos de necrosis, fibrosis e infiltración son pocos y dispersos, sin registrarse signos clínicos ni alteraciones en el electrocardiograma. Luego de cierto tiempo el proceso se agrava por la multiplicación de los microfocos apareciendo los signos clínicos y electrocardiográficos de la CCC (Laranja y col, 1956; Rosenbaum, 1964; Elizari y col, 1993).

El motivo principal del deterioro cardíaco de un paciente con la enfermedad de Chagas crónico es una miocarditis activa en constante evolución. Una de las características distintivas de la CCC es que al observar muestras de autopsias o biopsias de corazón al microscopio raramente se encuentran nidos de amastigotes en las fibras miocárdicas (Rosenbaum, 1964). A pesar de que no se descarta la posibilidad de que el parásito esté presente, muchos autores encuentran poco probable que el daño tisular se deba a una acción directa de *T. cruzi* sobre el miocardio (Rosenbaum, 1964; Koberle, 1968; Lambrecht, 1965; Andrade y col, 1979). Entre los fenómenos inmunológicos que podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad, la hipótesis de la existencia de un proceso autoinmune ha recibido gran atención y base experimental (Hudson, 1985; Kierszenbaum, 1986 y 1999; Tarleton, 1999) pero también ha generado enormes controversias.

Diagnóstico

El diagnóstico en la fase aguda se realiza a través de la observación de los parásitos en sangre, el cultivo o el inmunodiagnóstico. En la fase crónica, el xenodiagnóstico y principalmente el inmunodiagnóstico son los procedimientos más usados.

Entre los métodos de diagnóstico parasitológicos convencionales se encuentran los directos como el de la gota gruesa, el de Strout y el microhematocrito. Son simples y rápidos pero presentan muy baja sensibilidad, siendo eficientes únicamente en los casos con altas parasitemias, como en la infección congénita reciente o en los casos agudos (Freilij y Altcheh, 1998). Las alternativas son el

hemocultivo y el xenodiagnóstico, ambos métodos laboriosos y de detección tardía; que muestran alta sensibilidad en la infección aguda, pero detectan menos del 50% de los casos crónicos, aún cuando se aplican en forma seriada (Segura, 1987; WHO, 1991). Entre las técnicas serológicas se destacan la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemaglutinación (HAI), la fijación del complemento (FC, o reacción de Machado-Guerreiro), y el ELISA (Atias, 1991). Si bien estos métodos presentan alta sensibilidad, pueden presentar falsos positivos por reacción cruzada, sobre todo aquellos realizados con extractos crudos de parásitos en pacientes de áreas endémicas superpuestas con *Leishmania spp.* o *Trypanosoma rangeli* (Araujo, 1986). La incorporación de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos a los ensayos serológicos permite optimizar el diagnóstico (Levin y col, 1991; Bialy, 1998) e identificar perfiles de anticuerpos antígeno-específicos asociados a distintas fases y patologías de la infección chagásica. Sin embargo, en muchos casos el status serológico no se correlaciona con la situación clínica del paciente, como en la infección congénita, debido al pasaje transplacentario de anticuerpos maternos, en pacientes inmunosuprimidos, o en pacientes con terapia anti-parasitaria (Galvao y col, 1993).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha surgido como un método de punta en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Persing, 1993) y se han publicado varios trabajos al respecto en distintas situaciones clínicas y epidemiológicas (Sturm y col, 1989; Moser y col, 1989; Wincker y col, 1994; Britto y col, 1995). Hasta ahora, los ensayos de PCR más promisorios para el diagnóstico de infección chagásica se han obtenido utilizando secuencias de los minicírculos del kinetoplasto del parásito (Sturm y col, 1989) y una secuencia nuclear altamente repetitiva o ADN satélite (Moser y col, 1989). A pesar de presentar una sensibilidad mucho más alta que el resto los otros métodos parasitológicos, no alcanza aún los niveles deseados como para ser incorporada como un nuevo método de diagnóstico de la fase indeterminada/crónica .

Características del Orden Kinetoplastida

Como se mencionó anteriormente, el orden Kinetoplastida comprende organismos que poseen una estructura mitocondrial particular, denominada kinetoplasto, que consiste en una red de moléculas de ADN formada por 5.000 a 10.000 minicírculos entrelazados y por unos 20 a 50 maxicírculos (Simpson, 1987). Los minicírculos de *T. cruzi*, de 1,4 Kb, presentan una estructura particular repetida 4 veces y que consiste en regiones variables alternadas con regiones conservadas de 120 pb, denominadas mini repeticiones (Degrave y col., 1988). Los minicírculos codifican ARN guías, involucrados en el proceso de edición de los ARN (Sturm y Simpson, 1990; Stuart, 1991). Los maxicírculos son moléculas de 39 Kb que corresponden al genoma mitocondrial (León y col., 1980), en el cual se han identificado genes para proteínas de la cadena respiratoria y para ARN ribosomales mitocondriales (Simpson y col., 1987; Sloof y col., 1985, 1987).

La ruta glucolítica se encuentra compartimentalizada en organelas denominadas glicosomas (Opperdoes y Borst, 1977). Estas organelas contienen, además, enzimas que intervienen en la β -oxidación de los ácidos grasos (Michels y Opperdoes, 1991).

Los kinetoplástidos cuentan con un mecanismo inusual de regulación de la expresión génica mitocondrial: la edición de los ARNm. Este mecanismo consiste en la inserción y/o delección de uridinas en sitios específicos de los transcritos primarios mitocondriales (Benne y col., 1986; Feagin y col., 1987). Este mecanismo post-transcripcional ocurre en sentido 3' a 5' y requiere la intervención de moléculas pequeñas de ARN (aprox. 60 pb.) denominadas ARN guías, que son codificados por maxicírculos y/o minicírculos, dependiendo de la especie (Stuart, 1991).

Existen familias de genes nucleares repetidos en tandem que expresan transcriptos policistrónicos, que luego son procesados para formar ARN maduros capaces de ser traducidos (Borst, 1986; Miller y Wirth, 1988). Poseen un mecanismo de transcripción discontinua o *trans*-splicing, que comprende la adición de un mini-exón o "spliced leader" (SL) en el extremo 5' de todos los transcriptos primarios nucleares. El SL que presenta una secuencia de 39 bases, conservada entre los tripanosomátidos, es aportada por la región 5' de una molécula de ARN no poliadenilada, de 85-140 bases según la especie (110 bases en *T. cruzi*), denominada ARN dador del SL (SL-ARN o med-ARN), que se transcribe en forma independiente a la de los genes que codifican proteínas (Campbell y col., 1984; Dorfman y Donelson, 1984; Borst, 1986). Las regiones intergénicas contienen las señales necesarias para que se produzca el *trans*-splicing. Ellas son un tracto de polipirimidinas (pPY) que puede variar en su longitud y tamaño, y un dinucleótido AG, aceptor del SL, que se encuentra localizado a unas 30-60 bases río abajo del pPY y hacia arriba del codón de iniciación del gen. Tanto la región de pPY como el AG aceptor conforman el sitio 3'ss ("*splicing site*"). También se han descripto procesos de *trans*-splicing alternativos en donde se utilizan diferentes dinucleótidos AG aceptores presentes entre el tracto de pPY y el ORF localizado río abajo, dando como resultado ARNm con extremos 5' UTR de extensión variable. En estos casos, la población de ARNm que utiliza el AG más cercano al tracto de pPY suele ser la preponderante (Hummel y col, 2000).

La mayoría de los genes estructurales poseen múltiples sitios aceptores del SL de una distancia de 10 a 200 bases por encima del codón de iniciación de la traducción. Estos se hallan en las regiones 5' flanqueantes de los genes y en las regiones intergénicas de transcriptos policistrónicos. El mecanismo de *trans*-splicing permitiría resolver los precursores policistrónicos en unidades monocistrónicas maduras (Muhich y Boothroyd, 1988; Van der Ploeg, 1986). Se ha propuesto además que removería las extensas regiones 5' flanqueantes de los

genes de tripanosomátidos, en los cuales pueden existir otros codones de iniciación potenciales (Huang y Hirsh, 1989).

Los kinetoplástidos presentan estructuras de CAP inusuales, exclusivas del SL-ARN y de los snRNAs (small nuclear RNA), que consisten en 7-mono-metil-guanosinas que se ligan a las 4 bases 5' modificadas de estos ARNs, denominados estructuras de CAP 4 (Perry y col., 1987; Freistadt y col., 1988).

Mediante *trans*-splicing, el SL-ARN transfiere al precursor de ARNm el SL provisto del CAP. De esta manera, este mecanismo provee la estructura de CAP a todos los transcriptos que codifican proteínas o *trans*-capping, lo cual podría tener incidencia en su traducción y/o estabilidad (Lenardo y col., 1985). Por otro lado, el proceso de poliadenilación no ha sido completamente caracterizado. A pesar de no haberse encontrado una secuencia consenso como en eucariotas superiores, se sabe que este proceso está acoplado al proceso de *trans*-splicing. La maquinaria de poliadenilación se posa sobre el tracto de pPY y censa cual es el AG a utilizar como aceptor del SL para luego cortar y agregar el poliA 100 a 150 bases hacia arriba del AG aceptor. El agregado de la cola de poliA siempre se produce a continuación de una adenina (Vasella, 1994). A diferencia de la poliadenilación de los ARNm en eucariotas superiores, en los cuales existe un único sitio de inserción del poliA, en tripanosomas la poliadenilación no siempre se da en el mismo lugar, lo cual genera una población de mensajeros maduros que se diferencian en el largo de la región 3' no codificante. Por lo tanto, el tracto de pPY y el AG aceptor de las regiones intergénicas participan y regulan ambos procesos de maduración del ARNm. A pesar de ser procesos acoplados, esto no significa que no puedan producirse independientemente (Vasella, 1994). Estudios realizados con el gen que codifica para la proteína HSP70 en *T. brucei* describen la presencia de algunos transcriptos poliadenilados sin SL (Huang, 1991). El fenómeno opuesto también fue descrito para el gen de la α -tubulina, donde alrededor del 50% de los transcriptos que contienen SL no están poliadenilados (Vanhamme y col, 1995).

Una particularidad de *T. cruzi* y de los kinetoplastidos en general es la ausencia aparente de promotores para la ARN polimerasa II que dirijan la transcripción de los genes codificantes de proteínas. La transcripción en estos organismos sin embargo es hebra-específica y llevada a cabo por ARN polimerasas similares a las ARN polimerasas I, II y III de mamíferos (Donelson y col, 1999). Se han encontrado promotores para la ARN polimerasa I presentes en los genes que codifican para el ARNr.

Estos organismos tienen un genoma muy plástico. Se pueden observar polimorfismos en el tamaño de los cromosomas entre diferentes cepas así como entre clones originados a partir de la misma cepa. De esta manera, el tamaño del genoma puede variar enormemente dependiendo de la cepa estudiada. Utilizando la técnica de electroforesis en campos pulsados (PFGE) con condiciones de corrida estándar con varias cepas de *T. cruzi* se obtiene un patrón de aproximadamente 20 bandas cromosómicas que van desde las 450 kpb hasta los 3,5 Mpb (Cano y col, 1995). Las bandas cromosómicas separadas por PFGE y teñidas con bromuro de etidio presentan diferentes intensidades reflejando posiblemente la presencia de múltiples cromosomas en alguna de las bandas. Esto sugiere que el número total de cromosomas es considerablemente mayor a las 20 bandas cromosómicas observadas. Utilizando condiciones de corrida de PFGE optimizadas para resolver diferentes rangos de tamaño se pudo establecer que cada una de las 20 bandas cromosómicas estaban compuestas por más de un cromosoma. Actualmente, se estima que el número total de cromosomas en *T. cruzi* es de 80 (o 40 pares de cromosomas homólogos), considerando un genoma de 100 Mpb y un tamaño cromosómico promedio de 1,2 Mpb (Henriksson y col, 1996).

Clonado de genes de T. cruzi

La necesidad de implementar estrategias de vacunación, diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas, junto con el surgimiento de la metodología del ADN recombinante, impulsaron a varios grupos de investigación a clonar antígenos de *T. cruzi* (revisión en Frasch y col., 1991), secuencias de ADN repetitivas y específicas (González y col. 1985, Wincker y col., 1990; Moser y col., 1989; Avila y col., 1991; Requena y col., 1992) y enzimas características (Michels y Oppendoerfer, 1991; North y col., 1990; Campetella y col., 1992). Varios antígenos de *T. cruzi* han sido clonados a partir de bibliotecas de expresión genómica o de ADNc del parásito, por rastreo con sueros humanos o de animales infectados, o bien con anticuerpos policlonales o monoclonales. En diferentes laboratorios se clonaron porciones correspondientes a antígenos equivalentes. Varios de estos antígenos presentaron secuencias repetidas en *tandem*, conservados en distintas cepas y stocks parasitarios y por ende candidatos potenciales para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

Algunos de los antígenos mencionados fueron evaluados como reactivos de diagnóstico serológico en dos estudios multicéntricos, uno organizado por la OMS (WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases), en el cual se analizó un panel de 50 sueros (Moncayo y Luquetti, 1990), y otro organizado por el proyecto Iberoamericano de Biotecnología, en el cual se analizó un panel de 236 sueros (Levin y col., 1991). En ambos casos, los antígenos Ag1/JL7/H49, Ag2 y A13 (Ibañez y col., 1988; Paranhos y col., 1990) resultaron ser excelentes marcadores de infección chagásica crónica (índice Kappa > 0.80) (Levin y col., 1991).

Por rastreos inmunológicos en bibliotecas de expresión de *T. cruzi* en fagos λ gt11 se pudieron aislar en nuestro laboratorio varios antígenos de importancia en el diagnóstico. Entre los antígenos recombinantes aislados se encuentran dos tipos de antígenos de *T. cruzi*:

- a) antígenos capaces de reaccionar frente a sueros de pacientes con infección por *T. cruzi*, como JL7 y JL8 (Levin y col., 1989),
- b) antígenos que reaccionan predominantemente con sueros provenientes de pacientes con cardiopatía chagásica crónica, como JL5, JL52, JL9 (Levin y col., 1989) y RA1, un antígeno recombinante que codifica para la región C-terminal de una HSP70 de *T. cruzi* (Levin y col., 1990; Levy-Yeyati y col., 1991).

Antígeno JL7

El antígeno recombinante JL7 codifica para una secuencia repetitiva de 68 aminoácidos, similar a la presente en el antígeno 1 (Ibañez y col., 1988), el antígeno FRA (Lafaille y col., 1989) y el recombinante H49 (Cotrim y col., 1990). Se trata de un fragmento de una proteína flagelar de *T. cruzi* de aproximadamente 300 kD (Lafaille y col., 1989), asociada al citoesqueleto e involucrada en la unión del flagelo al cuerpo celular del parásito (Cotrim y col., 1990). Como se dijo, JL7 demostró ser un excelente reactivo diagnóstico (Levin y col., 1991; Kaplan, 1995).

Antígeno JL5

Este fago recombinante se obtuvo por rastreo con el suero de un paciente con cardiopatía chagásica (paciente JL). JL5 fue reconocido por la gran mayoría de sueros de pacientes chagásicos con cardiomiopatía, mientras que no reaccionó con sueros de pacientes chagásicos sin evidencias de compromiso cardíaco (Levin y col., 1989). Este antígeno corresponde a la porción C-terminal de una proteína ribosomal P2 β de *T. cruzi* (Levin y col., 1989; Levitus y col., 1991).

Antígeno JL52

Este recombinante codifica para la proteína ribosomal TcP0 (Schijman, 1992; Schijman y col., 1992), y es responsable de la producción de anticuerpos que

reaccionan en forma cruzada con receptores β -adrenérgicos, los cuales son capaces de actuar como agonistas de dichos receptores (ver más abajo, Ferrari y col., 1995; Kaplan y col., 1998)

Proteínas ribosomales P

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

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

Las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* presentan aspectos distintivos en la región C-terminal con respecto a las proteínas ribosomales P de otros eucariontes. Como se muestra en la Fig. VIII, P1 y P2 se desvían del consenso C-terminal, ya que la

típica serina es reemplazada por un ácido glutámico, mientras que la región C-terminal de P0 difiere completamente de este consenso y se parece a la proteína ribosomal L10 de *archaebacteria* (Levin y col., 1993b).

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

Figura VIII: Secuencias de correspondientes al C-terminal de proteínas ribosomales de *T. cruzi* y humanas.

A nivel antigénico, la región C-terminal conservada de la proteínas P humanas ha sido definida como uno de los autoepítopes en Lupus Eritrematoso Sistémico (LES) (Elkon y col., 1985), encontrándose que entre un 10 a un 18 % de los sueros de los pacientes lúpicos presentan autoanticuerpos anti-P. Estos sueros reconocen también a las proteínas P de diferentes especies eucariontes. El análisis de la reactividad anti-P mostró que el epítipo reconocido por los sueros lúpicos estaba restringido a los 11 aminoácidos C-terminales de las proteínas ribosomales P (Elkon y col., 1988).

Autoinmunidad en la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas ha sido estudiada por los inmunólogos como un modelo donde la infección por un microorganismo resulta en un posterior ataque del sistema inmune hacia el tejido cardíaco del hospedador (Petry y Eisen, 1989). Los hallazgos anatomopatológicos de las etapas aguda y crónica de la Enfermedad de Chagas han sugerido que la respuesta inmune del hospedador podría estar involucrada en la evolución de la enfermedad. El escaso número de parásitos y el tipo de células halladas en los infiltrados de las lesiones crónicas,

han llevado a proponer que la patología chagásica crónica se desencadenaría como consecuencia de un proceso autoinmune (Hudson, 1985).

Sin embargo, el origen de este fenómeno autoinmune ha sido tema de debate. Este proceso autoinmune podría ser el resultado de una pérdida de tolerancia hacia antígenos propios inducida por el parásito o de la existencia de una respuesta inmune cruzada contra componentes específicos de células cardíacas que comparten epítopes con antígenos de *T. cruzi* (mimetismo molecular). Por un lado, se ha propuesto que los parásitos causan un desequilibrio en la regulación del sistema inmune, promoviendo la expansión policlonal de linfocitos B, con la consiguiente hipergammaglobulinemia y la aparición de autoanticuerpos (Said y col., 1985; D'Imperio Lima y col., 1986; Hontebeyrie-Joskowicz y col., 1987; Minoprio y col., 1988). Sin embargo, estas observaciones se basan únicamente en estudios realizados en modelos experimentales murinos.

Otra corriente adjudica el origen autoinmune del Chagas crónico al mimetismo molecular (Damian, 1989), apoyado por evidencias de la existencia de determinantes antigénicos compartidos por el parásito y el hospedador (Sadigursky y col., 1982; Acosta y col., 1983; Van Voorhis y Eisen, 1989; Szarfman y col., 1982; Levin y col., 1989; Levitus y col., 1991; Kerner y col., 1991; Petry y Van Voorhis, 1991; Ferrari y col., 1995). La participación de este fenómeno como generador de una respuesta autoinmune fue estudiada en nuestro laboratorio a través de la caracterización de los autoanticuerpos anti-proteínas ribosomales P presentes en sueros de pacientes. Los trabajos demostraron que estos autoanticuerpos, capaces de reaccionar con las proteínas ribosomales P humanas, se originarían inicialmente como una respuesta dirigida contra las proteínas parasitarias (Levitus y col., 1991). El análisis molecular de los componentes de esta interacción llevó a la caracterización del sistema de proteínas P del parásito y al mapeo de los epítopes humanos y de *T. cruzi* involucrados.

Levitus y col. (1991) demostraron que la reactividad anti-TcP2 β de los sueros chagásicos crónicos está restringida a los últimos 13 aa de este polipéptido, (R13:

EEEDDDMGFGLFD) y que esta respuesta es específica para la infección chagásica ya que no se detectan anticuerpos anti-R13 en individuos con otras parasitosis. Este tridecapéptido tiene una homología de más del 95% con respecto al péptido correspondiente de las proteínas P humanas, denominado H13 (EESDDDMGFGLFD). Experimentos posteriores demostraron la naturaleza autoinmune de los anticuerpos humanos, ya que reaccionaban con la proteína ribosomal P humana de 17 kDa. Sin embargo, los niveles de autoanticuerpos contra las proteínas P humanas nunca fueron tan elevados como los medidos para los anticuerpos anti-R13 (Mesri y col., 1990; Levitus, 1991; Levitus y col., 1991). Aún más, las experiencias de cinética de asociación y disociación de los anticuerpos de pacientes demostraron que éstos se unen a las proteínas P humanas con muy baja afinidad (Kaplan y col., 1997). Sin embargo, se detectaron en pacientes con Chagas niveles elevados de actividad sérica anti-R13 que correlacionan con la existencia de inflamación miocárdica activa (Schejtman y col., 1990). En consecuencia, los anticuerpos anti-R13 podrían constituir un excelente marcador inmunológico de daño miocárdico con inflamación activa y que, de confirmarse, sería el primer marcador serológico de miocarditis chagásica (Levin y col., 1993a).

La caracterización del sistema de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* permitió definir otros blancos de reactividad cruzada. Efectivamente, la proteína P0 presenta en su extremo C-terminal un pentapéptido de residuos cargados negativamente (P0 β) homólogo al presente en el segundo bucle extracelular del receptor β -adrenérgico. A partir de esta homología, se demostró que i) la reactividad de los sueros chagásicos contra la proteína P0 del parásito era específicamente inhibida por un péptido de 22 aa correspondiente al segundo bucle extracelular del receptor, ii) los sueros chagásicos reconocían el pentapéptido P0- β por ELISA y iii) los anticuerpos inmunopurificados con el péptido de 22 aa correspondiente al segundo bucle extracelular del receptor producían un efecto cronotrópico positivo sobre cardiocitos aislados de rata, el

cual era inhibido por el pentapéptido P0- β (Ferrari y col., 1995). Ensayos de ELISA semejantes a los desarrollados para los anticuerpos anti β -adrenérgico permitió dosar la actividad contra receptores muscarínicos (M2) en sueros de pacientes chagásicos crónicos (Ferrari y col., 1995). Dada la fuerte reactividad es poco probable que un péptido derivado de C-P0 sea el único responsable del fenómeno de mimetismo molecular que origina esta reacción anti-receptor muscarínico. Por lo tanto se propuso una estrategia para identificar por técnicas de clonado molecular el o los antígenos de *T. cruzi* responsables de originar los autoanticuerpos anti-M2. En el Laboratorio del Dr. M. Levin se han construido varias bibliotecas de ADNc de expresión en el vector λ gt11 (Levin y col., 1989; Levy-Yeyati y col., 1991), que fueron rastreadas con sueros de pacientes chagásicos y no chagásicos con altos niveles de anticuerpos anti M2. Como producto de los mismos se encontraron antígenos previamente caracterizados tales como las proteínas ribosomales P (Levin y col., 1989) y la HSP 70 (Levy-Yeyati y col., 1991).

Los anticuerpos de pacientes crónicos, inmunopurificados con el péptido R-13, también alteraron la frecuencia de latidos de cardiocitos en cultivo (Kaplan y col., 1997). Estos resultados indican que la infección por *T. cruzi* podría inducir una respuesta autoinmune funcional contra receptores cardíacos, la cual podría originar al menos parte de las alteraciones eléctricas y fisiológicas de la función cardíaca. Esto concuerda con los trabajos de los Dres. Borda que muestran la capacidad de los sueros de pacientes chagásicos de interferir funcionalmente con los receptores cardíacos acoplados a proteína G (Borda y col., 1984; Sterin-Borda y col., 1988; Goin y col., 1994). Otros resultados que avalan esta hipótesis provienen de experiencias de inmunización en ratones, donde la inoculación con la proteína recombinante TcP2 β del parásito provocó alteraciones en el electrocardiograma de los animales inmunizados, junto con la producción de anticuerpos anti-TcP2 β (López-Bergami y col., 1997). Sin embargo, este método

de inmunización probablemente no refleje la presentación de los antígenos tal como ocurre en la infección: Los epítopes relevantes podrían encontrarse en las proteínas recombinantes en una conformación diferente a la de la proteína nativa y el empleo de adyuvantes podría inducir una respuesta inmune distinta a la respuesta adquirida naturalmente. Una expresión más natural de los epítopes puede lograrse por la inyección intramuscular de plásmidos con genes parasitarios bajo el control de promotores virales o de mamíferos. La utilización de plásmidos como generadores "*in vivo*" de antígenos es una técnica que ya se experimenta para vacunas contra malaria, hepatitis B, SIDA, tuberculosis, entre otras (Ulmer y col, 1996; Simmonds y col, 1997). Las ventajas de este tipo de inmunización incluyen, fundamentalmente, la presentación correcta de los epítopes por las células del huésped, la simplicidad de la inoculación y los bajos costos y rapidez de la tecnología empleada.

Inmunización con ADN:

Las bases históricas de la inmunización con ADN se apoyan en la observación de transferencia directa de genes *in vitro* e *in vivo* de ADN recombinante por una variedad de técnicas que resultan en la expresión de la proteína.

En las primeras experiencias de inmunización *in vivo* realizadas con ADN "desnudo", se demostró que la inoculación intramuscular directa de un plásmido codificando varios genes reporteros podía inducir una expresión sostenida del gen de interés en las células musculares (Wolf y col. 1990). Estas observaciones fueron luego ampliadas en estudios realizados por Tang y col. (1992), quienes demostraron que la inyección de ADN plasmídico codificando para la hormona de crecimiento humana podía estimular una respuesta inmune humoral específica.

Con esta metodología de inmunización se lograron niveles significativos de protección en modelos experimentales de enfermedades infecciosas, autoinmunes

y cáncer. Un ejemplo es la vacuna contra el virus de la influenza, que confirió más del 90% de protección en ratones y gallinas inmunizadas. Luego de una única inoculación en los cuádriceps, los animales permanecieron protegidos por seis meses y la respuesta inmune (anticuerpos neutralizantes y linfocitos T citotóxicos protectores) perduró por lo menos por un año (Ulmer y col., 1993). También se están desarrollando vacunas contra otras infecciones virales (hepatitis B, hepatitis C, rabia y SIDA), bacterianas (tétanos y tuberculosis) y parasitarias (leishmaniasis, esquistosomiasis, toxoplasmosis y malaria). Se puede encontrar una lista de modelos experimentales, patógenos y antígenos estudiados en la página "DNA vaccine.com" (<http://www.dnavaccine.com>). Cabe destacar que la inmunización intramuscular con ADN para el uso de vacunas en humanos ya ha sido patentada y que además se están ensayando en humanos vacunas de ADN contra malaria, HIV y melanoma (DNA vaccine.com).

El análisis de la respuesta inmune de los animales e individuos inmunizados reveló que la inyección intramuscular de ADN induce tanto anticuerpos como linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos para el antígeno de interés. Aunque no se conoce en detalle el mecanismo por el cual los epítopes son presentados al sistema inmune, algunas evidencias sugieren que el polipéptido de interés es secretado o liberado por la célula muscular para ser luego capturado y procesado por las células presentadoras de antígeno. Esta presentación estimularía a las células T CD4⁺ y CD8⁺, contribuyendo al establecimiento del proceso inflamatorio y a la inducción de linfocitos B para la secreción de anticuerpos (Ulmer y col., 1996) (ver más adelante).

Este tipo de estrategia podría proveer varias ventajas importantes sobre la inmunización con proteínas (a) Las vacunas de ADN se asemejan a las vacunas basadas en virus atenuados debido a su habilidad de inducir una respuesta celular de células T restringidas al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I. Por el contrario, la inmunización con proteínas provoca una

respuesta inmune principalmente humoral, la cual no siempre es relevante en términos de protección. *(b)* Las vacunas de ADN son seguras, pueden ser manufacturadas con un menor costo y almacenadas con relativa facilidad.

En cuanto a los vectores (plásmidos) utilizados, el gen de interés es clonado en un plásmido de expresión para células de mamífero. Este plásmido debe incluir:

- (a)* un origen de replicación bacteriano (ColEI)
- (b)* un marcador de selección procariota (resistencia a antibiótico)
- (c)* un promotor fuerte para una óptima expresión en células de mamíferos (son utilizados promotores virales tales como el de citomegalovirus (CMV) o el de virus SV40)
- (d)* señales de poli-adenilación tales como el del gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH) o del virus SV40.

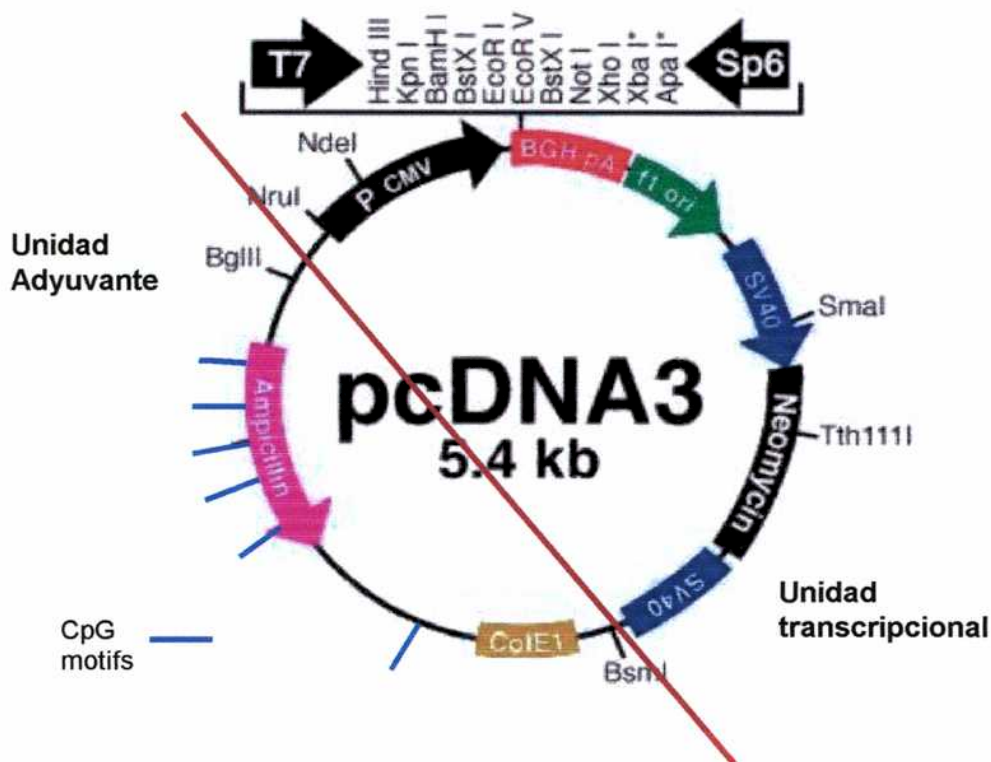


Figura IX: Esquema del plásmido utilizado para inmunizaciones con ADN

Uno de los plásmidos más empleados es el pcDNA3 (Invitrogen). (Fig. IX)

Hoy se sabe además, que el esqueleto de ADN del plásmido presenta propiedades inmunomoduladores *per se*. En efecto, Yamamoto y col. (1992) observaron que ciertos oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODNs) diseñados a partir de secuencias bacterianas podían activar células natural killer para secretar interferón (IFN)- γ (Yamamoto y col., 1992). Luego se demostró que un motivo específico presente exclusivamente en el ADN bacteriano estimulaba respuestas inmunes innatas caracterizadas por la producción de IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ e IFN- α (Klinman y col., 1996; Halpern y col., 1996; Sato y col., 1996). Estos motivos consisten en un dinucleótido de citidina-fosfato-guanosina (CpG) no metilados con regiones flanqueantes apropiadas. Tales motivos son 20 veces más comunes en microbios que en el ADN de mamíferos, debido a diferencias en la frecuencia de uso y de los patrones de metilación de los dinucleótidos CpG en procariotas vs eucariotas (Cardon y col., 1994; Razin y col., 1981). Los motivos CpG inducen directamente la proliferación de las células B con la consecuente secreción de anticuerpos (Krieg y col., 1995) y la producción de citoquinas por parte de las células presentadoras de antígenos (Klinman y col., 1996; Stacey y col., 1996; Jakob y col., 1998). A través de esta activación, se activan también las células Natural Killer (NK) (Cowdery y col., 1996). Finalmente, las células T son también estimuladas directa o indirectamente por los motivos CpG, dependiendo de su estado de activación basal (Bendigs y col., 1999).

Un aspecto intrigante de la inmunización con ADN es el mecanismo por el cual el antígeno de interés es procesado y presentado por el sistema inmune. Se demostró que la cantidad de antígeno producido *in vivo* después de la inoculación está en el rango de picogramos a nanogramos. Dado las cantidades relativamente pequeñas de proteínas sintetizadas por la inmunización de ADN, la explicación más probable para la inducción eficiente de una respuesta inmune sostenida y amplia son las propiedades de estimulación de la respuesta del ADN en sí mismo (es decir, los motivos CpG) y/o el tipo de APC transfectada. Hay al

menos tres mecanismos por los cuales el antígeno codificado por el ADN plasmídico es procesado y presentado para estimular una respuesta inmune: (a) el “priming” directo de células somáticas (miocitos, queratinocitos, o algunas células MHC clase II negativas); (b) transfección directa de APCs profesionales (por ejemplo células dendríticas [DCs]); y (c) estimulación cruzada o “cross-priming” en el cual el ADN plasmídico transfecta a células somáticas y/o APC profesionales y la proteína secretada es incorporada por otras APCs profesionales y presentadas a células T.

(a) **“Priming” directo de células somáticas:** Wolf y col. (1990) demostró *in vivo* que la inmunización con un plásmido o ADN “desnudo” lleva a la expresión de proteínas en las células transfectadas. Por otro lado, otros estudios como el de Ulmer y col. (1993), mostraron que la inoculación intramuscular directa de plásmidos inducía una fuerte respuesta de CTL CD8⁺ contra la influenza, proveyendo la primera evidencia de que la respuesta celular podía ser inducida *in vivo* y tener un importante rol protector. Estos y otros estudios sugirieron que las células musculares estaban críticamente involucradas en la iniciación de la respuesta inmune luego de la inmunización con ADN. Una dificultad conceptual con esto es que si bien las células musculares expresan moléculas de MHC clase I, no expresan otras moléculas de superficie (por ejemplo CD80 y CD86) que son críticas para una óptima estimulación de las células T. Éstas probablemente no sean tan eficientes en la presentación antigénica como lo son las DCs. Para corroborar si la expresión del antígeno por parte de las células musculares era suficiente como para inducir una inmunidad protectora *in vivo*, se transfirieron a ratones mioblastos transfectados expresando una proteína de la nucleocápside del virus influenza, los cuales fueron protegidos en desafíos con el virus infeccioso (Ulmer y col., 1996). Si bien estos datos sugieren que la expresión de proteínas virales por parte de las células musculares *in vivo* es suficiente para una protección mediada por CTL, queda abierta la pregunta si los CTLs eran

inducidos directamente por los miocitos o por la transferencia de la proteína desde los miocitos a APCs profesionales ("cross priming"). Por otra parte, la extracción de las células musculares transfectadas inmediatamente (dentro de los 10 minutos) luego de la inmunización no alteró la subsiguiente respuesta inmune (Torres y col., 1997), proporcionando evidencia adicional de que el ADN plasmídico inyectado probablemente haya ganado el acceso al sistema linfático o circulatorio obviando así la necesidad de transfección de células musculares en el sitio de la inyección. Para otras células somáticas como queratinocitos y células de Langerhans se observó que constituyen el mayor tipo de células transfectadas después de la inyección en la piel (Yang y col., 1990; Raz y col., 1994). En contraste con lo recién mencionado, la remoción de la piel inmediatamente luego de la inmunización previene el desarrollo de la respuesta inmune (Torres y col., 1997). Más aún, en un estudio separado, se mostró que el trasplante de piel inmunizada menos de 12 horas postinmunización podía desencadenar una respuesta inmune en estos animales (Klinman y col., 1998). Por el contrario, una respuesta inmune pequeña o nula podía ser iniciada cuando el período para el trasplante excedía las 24 horas. Estos datos sugieren que las células que migraron desde la epidermis en 24 horas de inmunización indujeron la respuesta primaria después de la inmunización con ADN. Finalmente, se mostró que la magnitud de la respuesta primaria se incrementó cuando el sitio de inmunización fue dejado intacto (Klinman y col., 1998). Todo esto sugiere que las células no migratorias tales como queratinocitos pueden continuar produciendo antígeno para aumentar la respuesta inmune (Klinman y col., 1998; Akbari y col., 1999).

- (b) **Transfección directa de APCs profesionales:** Varios estudios con ratones quimeras para médula ósea demostraron que las APCs derivadas de médula ósea juegan un rol clave en la inducción de la respuesta inmune luego de la

inmunización con ADN. En estos estudios los ratones con la médula ósea reconstituida crean una incompatibilidad entre el haplotipo de las células somáticas y las células derivadas de la médula ósea. La respuesta inmune generada luego de la inmunización con ADN estuvo restringida al haplotipo de la médula ósea reconstituida, evidenciando concluyentemente que las células derivadas de la médula ósea fueron las responsables de despertar la respuesta inmune después de la inmunización con ADN (Corr y col., 1996; Iwasaki y col., 1997; Doe y col., 1996). Otros estudios para definir el tipo específico de APCs que regularían la respuesta inmune mostraron que las DCs aisladas pero no las células B ni los queratinocitos de ratones inmunizados con ADN fueron capaces de presentar eficientemente el antígeno a células T *in vitro* (Casares y col., 1997). Más aún, en este mismo estudio se estimó que sólo una pequeña proporción de DCs (0,4%) fueron transfectadas con el ADN plasmídico (Casares y col., 1997). Resultados similares fueron obtenidos en dos estudios adicionales en los cuales la inyección de ADN condujo a la transfección directa de un número reducido de DCs (Porgador y col., 1998; Akbari y col., 1999). Por otra parte, se pudieron visualizar *in vivo* DCs expresando el antígeno de interés en nódulos linfáticos luego de la inmunización por bombardeo con partículas de oro recubiertas con ADN (Condon y col., 1996). Todo esto sugiere que las DCs juegan un rol clave en la inducción de la respuesta inmune y que la contribución predominante para inducir esa respuesta involucra a un número pequeño de estas células directamente transfectadas.

- (c) **Estimulación cruzada o "Cross-priming"**: Las proteínas secretadas o exógenas deben sufrir una endocitosis o fagocitosis para entrar a la vía de procesamiento antigénico del MHC clase II para estimular células T CD4⁺. Las proteínas o péptidos producidos en forma endógena (por ejemplo los antígenos virales) son presentados al sistema inmune a través de la vía

dependiente del MHC clase I para estimular células T CD8⁺. Si bien los péptidos derivados de fuentes exógenas son generalmente excluidos de la presentación sobre moléculas de MHC clase I, ahora hay varios ejemplos mostrando que esto puede ocurrir *in vivo* (Wraith y col., 1987; Staerz y col., 1987; Harding y Song, 1994; Falo y col., 1995; Udoni y Srivastava, 1993). Por otra parte, el *cross-priming*, en el cual se gatilla la respuesta de células T CD8⁺, puede ocurrir sin síntesis del antígeno *de novo* en las APCs, proveyendo un mecanismo adicional por el cual la inmunización con ADN puede aumentar la respuesta inmune. Durante el *cross-priming*, el antígeno o los péptidos (ambos MHC clase I y II) generados por células somáticas (miocitos o queratinocitos) pueden ser tomados por las APCs para estimular respuestas de células T (Fu y col., 1997). Es decir que la estimulación cruzada puede ocurrir cuando las APCs profesionales procesan péptidos secretados o proteínas de células somáticas y/o de otras APCs por fagocitosis de cuerpos apoptóticos o necróticos (Albert y col., 1998 a y b). Esto es apoyado por experiencias que mostraron que el *cross-priming* de DCs ocurría cuando los queratinocitos que expresaban el antígeno eran expuestos a irradiación *in vitro*, llevando a la muerte de la célula (Akbari y col., 1999). En resumen, hay evidencias contundentes que sugieren que las APCs derivadas de la médula ósea, pero no las células somáticas, directamente inducen la respuesta inmune después de la inmunización con ADN. Sin embargo, ya que las células somáticas tales como miocitos o queratinocitos constituyen las células transfectadas luego de la inoculación con ADN vía inyección muscular o cutánea, respectivamente, éstas deben servir como un reservorio de antígeno. Así, las células somáticas pueden ser importantes en la inducción de la respuesta inmune vía *cross-priming* y pueden jugar un rol en el aumento y/o mantenimiento de la respuesta.

Inmunidad celular

Existen al menos tres funciones principales que las células T CD4⁺ pueden mediar. Primero, las células T CD4⁺ activadas tienen un rol crítico en la promoción de las células B para su supervivencia y producción de anticuerpos a través de las interacciones CD40L-CD40 (Banchereau y col., 1994). Segundo, las células T CD4⁺, a través de la producción de IL-2 y/o la coestimulación CD40L-CD40, proveen la función de ayuda a las células T CD8⁺ (Ridge y col., 1998; Bennett y col., 1998; Schoenberger y col., 1998). Finalmente, las células T CD4⁺ secretan un gran número de citoquinas que tienen efectos inmunorregulatorios aun no comprendidos en su totalidad en muchas situaciones de enfermedad.

Se ha demostrado que las células T CD4⁺ activadas pueden ser separadas en dos subconjuntos distintos debido a la producción de ciertas citoquinas (Seder y Paul, 1994). Por ejemplo, las células T-helper-1 (Th1) producen IFN- γ , mientras que los linfocitos T CD4⁺ que producen IL-4, IL-5, e IL-13 son designados como células T-helper-2 (Th2). Aunque se demostró que varios factores influyen en la diferenciación de las células a tipo Th1 y Th2, el entorno de citoquinas presentes en el momento inicial parece ser el más importante (Seder y Paul, 1994; O'Garra, 1998). Así, la presencia de IL-12 facilita la diferenciación hacia un fenotipo de Th1, por cuanto la presencia de IL-4 permite la diferenciación de Th2. Dado que los motivos de CpG presentes en el ADN bacteriano pueden activar el sistema inmunológico para inducir una variedad de citoquinas proinflamatorias que incluye IL-12, la generación de respuestas de Th1 puede ser una propiedad general de las vacunas de ADN. De hecho, la inmunización con ADN se ha aplicado con éxito en varios modelos animales de infección en la cual la inducción de una respuesta de Th1 correlaciona con la protección (por ejemplo la tuberculosis y leishmaniasis). Una evidencia adicional de que la inmunización con ADN favorece una respuesta de Th1 proviene de la observación del predominio del isotipo IgG2a en la respuesta (Roman y col., 1997). Sin embargo,

bajo ciertas circunstancias, las inmunizaciones con ADN pueden también inducir las respuestas de Th2. Quizás el mejor ejemplo de esto proviene del uso del método de inmunización con pistola génica o "gen gun". Pertmer y col. (1996) primero demostraron que la producción de IL-4 se incrementaba en ratones repetidamente inmunizados con la pistola génica, mientras que la producción de IFN- γ concomitantemente disminuía. Se demostró que el isotipo predominante de Ig generados después de la inmunización era IgG1, considerando que el isotipo de Ig predominante generado después de la inmunización intramuscular era IgG2a (Pertmer y col., 1996). Estas observaciones fueron ampliadas en el trabajo de Feltquate y col. (1997), a través de la comparación del perfil de citoquinas generado por la pistola génica versus la inmunización intramuscular. La respuesta de Th2 preferencialmente ocurría si el disparo con las partículas de oro recubierta con los plásmidos de ADN se realizaba en la piel o en el músculo expuesto quirúrgicamente. Todos estos datos sugieren que el uso de la pistola génica tiene una poderosa influencia en la inducción de una respuesta Th2 sin tener en cuenta la ruta de inmunización. Una posible explicación de por qué la respuesta del tipo Th2 es inducida por la pistola génica es que el arma entrega el plásmido directamente dentro de las células, así desvían la interacción de los motivos de CpG, presentes en el esqueleto del plásmido, con las APCs que median la descarga de citoquinas proinflamatorias para el tipo Th1. Es más, dado que la inmunización con ADN hace también blanco en las DCs, es posible que los diferentes métodos de inmunización lleguen a los distintos subconjuntos de DCs que hacen la preferencia por una u otra respuesta de linfocitos T "helper" (Suss y Shortman, 1996; Pulendran y col., 1999; Smith y de St Groth, 1999; Rissoan y col., 1999; Maldonado-Lopez y col., 1999).

Respuesta Humoral:

La inmunización con plásmidos de ADN induce una fuerte respuesta de anticuerpos, la cual también puede ser protectora en diferentes modelos de infección. Si bien la dosis y la frecuencia de las inmunizaciones pueden afectar la cinética y la magnitud de la respuesta, el número de inyecciones con una dosis óptima de ADN no afecta significativamente la cantidad de anticuerpos producidos una vez alcanzado el plateau (Deck y col., 1997; Robinson y col., 1997). Finalmente, aunque la duración de la respuesta puede ser duradera, esta duración es muy variable y depende del modelo y la vacuna utilizada.

Comparando las respuestas humorales en ratones inmunizados con ADN codificando la hemaglutinina H1 con las de ratones inmunizados con una dosis subletal de virus de influenza H1N1, la cantidad de anticuerpos producida era sustancialmente mayor y más rápida en los ratones infectados con dosis subletal que los inmunizados con ADN (Boyle y col., 1996). En otras experiencias, comparando la respuesta de anticuerpo inducida por la inmunización con ADN y con proteína, se observó que los títulos de anticuerpos y avidéz eran significativamente más bajos en ratones inmunizados con ADN que codificaba una proteína de superficie de *Plasmodium* que en aquellos vacunados con la proteína sola (Kang y col., 1998). Por el contrario, en un estudio que comparaba directamente la cinética de las respuestas de anticuerpos después de la inmunización con ADN codificando ovo albúmina (OVA) y la proteína OVA, no pareció verse diferencias en el total de la producción de anticuerpos específicos contra OVA cuando el ADN se administró en forma intradérmica a las 2 ó 4 semanas post-inmunización (Boyle y col., 1997). En este estudio, los anticuerpos inducidos por ADN tenían una avidéz mayor que los inducidos por la proteína.

Los isotipos de anticuerpos inducidos por la inmunización con ADN incluyen IgG, IgM e IgA. Finalmente, la habilidad de la inmunización de ADN para generar anticuerpos neutralizantes sugiere que ese antígeno expresado *in vivo*

puede asumir una configuración nativa. Así, las vacunas de ADN pueden generar respuestas de anticuerpos que se parecen más a aquellas vistas después de la infección natural y proporcionar una ventaja potencial por encima de las vacunas de proteínas recombinantes.

Modos de administración

Una variedad de rutas de inyección del ADN, incluyendo intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal (Fynan y col., 1993), envío epidérmico por escarificación (Fynan y col., 1993), oral (Jones y col., 1997; Chen y col., 1998; Herrmann y col., 1999; Roy y col., 1999), intranasal (Fynan y col., 1993, Klavinskis y col., 1997; Ban y col., 1997; Kuklin y col., 1997; Sasaki y col., 1998 a, b y c), vaginal (Wang y col., 1997; Livingston y col., 1998), y más recientemente, vacunación no invasiva en la piel (Shi y col., 1999) han sido estudiadas. La ruta de inmunización más común es la intramuscular, y en menor medida, la subcutánea o intradérmica. El ADN es administrado en una variedad de diluyentes incluyendo agua destilada, solución salina y sacarosa. Para la inyección intramuscular, a pesar de que algunos investigadores han usado agentes tales como cardiotoxina, bupivacaína, o soluciones hipertónicas para pretratar el tejido muscular (Davis y Jasmin, 1993; Davis y col., 1994), estudios adicionales sugieren pocos beneficios. Mientras que las dosis óptimas dependen del antígeno particular y el sistema del modelo usado, entre 10 a 100 µg de plásmido son requeridos para inducir una respuesta cuando el ADN es administrado intramuscular o subcutáneamente en ratones. Por el contrario, la inmunización de ADN con pistola génica requiere de 0,1-1 µg de ADN plasmídico para inducir una respuesta de anticuerpos o de CTL (Gurunathan y col., 2000).

Hipótesis

γ

Objetivos

Hipótesis de trabajo

Se ha postulado la hipótesis de un origen autoinmune para explicar la etiología de la enfermedad de Chagas crónica (Petry y Eisen, 1989). Este proceso autoinmune podría ser el resultado de una respuesta inmune cruzada contra componentes específicos de células cardíacas que comparten epítopes con antígenos de *T. cruzi* (mimetismo molecular). La participación del fenómeno de mimetismo molecular como generador de una respuesta autoinmune fue estudiada en nuestro laboratorio a través de la caracterización de los autoanticuerpos anti-proteínas ribosomales P presentes en sueros de pacientes con Chagas. Estos estudios demostraron que estos autoanticuerpos, capaces de reaccionar con las proteínas ribosomales P humanas, se originarían inicialmente como una respuesta dirigida contra las proteínas parasitarias (Levitus, 1991). La caracterización del sistema de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* permitió definir otros blancos de reactividad cruzada. Efectivamente, la proteína P0 del parásito (TcP0) presenta en su extremo C-terminal un pentapéptido de residuos cargados negativamente (P0 β) similar al presente en el segundo bucle extracelular del receptor β -adrenérgico. A partir de esta homología, se demostró que i) la reactividad de los sueros de pacientes contra la proteína P0 del parásito era inhibida por un péptido de 22 aa correspondiente al segundo bucle extracelular del receptor, ii) los sueros de pacientes con Chagas reconocían el pentapéptido P0 β por ELISA y iii) los anticuerpos inmunopurificados con el péptido de 22 aa mencionado producían un efecto cronotrópico positivo sobre cardiocitos aislados de rata, el cual era inhibido por el pentapéptido P0 β (Ferrari y col., 1995). Los anticuerpos de pacientes crónicos, inmunopurificados con el péptido correspondiente a los 13 aa C-terminales de la proteína ribosomal P2 β de *T. cruzi* (TcP2 β), también alteraron la frecuencia de latidos de cardiocitos en cultivo (Kaplan y col., 1997). Por otra parte, se han detectado en sueros de pacientes con Chagas crónicos la presencia de anticuerpos que reaccionan contra receptores muscarínicos (M₂). Ensayos de ELISA semejantes a los desarrollados para los

anticuerpos anti-receptor β -adrenérgico, permitieron dosar esta actividad (Ferrari y col., 1995).

Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la infección por *T. cruzi* podría inducir una respuesta autoinmune funcional contra receptores cardíacos. Otros resultados que avalan esta hipótesis provienen de experiencias de inmunización en ratones. En este sistema, la inoculación con la proteína recombinante TcP2 β del parásito provocó alteraciones en el electrocardiograma de los animales inmunizados, junto con la producción de anticuerpos anti-TcP2 β (López Bergami y col., 1997). Sin embargo, este método de inmunización probablemente no refleje la presentación de los antígenos tal como ocurre en la infección natural: los epítopes relevantes podrían encontrarse en las proteínas recombinantes en una conformación diferente a la de la proteína nativa y el empleo de adyuvantes podría inducir una respuesta inmune distinta a la respuesta adquirida naturalmente.

Una metodología que podría reflejar mejor la situación de la infección crónica y que resultaría, por lo tanto, más adecuada para estudiar la patogénesis de la enfermedad, es la presentación constante de los antígenos parasitarios por las células musculares del huésped. Esta expresión puede lograrse por la inyección intramuscular de plásmidos que contengan los genes parasitarios bajo el control de promotores virales.

Los primeros epítopes parasitarios que inducen anticuerpos con propiedades auto-reactivas funcionales han sido caracterizados, y se encuentran en las regiones C-terminales, ricas en glutámico y aspártico, de las proteínas ribosomales TcP0, y TcP2 β de *T. cruzi* (Ferrari y col., 1995; Kaplan y col., 1997; Elíes y col., 1996). Sin embargo la variedad y el polimorfismo de la respuesta anti-receptores cardíacos en pacientes chagásicos son tales (Elíes y col., 1996), que resulta difícil explicarlas como producto de la acción de anticuerpos dirigidos solo contra dos proteínas, por más antigénicas que sean. Ésto nos llevó a postular la existencia de otros antígenos parasitarios ricos en residuos ácidos. Inicialmente

propusimos que éstos deberían tener trechos de hasta 20 o más de residuos de ácido glutámico y/o aspártico seguidos. En mi trabajo de tesis de licenciatura se rastrearon diferentes bibliotecas de expresión con sueros de pacientes chagásicos, pero no pudimos detectar ningún otro antígeno con estas características (Ghio, 1996)

Ante este fracaso, decidimos recurrir a los datos generados por el Proyecto Genoma *Trypanosoma cruzi* buscando secuencias de EST que pudieran codificar para un péptido con las características mencionadas.

Objetivos

A partir de lo expuesto se propuso:

- 1) Obtener uno o más ESTs con regiones ricas en residuos de ácido glutámico y/o aspártico y caracterizarlo genética e inmunológicamente.

En particular se propuso:

- ♦ Obtener el gen completo.
- ♦ Caracterizar genéticamente el gen.
- ♦ Expresar el gen de *T. cruzi* como proteína de fusión en *E. coli* para analizar su inmunogenicidad.
- ♦ Emplear esta proteína recombinante en ensayos de ELISA y Western blot con sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas.
- ♦ Mapear los epítopes reconocidos por estos sueros.
- ♦ Estudiar la capacidad de estos anticuerpos de reaccionar en forma cruzada con receptores cardíacos u otras proteínas propias y de alterar la frecuencia de latidos de cardiocitos en cultivo.

- 2) Utilizar la metodología de inmunización con ADN para estudiar el papel de los anticuerpos dirigidos contra epítopes ricos en aminoácidos ácidos en la inmunopatogénesis de la enfermedad. Este objetivo comprende los siguientes objetivos específicos:
- ◆ Inmunizar ratones con construcciones de ADN capaces de expresar el gen que contiene al EST obtenido, y con las proteínas ribosomales P2 β y P0 de *T. cruzi* para poner a punto la metodología.
 - ◆ Caracterizar la respuesta humoral inducida y compararla con la producida por inmunización con las proteínas recombinantes correspondientes.
 - ◆ Estudiar el rol fisiológico de los autoanticuerpos caracterizados.
- 3) Buscar interacciones entre el gen obtenido y otras proteínas.
- ◆ Poner a punto el sistema de doble híbrido utilizando las proteínas ribosomales P.

Materiales

γ

Métodos

SOLUCIONES Y MEDIOS UTILIZADOS

Medio LB: bactotripton 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1 %.

Medio LB-amp: LB + 100 µg/ml ampicilina.

Medio LB-kan: LB + 30 µg/ml kanamicina.

Medio LB-agar: LB + bactoagar 1,5 %.

Medio LB-top agarosa: LB + agarosa 0,7 %.

Medio 2xYT: bactotripton 1,6 %, extracto de levadura 1 %, NaCl 0,5 %.

Medio SOB: (1 litro) bactotripton 2 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %, KCl 100 mM 25 ml. Autoclavar y agregar MgCl₂ 1M 10ml y MgSO₄ 1M 10ml.

Medio SOC: Medio SOB + glucosa 2 %.

Medio LIT: (1 litro) Infusión de hígado 0,5 %, triptosa 0,5 %, NaCl 68 mM, KCl 5,3 mM, HPO₄Na₂ 22 mM, glucosa 2 %, hemina 0,1 % v/v, penicilina-estreptomicina 100x 10 ml, suero fetal bovino inactivado 10 %.

Medio YPD: bactopectona 2 %, extracto de levadura 1 %, dextrosa 2 %.

Medio YPD-agar: YPD + bactoagar 2 %.

Medio Yc: YNB (yeast nitrogen base) sin aminoácidos 6,7 gr., NaOH 1 M 1 ml, Ac succínico 20gr., glucosa 20 % 200 ml, llevar hasta 1,8 litro con agua deionizada y autoclavar.

Medio Yc-agar: Yc + bactoragar 2 %.

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

TBS-leche: leche descremada 3 % en TBS 1x.

TBS-TW: Tween 20 0,05% en TBS 1x.

PBS (10x): NaCl 8 %, KCl 0,2 %, Na₂HPO₄ 1,4 %, KH₂PO₄ 0,24 % a pH: 7,4.

PBS-TW: Tween 20 0,1% en PBS 1x.

PBS-leche 5%: leche descremada 5 % en PBS 1x.

SM: Tris-HCl (pH: 7,5) 50 mM, NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, gelatina 0,02%.

TE: Tris-HCl (pH: 8) 10 mM, EDTA 1 mM.

Buffer para siembra 6x: (Ácidos nucleicos) TAE 6x, glicerina 60 %, azul de bromofenol 0,25 %, xylencianol 0,25 %.

TBE 10x: Tris base 10,8 %, ácido bórico 5,5 %, EDTA 20 mM (pH: 8).

TAE 50x: Tris base 24,2 %, ácido acético glacial 5,71 %, EDTA 50 mM (pH: 8).

Buffer de siembra 2x: (Proteínas) en TBS 1x, azul de bromofenol 0,2 %, SDS 4 %, β -mercaptoetanol 10 %, glicerol 20 %.

Buffer de corrida de proteínas 1x: Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %.

Buffer de electrotransferencia de proteínas 1x: Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %.

SSC 20x: Citrato de sodio 8,82 % pH: 7 (ajustar con HCl).

Solución fisiológica: NaCl 0,9 %.

TMB: 30 mg/ml en buffer citrato 0,1 M, DMSO 7,2 %, glicerol 1,8 %.

TNE: NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris-Cl (pH: 8) 10 mM.

TNE SAC: NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris-Cl (pH: 8) 10 mM, sacarosa 50 %.

TNE-T: TNE, Tritón -X100 1 %.

TFB I: Acetato de potasio 5 M 1,5 ml, $MnCl_2$ 1 M 12,5 ml, KCl 2 M 12,5 ml, $CaCl_2$ 1 M 2,5 ml, glicerol 15 % llevar a pH: 5,8 con ácido acético 0,2 M y a un volumen final de 250 ml. Esterilizar por filtrado.

TFB II: MOPS (pH: 7) 2 M 12,5 ml, $CaCl_2$ 1 M 18,8 ml, KCl 2 M 1,25 ml, glicerol 15 % llevar a pH: 6,5 con ácido acético 0,2 M y a un volumen final de 250 ml. Esterilizar por filtrado.

Solución LiAcTE: LiOAc 0,1 %, Tris-HCl (pH: 8) 10 mM, EDTA 1 mM.

Solución LiAcTE - PEG: Sol LiAcTE + polietilenglicol 3350 40 % p/v.

Buffer Z: Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, $MgSO_4$ 1 mM, KCl 10 mM, X-gal 0,07 %

Solución DB 0,5 para bloques con parásitos: EDTA (pH: 8) 0,5 M, N-laurilsarcosina 1 % y Proteinasa K 0,5 mg/ml

PSG: buffer fosfato de sodio (pH: 8) 0,5 M 150 ml, NaCl 4 M 162,5 ml, glucosa 10%, llevar a 1 litro con agua deionizada.

Rojo Ponceau S: rojo Ponceau S 0,5 %, metanol 40%, ácido acético 10%.

Reactivo de Bradford: Coomassie Brilliant Blue 250 G disuelto en etanol 95 %, H_3PO_4 10 %, y llevar a 1 litro con agua deionizada.

Penicilina-estreptomicina (GIBCO) 10000 U/ml y 10000 µg/ml respectivamente

PLÁSMIDOS

pMAL-c2: $lacI P_{lac}$, $malE\Delta 2-26$ -fx- $lacZ\alpha$, Amp^r (New England Biolabs)

pGEX- 4T1: $lacI P_{lac}$, GST, Amp^r (Pharmacia)

pGEX- 2TK: $lacI P_{lac}$, GST, Amp^r , sitio de reconocimiento de PKA (Pharmacia)

pQE-30: $lacI P_{T5}$, RBSII, ColE1, 6xHis tag, Amp^r (QIAGEN)

pGEM-T easy: $lacZ$, pGEM-5Zf(+) 3'T, Amp^r (Promega)

pGEM-3Zf(+): $lacZ$, Amp^r (Promega)

pGEM-5Zf(+): $lacZ$, Amp^r (Promega)

pcDNA3 Amp^r , ColE1, Neo^r (Invitrogen)

pBTM116: P-ADH1, LexA, ColE1, T-DH1, TRP1, 2µ, Amp^r

pVP16: P-ADH1, NLS-VP16, ColE1, T-DH1, LEU2, 2µ, Amp^r

BACTERIAS

Cepas bacterianas.

- *E. coli* DH5α: $F'/endA1$, $hsdR17$, $supE44$, $thi-1$ $recA1$, $gyrA$ $relA1$ $\Delta lacIZYA-argF$ U169 $deoR$ ($\Delta 80dlac\Delta(lacZ)M15$). Mantenida en medio LB Agar.
- *E. coli* Y1090: $\Delta lacU169$, $proA+$, Δlon , $araD139$, $strA$, $supF$, ($trp c22::Tn10$), (pMC9). pMC=pBR322, $lacI^Q$. Mantenida en medio LB Agar + Ampicilina

LEVADURAS

Cepas de levaduras.

- *S. cerevisiae* L40: $MAT\alpha$ $HIS3\Delta 200$ $trp1-901$ $leu2-3,112$ $ade2$ $LYS::(lexAop)4-HIS3$ $URA3::(lexAop)8-lacZ$ $GAL4$

MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Las cepas se mantuvieron en placas del medio correspondiente a 4° C por cortos períodos de tiempo (15 días) y en cultivos líquidos con 50% de glicerol a -70° C durante meses.

CEPA DE REFERENCIA DE *T. cruzi*

La cepa de referencia utilizada por el proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi* se origina a partir de un clon de la cepa CL de *T. cruzi* denominado clon CL Brener. El mismo cumple el ciclo de propagación insecto-vertebrado, asegurando que toda la información genética que determina la infectividad esté presente en el clon. Este clon también presenta estabilidad genética en condiciones de crecimiento de laboratorio (Brener Z., comunicación, Parasite Genome Network Planning Meeting, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 14-15 de Abril de 1994) y es mantenida actualmente en nuestro laboratorio a 30° C en medio de cultivo LIT y replicada cada 7 días.

PREPARACIÓN DE BACTERIAS *E. coli* DH5α COMPETENTES PARA TRANSFORMACIÓN CON PLÁSMIDOS

En un erlenmeyer con 500 ml de medio 2xYT se incubó con 10 ml de bacterias DH5α (crecidas a 37° C toda la noche a partir de una colonia aislada) hasta llegar a una DO_{660nm} 0,45-0,55. Se pasó a 2 tubos de 250 ml y se centrifugó a 3500 r.p.m. 10 min. a 4° C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 100 ml de TFB I y se incubó 15 min. en hielo. Se centrifugó a 3500 r.p.m. 10 min. a 4° C y se resuspendió en 20 ml de TFB II. Se incubó en hielo durante 15 min. y luego se alicuotó en tubos con 500 µl de la suspensión de células, que fueron congelados en nitrógeno líquido y guardados a -70° C hasta el momento de usar.

CORTES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los cortes de restricción se realizaron siguiendo las instrucciones del proveedor comercial de las enzimas por un período de 2 horas. Se comprobó el corte total del ADN por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio. Los insertos o plásmidos fueron purificados a partir de la extracción de la banda correspondiente obtenida por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión y/o con columnas Wizard DNA Clean Up® (Promega) según las indicaciones del kit.

PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN

Para purificar los insertos cortados con las correspondientes enzimas de restricción, se corrieron en un gel de 0,8–1 % agarosa de bajo punto de fusión. Se cortaron los fragmentos correspondientes en un transiluminador de luz U.V. con un bisturí. Se le agregaron 200 µl de TE y se los incubó en un baño a 68° C hasta que la agarosa se disolvió completamente. Luego se le agregó 1 ml de resina del kit Wizard DNA Clean Up® (Promega), se mezcló por inversión varias veces y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se pasó la suspensión por una minicolumna provista por el kit y se lavó 2 veces con isopropanol 80 %. Se centrifugó 2 min. a 10000 r.p.m. para eliminar restos del alcohol. La minicolumna se colocó en un tubo nuevo y se incubó a 70° C, inmediatamente se le agregó a la columna 30–40 µl de TE o agua deionizada precalentados a la misma temperatura y se dejó durante 1 min. Se centrifugó la minicolumna 20 seg. a 12000 r.p.m. para eluir el ADN.

SUBCLONADO EN PLÁSMIDOS

Para subclonar en los plásmidos se utilizaron los insertos que habían sido amplificados por PCR y/o cortados con las enzimas de restricción

correspondientes, extraídos después de la corrida en un gel preparativo de 0,8 – 1 % de agarosa de bajo punto de fusión. Para la ligación se utilizaron las relaciones molares vector:inserto de 1:1 , 1:5 y 1:10. Las experiencias de ligado de los insertos y los plásmidos se llevaron a cabo en un volumen de 10 µl con 20 ng de plásmido y 1 U de T4 DNA ligasa durante 12-18 horas a 16° C. Como control de ligación se incluyó una reacción de ligado de vector sin inserto (autoligado).

SUBCLONADO EN EL PLÁSMIDO pGEM-T Easy

Este vector se empleó para realizar un clonado directo de productos de PCR. Este plásmido posee la característica de tener bases T protruyentes en los extremos 3'. Este tipo de extremos permite la ligación en forma muy eficiente de fragmentos de PCR amplificados que presentan bases deoxiadenina en sus extremos generadas por la Taq polimerasa en forma independiente del templado. Este vector permite además una selección rápida de las colonias recombinantes por α -complementación.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES DH5 α CON LIGACIONES DE PLÁSMIDOS

Se colocaron 5 µl de ligación con 50 µl de bacterias competentes DH5 α y se incubaron 40 min. en hielo. Por otro lado se colocó el plásmido comercial sin inserto, con 50 µl de bacterias competentes para usarlo como control de eficiencia de transformación. Al cabo de ese tiempo se dio un shock térmico de 1,5 min. a 42° C, se colocó nuevamente en hielo por 5 min., se le agregó 1 ml de medio 2xYT o SOC y se incubó durante 45 min. para la recuperación de las células y la expresión del gen de resistencia al antibiótico. Se plaqueó con 40 µl de X-Gal 2 % y 20 µl de IPTG 100 mM (en los casos que el plásmido permitía selección por β -galactosidasa) en placas de LB-agar con ampicilina. Se incubó toda la noche a 37°C.

ANÁLISIS DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES (*Quick minipreps*)

Se picaron con escarbadiantes estériles colonias blancas (o en su defecto al azar), se colocaron en tubos con 3 ml de medio LB con ampicilina y se dejaron crecer durante toda la noche. Como control se picó una colonia azul (o de un plásmido sin inserto). Se colocaron en tubos eppendorf® 100 µl de los cultivos con 50 µl de fenol-cloroformo (1:1) y 10 µl de buffer de siembra 6x para ácidos nucleicos. Se agitó en vórtex durante 1 min., se centrifugó durante 5 min. a 12000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se corrieron 20-25 µl de la fase acuosa en un gel de agarosa 0,6-0,8 % conteniendo bromuro de etidio y se comparó el ADN plasmídico de control con el de las muestras de posibles recombinantes. En los casos que se observó que el plásmido tenía mayor tamaño que el control sin inserto se hizo una extracción del ADN plasmídico.

EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

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

Se inocularon 3 ml de LB-amp con una colonia aislada y se dejó crecer con agitación durante la noche a 37° C. Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 4000 r.p.m. por 5 min. a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µl de solución I fría (glucosa 50mM, Tris HCl (pH: 8) 25 mM, EDTA (pH: 8) 10 mM) y se resuspendió el precipitado por pipeteo o vórtex. Se agregaron inmediatamente 300 µl de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %) se mezclaron cuidadosamente por inversión y se incubó por 3-5 min. a temperatura ambiente. Luego se añadieron 300 µl de solución III fría (acetato de potasio 3 M pH: 4,8), se mezcló por inversión y se dejó en hielo por 10 min. El ADN cromosómico se separó por centrifugación a 12000 r.p.m. a 4° C. Al sobrenadante se lo pasó a un tubo limpio. El ARN se eliminó incubando con ARNasa A a una concentración final de 50 µg/ml por 15 min. a 37° C. Se añadieron 600 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló con vórtex y se centrifugó 2 ó 3 min. a 12000 r.p.m.

para separar las fases. Se pasó a un tubo la fase acuosa y se le agregaron 600 μ l de isopropanol 100 % que fue mezclado por inversión. Se dejó 30 min. a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12000 r.p.m. por 15 min. El precipitado se lavó con 500 μ l de etanol 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada o TE (pH: 8).

RASTREO RADIATIVO DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Cuando el número de colonias obtenidas en una transformación era elevado, se realizó un rastreo radiactivo. Sobre las placas se colocó filtros de nylon Hybond-N⁺, se los dejó 1 minuto, se realizaron marcas con una aguja para poder ubicar posteriormente las colonias con señales positivas. Se colocó sobre un papel Whatman® 3MM embebido en solución desnaturizante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaCl) durante 3 min. con la cara que tuvo contacto con las colonias hacia arriba, luego se repitió el procedimiento con solución neutralizante (1,5 M NaCl, 0,5 Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA) por 3 min.. Se lavó durante 5 min. en 5x SSC, se fijó 20 min. con 0,4 N de NaOH y se volvió a lavar 5 min. con 5x SSC.

Los filtros se secaron sobre un papel Whatman® 3MM y se guardaron a 4° C hasta su utilización.

MARCADO RADIATIVO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL RASTREO DE INSERTOS

Se colocó 10 μ l de 10 μ M del oligonucleótido a marcar, con 1x final de buffer T4 PNK (polinucleótido kinasa), con 1 μ l de la enzima T4 PNK y 2 μ l de γ^{32} P-ATP. Se incubó a 37° C por una hora y luego 10 min. a 70° C con 10 mM de EDTA. Se precipitó con 1 μ l de ARN_i de levadura (10 μ g/ μ l) y 330 μ l de etanol/acetato de amonio, durante 30 min. a -70° C. Se centrifugó 15 min. a 12000 r.p.m. y se resuspendió el pellet en 100 μ l de agua deionizada. Se utilizó 5 μ l de sonda por filtro.

HIBRIDACIÓN DE LOS FILTROS CON OLIGONUCLEÓTIDOS MARCADOS RADIOACTIVAMENTE.

Se prehibridaron los filtros durante 2 horas a 42° C en una solución, suficiente para cubrir los filtros, conteniendo 5 ml de 20x SSC, 1 ml de fosfato diácido de sodio 0,2 M pH: 6,8, 1 ml de 50x Denhardt's, 500 µl de SDS 10 %, 100 µl de ADN de esperma de salmón, agua deionizada c.s.p. 10 ml. Se hibridó durante toda la noche a 37° C.

Se lavó 15 min. con 6x SSC, 0,5% SDS a 37° C, y 10 min. a 45° C con agitación. Se controló con un contador Geiger la marca radiactiva, y en caso de observarse demasiada radiactividad, se siguió lavando durante 10 min. más a 45° C.

Los filtros se expusieron sobre películas AGFA-GEVAERT Curix RP1 durante 2 ó 3 días a -70° C.

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Se utilizó el equipo de secuenciación 373 de Applied Biosystems, que es un instrumento automático de barrido del gel. El ADN se secuenció usando terminadores coloreados usando el Kit Prism Ready Reaction® Dye terminator.

El ADN fue preparado a partir del método de extracción de ADN plasmídico resuspendido en 32 µl de agua. Se le agregó 8 µl de NaCl 4 M y 40 µl de PEG-8000 13 %, se incubó en hielo por 20 min. y se centrifugó por 15 min. a 12000 r.p.m. a 4° C. Se realizó un lavado con 500 µl de etanol 70 %, se centrifugó nuevamente en iguales condiciones y se secó durante 3 min. en vacío. El ADN listo para secuencia se resuspendió en 20 µl de agua deionizada.

Para la reacción de secuencia realizada por PCR se utilizó 1 µg de ADN, 32 pmoles de oligonucleótidos, 9,5 µl de premix (que contiene dNTPs sin marcar y ddNTPs marcados con colorantes, buffer de reacción y AmpliTaq® polimerasa) y agua deionizada c.s.p. 20 µl. La reacción de PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 30 seg. a 96° C, 15 seg. a 50° C y 4 min. a 60° C, durante

25 ciclos. La reacción obtenida fue precipitada en un tubo eppendorf® de 1,5 ml con 2,5 µl de CTAB 5 %, se mezcló bien a temperatura ambiente y se centrifugó 3-4 min. a 12000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 µl de NaCl 1,2 M y 125 µl de etanol absoluto. Se mezcló bien con pipeta y se centrifugó 5 min. a 12000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 %. Se centrifugó en las condiciones anteriores, se descartó el sobrenadante y se dejó secar en vacío la muestra precipitada.

SECUENCIACIÓN MANUAL

La secuenciación de ácidos nucleicos se llevó a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos. Para ello se utilizó el kit de secuenciación *fmol*® (Promega) y se siguieron las indicaciones de los fabricantes.

Se mezcló en un tubo 5 µl de Buffer *fmol* 5x (que contiene los dNTPs sin marcar), 3 pmol oligonucleótido, 100 ng de ADN a secuenciar, 0,5 µl de [α - 35 S]dATP 10µCi/µl y agua hasta alcanzar un volumen final de 16 µl. Se agregó 1 µl de Taq DNA Polimerasa (Sequencing Grade). Se trasvasaron 4 µl de esta mezcla a 4 tubos rotulados A, C, G, T conteniendo cada uno 2 µl de la mezcla apropiada de d/ddNTP. Posteriormente se agregó una gota (aproximadamente 20 µl) de aceite mineral. Luego se realizó una reacción de PCR con el siguiente programa: 2 min. a 94° C para la desnaturalización del ADN doble cadena, y 30 ciclos con los siguientes parámetros: 30 seg. a 94° C (desnaturalización), 30 seg. a 42° C (apareamiento del oligonucleótido) y 1 min. a 70° C (elongación).

Una vez finalizada la reacción se agregó 3 µl de Solución Stop a cada tubo. Los tubos fueron precalentados a 70° C durante 2 min. antes de sembrar las muestras en el gel. Se utilizó una cuba de electroforesis Gibco-BRL de geles verticales de 30 x 40 cm, con espaciadores de 0,3 mm. Se emplearon geles de poliacrilamida 6 % y 7 M de urea. Los geles se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida-bisacrilamida (40:2) 40 %. Se disolvió a 37° C en

agitador 42 gr de urea (Sigma) con 15 ml del stock de acrilamida 40 %, más 10 ml de TBE 10X y fue llevado hasta 100 ml con agua deionizada. La polimerización se realizó con 280 µl de persulfato de amonio 10 % y 100 µl de TEMED. La electroforesis se llevó a cabo aplicando una potencia constante de 60 W. Concluida la migración se enjuagó el gel con agua corriente, para retirar la urea remanente. El gel se retiró con un papel Whatman® 3MM, se secó en vacío a 80°C durante 2 hs. y se expuso sobre películas AGFA-GERVAERT Curix RP1 durante 24 hs. o más a temperatura ambiente (Sambrook, 1989).

AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS INSERTOS PARA SUBCLONADO

Se amplificó por PCR los insertos a partir de cósmidos, ADN genómico o ADNc. Se tomó 200 fmoles de ADN, se le colocó 50 pmoles de cada primer, 200 µM de dNTPs, 2,5 µM de MgCl₂, Buffer Taq para 1x final, 2,5 U de enzima Taq polimerasa y agua deionizada de máxima pureza c.s.p. 100 µl. Como control de contaminación se utilizó un tubo que no contenía ADN; y como control de que los procedimientos realizados fueron correctos, se amplificó plásmidos con insertos conocidos.

La reacción se realizó en GeneAmp PCR System 9600 Perkin Elmer y las condiciones fueron las siguientes:

Desnaturalización del ADN	5 min. a 94° C	] durante 30 ciclos
Desnaturalización del ADN	1 min. a 94° C	
Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a temperatura variable de acuerdo al T _m de los oligonucleótidos	
Síntesis de ADN	1 min. por cada 1000 pb a amplificar a 72° C	
Completado de cadenas	10 min. a 72° C	

Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa con 5-10 µl de cada reacción en un gel de 0,8-1 % de agarosa para visualizar la amplificación.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La agarosa se disolvió en buffer TAE 1x a una concentración adecuada de acuerdo a la longitud del ADN a visualizar y se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0,1 µg/ml. Las muestras de ADN se sembraron con buffer de siembra para ácidos nucleicos 1x. La electroforesis se llevó a cabo con buffer TAE 1x, generalmente en un campo eléctrico de 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm y fotografiados.

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN EL SISTEMA pMAL

Un cultivo de 500 ml de medio LB-amp conteniendo aproximadamente 2×10^8 células/ml fue inducido por el agregado de IPTG (0,3 mM final). Luego de una incubación durante 3 hs. a 37° C, las células se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en 50 ml de buffer de columna (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2 M NaCl y 10 mM β-mercaptoetanol). La ruptura celular se realizó mediante un ciclo de congelamiento-descongelamiento y dos ciclos de sonicación de un minuto cada uno. Se realizó una centrifugación a 9000 g durante 30 min. obteniéndose en el sobrenadante las proteínas citoplasmáticas. En casos en que la proteína formaba cuerpos de inclusión se centrifugó a menor velocidad para evitar que se fueran al precipitado.

PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES SISTEMA pMAL

En el sistema pMAL la proteína de interés es sintetizada como una proteína de fusión con la MBP (maltose binding protein). Esta característica permite la utilización de columnas de resina de amilosa para su purificación. Se utilizaron columnas de 1,5 cm de diámetro por 9 cm de alto con 10 ml de resina. Se

sembraron 10 ml de extracto crudo y se lo hizo recircular durante 2 hs. utilizando una bomba peristáltica. Se realizaron lavados con 20 ml del buffer con el cual se equilibró la columna (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2 M NaCl y 10 mM β -mercaptoetanol). Posteriormente, la proteína de fusión se eluyó con maltosa 10 mM. Durante los lavados y la elución se colectaron fracciones de 1,5 ml y alícuotas de las mismas (20 μ l) que fueron analizadas en SDS-PAGE 10 %. Las fracciones en las cuales se observó la proteína recombinante libre de contaminantes fueron parcialmente liofilizadas durante 4 hs. y aquellas en que la cantidad de proteínas observada en el gel fue similar se juntaron. Posteriormente se determinó la concentración proteica.

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN EL SISTEMA pGEX

Se utilizó la misma metodología que la empleada para purificar proteínas de fusión con MBP, con la diferencia de que las células fueron resuspendidas en PBS 1x con 1mM de PMSF y el extracto crudo obtenido luego de la sonicación se pasó por una columna de glutation-agarosa, siendo eluida la correspondiente proteína de fusión con glutation reducido 5 mM.

DETECCIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

Se inoculó un tubo de 3 ml de LB-amp con una colonia aislada y se creció durante toda la noche a 37° C con agitación. Al otro día se hizo una dilución 1/100 en 200 ml de LB-amp, se lo creció hasta una $DO_{600nm} = 0,4-0,5$ y luego se lo indujo con 0,3 mM de IPTG durante 4 hs. Se centrifugó el cultivo a 5000 r.p.m. durante 10 min. a 4° C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 3,2 ml de TNE (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH: 8) y se dejaron durante 5 min. en hielo. Se le agregaron 3,2 ml de TNE-SAC (TNE, sacarosa 50 %), se incubaron durante 5 min. en hielo, luego se añadieron 6,4 ml de lisozima (4 mg/ml) y se la dejó actuar por 10 min. en hielo. Se agregaron 1,6 ml de 0,5 M EDTA y 1,6 ml de Tritón-X100 10 %. Se realizaron 3 ciclos de

congelado/descongelado y a continuación se pasó 10 veces por una jeringa con una aguja 18-21G. Se centrifugó durante 20 min. a 6000 r.p.m. a 4° C. El sobrenadante fue guardado y el precipitado fue resuspendido en 10 ml de TNE-T (TNE, 1% Tritón-X100). Se volvió a centrifugar a 5000 r.p.m. por 15 min. a 4° C. El sobrenadante fue guardado y el precipitado se lo resuspendió en 1 ml de urea 8 M. Se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12500 r.p.m. por 30 min. El precipitado fue descartado y el sobrenadante guardado. Se corrió en un gel de poliacrilamida-SDS los sobrenadantes. Si la proteína aparece en el último sobrenadante significa que forma cuerpos de inclusión.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó mediante un micrométodo adaptado del protocolo original descrito por Bradford. A 10 µl de cada muestra se agregaron 100 µl de reactivo de Bradford (1976). Las muestras se analizaron por duplicado en placas de poliestireno de 96 pozos y se midió la DO_{595nm} en un lector de microplacas VERSAmax® (Molecular Devices Corporation). Se utilizaron patrones de BSA (0,075–5 mg/ml) para la construcción de una curva de calibración y sobre la base de la misma se determinó la concentración proteica de las muestras.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) se realizaron, en la mayoría de los casos, en geles de poliacrilamida 10 %. Los mismos fueron preparados como sigue: para un volumen de 10 ml de gel separador se colocó 4 ml de agua, 3,3 ml de acrilamida 30 % (acrilamida 29,2 : bisacrilamida 0,8), 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M pH: 8,8, 100 µl de SDS 10 %, 100 µl de persulfato de amonio 10 % y 4 µl de TEMED. Para un volumen de 5 ml de gel concentrador se colocó 3,4 ml de agua, 830 µl de acrilamida 30 %, 630 µl de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 50 µl de SDS 10 %, 50 µl de persulfato de amonio 10 % y 5 µl de TEMED. Las muestras a analizar se

calentaron a ebullición durante 3 min. Luego se sembró el gel con 20 µl por calle. Como buffer de corrida se utilizó una solución 0,1% SDS, 192 mM glicina, 25 mM Tris, pH: 8,3. Las condiciones de corrida fueron: 35 mA corriente continua durante aproximadamente 45 min. a temperatura ambiente.

TINCIÓN DE LOS GELES CON COOMASIE BLUE

Se sumergió el gel en la solución de tinción (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R (Sigma), 40 % metanol, 10 % ácido acético) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave y luego fue desteñido utilizando una solución 40 % metanol – 10 % ácido acético, hasta la visualización de las bandas, luego fue lavado con agua deionizada. Para su conservación, el gel se secó utilizando un secador de geles a 80° C durante 1 hora.

ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A FILTROS DE NITROCELULOSA

Luego de la corrida se electrotransfirieron las proteínas a nitrocelulosa. Se sumergió el gel en buffer de electrotransferencia y se le colocó un trozo de nitrocelulosa (Hybond-C®, Amersham) del tamaño del gel previamente hidratada en el mismo buffer. Se colocó a ambos lados 2 papeles Whatman® 3MM y por fuera las almohadillas provistas por el equipo de transferencia también embebidos en buffer. Se ensambló en el cartucho de transferencia y éste se colocó dentro de la cuba de electrotransferencia (Bio-Rad), que luego se llenó de buffer a 4° C. La transferencia se realizó a 250 mA durante 1 hora. Para verificar que la transferencia fue correcta se tiñó la nitrocelulosa con rojo ponceau S, luego se destiñó con agua. La membrana fue bloqueada durante toda la noche en TBS-leche 3 % a 4° C. La nitrocelulosa se incubó con un suero y fue revelada como se indica en revelado inmunoenzimático.

REVELADO INMUNOENZIMÁTICO

Las membranas bloqueadas se colocaron con el suero a la dilución correspondiente en una solución de TBS-leche 3 % solo o con 10 % de lisado de *E. coli* cuando se trataba de la expresión de proteínas recombinantes en extractos totales de bacterias. Se incubó con agitación suave durante 1-2 hs a temperatura ambiente. Se retiró la solución con el suero y se realizaron 3 lavados con TBS-TW 1x de 10 min. cada uno. Se incubó 1 hora con un segundo anticuerpo (anti-IgG humana o ratón biotinilado, preparado en cabra [kit ABC[®] Vectastain, Vector Laboratories]), el cual se preparó como indicaba el fabricante (50 µl anti-IgG biotinilado en 10 ml TBS-leche 3 %).

Se retiró el segundo anticuerpo y se realizaron 4 lavados de 5 min. cada uno con TBS-TW 1x. A continuación se le agregó el complejo avidina-biotina-peroxidasa del mismo kit, que se preparó como indicaba el fabricante (50 µl de la solución A y 50 µl de solución B cada 10 ml de TBS 1x y se esperó 30 min. antes de usar para que se formaran los complejos avidina-biotina-peroxidasa). Se incubó durante 1 hora, después de la cual se retiró y lavó una vez con TBS 1x durante 5 min. Para el revelado se agregaron 18 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma) disueltos en 6 ml de metanol frío a 30 ml de TBS 1x con 150 µl de imidazol y 20 µl de peróxido de hidrógeno. Se incubó en oscuridad hasta la aparición de las señales. La reacción se detuvo con agua.

OBTENCIÓN DE LISADO DE *Escherichia coli*

Bacterias *E. coli* se cultivaron en 500 ml LB o LB-ampicilina durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron durante 10 min. a 3000 r.p.m. y se resuspendieron en 16,6 ml de TBS 1x, 1 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PSMF y se congeló con nitrógeno líquido. El lisado se dejó fundir a temperatura ambiente y se sonicó hasta hacerlo poco viscoso. Se guardó a -20° C.

PATRONES DE PESO MOLECULAR

Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos, abarcando el rango de 27000-180000 Daltons (Prestained kit protein Molecular Weight, Sigma). Se prepararon según la indicación de los fabricantes, y se emplearon 5 µl/calle.

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR LA TÉCNICA DE ELISA

Los antígenos utilizados (péptidos, proteínas recombinantes y extractos celulares) fueron diluidos en buffer carbonato (0,1 M carbonato de sodio pH: 9,6). Mediante la construcción de curvas de calibración (DO_{415nm} vs mg de antígeno) se determinó la cantidad óptima para cubrir cada pocillo. El pegado de los mismos se realizó durante toda la noche a 4° C. El bloqueo se realizó con 200 µl/pocillo de PBS-leche 5 %. Se realizaron 3 lavados con PBS-TW. Los sueros fueron diluidos apropiadamente en PBS-leche 5% e incubados durante 2 hs. Como segundo anticuerpo se utilizó anticuerpos anti-IgG de ratón (Promega) o anti-IgG humana (Biosys) conjugados con fosfatasa alcalina y diluidos en PBS-leche 5% (1/2500 y 1/4000 respectivamente). Se incubaron durante 2 hs. y luego se realizaron 3 lavados con PBS-TW. El revelado de la placa se realizó con 50 µl/pocillo de una solución 1 mg/ml de para-nitrofenol fosfato (Sigma) en dietilnolamina a 37° C durante 30 min. a 1 hora.

DETERMINACIÓN DE ISOTIPOS

Se siguió el mismo protocolo que para ELISA directo pero en este caso el segundo anticuerpo empleado fue contra un determinado isotipo (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) (preparado en cabra; Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) o bien anti-IgG total (preparado en conejo; Sigma, Steinheim, Alemania). Todos los anticuerpos usados estaban conjugados a fosfatasa alcalina. Se probó con dos diluciones diferentes del segundo anticuerpo (1/1500 y 1/3000). Se determinó que en la dilución 1/1500 el sistema se saturaba, por lo que se utilizó

finalmente el segundo anticuerpo en una dilución 1/3000. Se realizó un blanco incubando con PBS-leche 1% en vez de primer anticuerpo para cada uno de los segundos anticuerpos empleados. Se observó en todos los casos que los blancos fueron bajos y parejos por lo cual no se restaron a las DO obtenidas con los distintos sueros.

INMUNIZACIÓN DE RATONES CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Ratones BALB/c hembras entre 4–6 semanas de edad fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 30 µg de proteína purificada. Los animales recibieron 3 dosis de proteína cada 15 días. La primera dosis se administró en presencia de adyuvante completo de Freund (CFA) mientras que las dos siguientes fueron con adyuvante incompleto de Freund (IFA). El adyuvante y la proteína fueron agregados a igual volumen y emulsionados en vórtex hasta observar una “sola fase”. Antes de cada inoculación se le extrajeron pequeñas cantidades de sangre a partir de una incisión realizada con un bisturí en las venas de la cola, que fueron colectadas con capilares heparinizados; de este modo se pudo observar la evolución de la respuesta inmune contra el antígeno inoculado. Los capilares fueron cerrados por un extremo con plastilina y centrifugados en una centrífuga para capilares durante 5 min. (CH 24, Rolco). Para separar el suero del coágulo, se rompieron los capilares en donde se observaba la interfase suero:células, y se pasó el suero a tubos eppendorf® que fueron guardados a -20° C. Después de 15 días de la última inmunización los ratones fueron sangrados a blanco por extracción del ojo, la sangre se colectó directamente en eppendorf®. Se incubó a 37° C por 1 hora y después a 4° C por 15 min. Finalmente se centrifugó por 10 min. a 13000 r.p.m. a temperatura ambiente (Mikroliter Heitich, Apelex) y se obtuvo el suero (sobrenadante). Tanto para realizar las inmunizaciones como para las colectas, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con avertina (2,2,2,- tribromoetanol, Aldrich Chem. Co) 2% con una dosis que variaba entre 12 a 15 µl/gr de ratón.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS TOTALES DE *Trypanosoma cruzi* A PARTIR DE LISADOS DE EPIMASTIGOTES

Se resuspendió 3 gr. de epimastigotes en 10 ml de buffer de lisis de epimastigotes (PBS 1x, 1 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoetanol, 0,1% SDS con antiproteolíticos: 1 mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptina, 1 mM benzoamidina, 25 U/ml trasylol, 2 μ g/ml inhibidor de tripsina). Se congeló en nitrógeno líquido y luego se descongeló en un flujo de agua corriente. Este procedimiento de congelado-descongelado se repitió 3 veces. Se fraccionó en tubos de 1,5 ml y se guardó a -20° C. La concentración de proteínas se determinó a 620 nm en lector de ELISA con reactivo de Bradford, previa curva de calibración con BSA (0,075 – 5 mg/ml).

WESTERN BLOT CON EXTRACTOS DE PROTEÍNAS TOTALES DE *Trypanosoma cruzi* Y COMPETICIÓN CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Los extractos de proteínas totales de *T. cruzi* obtenidos fueron corridos a razón de 50–80 μ g de proteína por calle, en un gel de poliacrilamida - SDS 10 % y electro-transferidos a una membrana de nitrocelulosa Hybond C[®] (Amersham). Se coloreó con rojo ponceau S para identificar las calles y permitir su correcto corte.

Los sueros para incubar con las membranas fueron utilizados a una concentración de 1/100, diluidos en TBS-leche 3 % y competidos, en los casos especificados, con diferentes concentraciones de proteínas recombinantes durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Se agregaron los sueros competidos a las membranas que habían sido bloqueadas durante toda la noche con TBS-leche 3 %, se las incubó durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente y se continuó con los procedimientos habituales para su revelado inmunoenzimático.

PREPARACIÓN DE ARN TOTAL DE *Trypanosoma cruzi*

Se largaron cultivos de epimastigotes de la cepa CL-Brener de *Trypanosoma cruzi* en 250 ml de medio LIT. Se cosecharon los parásitos centrifugando durante 5 min a 300 g. La purificación del ARN total se realizó usando el mini kit RNeasy® de Qiagen.

Los parásitos fueron resuspendidos en el buffer de lisis RLT provisto por el fabricante a razón de 1×10^7 - 10^8 parásitos en 600 µl de buffer. Se pasó el lisado 5 veces por una jeringa con aguja de 20 G para homogeneizar. Se le agregó 1 volumen de etanol 70 % y se paso por una mini columna provista en el kit, se centrifugó 15 seg. a 10000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se lavó con 700 µl de buffer RW1 provisto en el kit y se centrifugó de igual manera. La columna se pasó a un tubo nuevo y se lavó con 500 µl de buffer RPE, se centrifugó 15 seg. y se repitió la operación pero centrifugando durante 2 min. a máxima velocidad. Una vez la columna seca, se eluyó centrifugando durante 1 min. con 50 µl de agua libre de ARNasa.

Se obtuvo la concentración midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro.

ELECTROFORESIS CON ARN PARA NORTHERN BLOTS

Se prepararon los materiales a usar lavándolos con soluciones con 0,1 M NaOH, 1mM EDTA y enjuagando con agua tratada con dietilpirocarbonato 0,1 % (DEPC) y/o realizando dos ciclos de autoclavado. Las soluciones también fueron tratadas con DEPC 0,1 %. El manejo del material se realizó con guantes descartables cambiándolos frecuentemente.

Se corrió el ARN obtenido en un gel de agarosa 1 % en buffer MOPS 1x, 6,6 % formaldehído en agua libre de ARNasa. Las muestras sembradas fueron preparadas en un volumen final de 40 µl, y contenían 4 a 10 µg de ARN total, 4 µl de MOPS 10x, 8 µl de formaldehído 37,5 % y 22 µl de formamida deionizada. Se calentó a 65° C durante 10 min., y se dejó 2 min. en hielo. A cada muestra se

agregó 2 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), buffer de siembra para ácidos nucleicos 6x y se sembró en el gel. El gel fue corrido en buffer MOPS 1x con 6,6% de formaldehído a 75 V constantes. El gel fue observado en un transiluminador de luz UV y fotografiado. Se transfirió a una membrana de nylon Hybond N⁺® (Amersham) durante toda la noche usando como buffer de transferencia MOPS 10x. El ARN se fijó a la membrana por "autocrosslinking" con un UV Stratalinker® 1800 de Stratagene. La membrana fue guardada a -20°C hasta su hibridación con las sondas radiactivas.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE ARN TOTAL DE *Trypanosoma cruzi*

Para la transcripción reversa se utilizó 1 µg de ARN total de *T. cruzi*, buffer M-MLV® RT 1x (Promega), 10 U de RNasa inhibitor, dNTP 2 mM, 200 ng de hexámeros al azar, 600 U de enzima M-MLV® RT y agua c.s.p. 20 µl.

Se incubó durante 10 min. a 25° C, 40 min. a 42° C y 5 min. a 95° C.

PREPARACIÓN DE ADN TOTAL DE *Trypanosoma cruzi*

Se tomó 1 ml de un cultivo saturado de epimastigotes de *T. cruzi* (1x10⁸ cel/ml) y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 min. Los parásitos se resuspendieron en 1 ml de PBS 1x para retirar el medio de cultivo remanente y se volvieron a centrifugar a 3000 r.p.m. 10 min. Se resuspendieron en 1 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH: 8, EDTA 100 mM pH: 8, N-Lauril Sarcosina 1 %). Se agregaron 2 µl de ARNasa 10 mg/ml y se incubó a 37° C durante 1 hora. Se agregaron 500 µl de fenol : cloroformo : isoamílico 25:24:1, se mezcló por inversión y se centrifugó 5 min. a 13000 r.p.m. Con un tip azul cortado se tomó la fase acuosa y se pasó a otro tubo. Se repitió el paso anterior y luego se agregaron 500 µl de cloroformo : isoamílico 24:1. Se centrifugó durante 5 min. a 13000 r.p.m. y se pasó la fase acuosa a otro tubo. Se precipitó el ADN con un volumen de isopropanol 100 % durante 10 min. a temperatura ambiente, y centrifugando a 13000 r.p.m durante 10 min. Se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70 % y se

centrifugó a 13000 r.p.m. por 10 min. Se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 µl de TE.

ELECTROFORESIS CON ADN DIGERIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN PARA SOUTHERN BLOTS

Se digirió el ADN de *Trypanosoma cruzi* con las enzimas de restricción elegidas y fue corrido junto con marcador de peso molecular 1kb Ladder (BRL) en un gel de agarosa 0,8 % a 20 V. Se transfirió a una membrana de nylon Hybond N⁺® con una solución de 0,4 N NaOH durante toda la noche. Las membranas se guardaron a 4° C hasta su hibridación con sondas radiactivas.

PREPARACIÓN DE BLOQUES DE *Trypanosoma cruzi* PARA ELECTROFORESIS EN CAMPOS PULSADOS

Se cosecharon epimastigotes de la cepa CL Brener de *T. cruzi* por centrifugación a 1200 g por 15 min., se lavaron 2 veces con PSG, y se determinó el número de células. Se resuspendieron las células en PSG a una concentración de 2x10⁹ parásitos/ml y se calentaron levemente a 37° C. Se agregó un volumen igual de 1,2 % de agarosa Sea Plake en PBS a 40° C. Se mezcló y transfirió a los moldes para bloques. Se dejó endurecer 5–10 min. en hielo. Se incubó las muestras en 3–5 volúmenes de DB 0,5 por 48 hs. a 50° C con agitación suave. Las muestras fueron guardadas a 4° C hasta su utilización para la electroforesis en campos pulsados.

ELECTROFORESIS EN CAMPOS PULSADOS (PFGE)

La corrida electroforética se realizó en un CHEF II® de Bio-Rad. Las condiciones de corrida para los geles preparativos de la cepa CL Brener de *T. cruzi* fueron las siguientes: buffer TAE 1x, agarosa Sea Plake 0,8 %, 15 seg - 300 seg, 3 V/cm, 30 hs; 500 seg - 900 seg, 2,7 V/cm, 30 hs; 900 seg - 1500 seg, 2,7 V/cm, 30 hs a 14°C.

El gel fue teñido con 10 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml en 200 ml de buffer de corrida (TAE 1x) durante 30 min., luego se destiñó durante otros 30 min. con el mismo buffer sin bromuro. Se observó en un transiluminador de luz UV para comprobar la correcta visualización de los cromosomas y fotografiarlo. Se incubó durante 10 min. con 0,25 N HCl, se equilibró durante 15 min. en 0,4 N NaOH para luego transferirlo a una membrana de nylon Hybond N⁺® (Amersham) en el mismo buffer (0,4 N NaOH) durante toda la noche. A día siguiente se lavó la membrana con SSC 2x y se guardó a -20° C.

PREPARACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS

Las sondas radiactivas se prepararon con el kit *Megaprime® DNA labelling system* (Amersham). Se colocó 4 µl de ADN templado en TE (50 µg/µl) con 2,5 µl de primer solution (solución de nonámeros al azar) y 10 µl de agua deionizada. Se hirvió 5 min. e inmediatamente se colocó en hielo. Se centrifugó unos segundos para bajar lo que se condensó en las paredes del tubo. Se agregó 5 µl de Labelling Mix (mezcla de nucleótidos fríos), 2,5 µl de [α -³²P] dCTP 25 µCi y 1 µl de fragmento Klenow, se incubó 20 min. a 37° C y se colocó en hielo. Para el precipitado de la sonda se colocó 2 µl de ADN "carrier", 13,5 µl (½ volumen) de acetato de amonio 7,5 M y 81 µl (2 volúmenes) de etanol absoluto; se dejó 20 min. a -70° C. Se incubó 2 min. a 37° C para resuspender los nucleótidos que no se incorporaron a la sonda y se centrifugó inmediatamente durante 15 min. a 12000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µl de una solución de etanol 67 % - de acetato de amonio 0,67 M. Se centrifugó otros 15 min. en iguales condiciones, se desechó el sobrenadante, se dejó secar en estufa a 37° C y se resuspendió el ADN en 100 µl de TE (pH: 8). En todos los pasos se midió la marca radiactiva en precipitados y sobrenadantes como control de la correcta incorporación de los isótopos radiactivos.

HIBRIDIZACIÓN CON SONDAS RADIATIVA

Se colocaron los filtros en botellas de hibridización con 5-10 ml de la solución de hibridización comercial *Rapid hybridization system*[®] (Amersham) o, en su defecto, una solución 0,4 % de leche descremada, 6x SSC y SDS 0,1 %. La prehibridización se llevó a cabo a 65° C durante 1 hora, luego se agregó la sonda radiativa previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 min. La hibridización se realizó con agitación a la misma temperatura por un período no menor a 2 horas. Las membranas fueron lavadas en condiciones de alta homología: 2 lavados de 25 min. cada uno a temperatura ambiente y con agitación en una solución 2x SSC con SDS 0,2 % seguidos de 2 lavados de 20 min. a 65° C con agitación en una solución 0,2x SSC con SDS 0,2 %. Entre los lavados se monitorearon los filtros con un contador Geiger para obtener una buena relación entre la sonda hibridizada específicamente y diferenciarla del ruido de fondo. Los filtros se expusieron sobre películas AGFA-GEVAERT Curix RP1 durante 2 ó 3 días a -70° C.

FRACCIONAMIENTO CELULAR DE *Trypanosoma cruzi* POR CENTRÍFUGACIÓN DIFERENCIAL

Se largaron cultivos de epimastigotes de la cepa CL-Brener de *Trypanosoma cruzi* en 500 ml de medio LIT. Se cosecharon los parásitos centrifugando durante 5 min. a 1000 g. Se realizaron 2 lavados con PBS 1x y se resuspendió el precipitado en solución de 50 mM Tris-HCl pH: 7,5, 250 mM sacarosa y 5 mM KCl, a razón de 0,5 ml por cada 1×10^9 parásitos.

Se realizaron 3 ciclos de congelado y descongelado con nitrógeno líquido para lisar las células. El homogenato fue sometido a 6 centrifugaciones sucesivas: a 500 g por 15 min., 1000 g por 15 min., 5000 g por 15 min., 11000 g por 30 min., 30000 g por 30 min. y 105000 g por 60 min., obteniéndose en la sedimentación la fracción nuclear, flagelar, mitocondrial, "heavy" lisosomal - glicosomal, "light" lisosomal y microsomal respectivamente, y en el sobrenadante la

fracción citoplasmática. Cada precipitado fue resuspendido y lavado 2 veces con la misma solución y centrifugado a la velocidad correspondiente. Los precipitados de cada fracción se resuspendieron en volúmenes no superiores a 300 µl. La concentración de proteínas se determinó a 595 nm en lector de ELISA con reactivo de Bradford, previa curva de calibración con BSA (0,075 - 5 mg/ml). Las muestras fueron preparadas con buffer de siembra para proteínas 2x en partes iguales. De acuerdo a la concentración obtenida se colocó aproximadamente 20 a 30 µg por calle.

PREPARACIÓN DE EPIMASTIGOTES PARA LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA POR INMUNOFLUORESCENCIA

Cultivos de epimastigotes de la cepa CL/ Brener de 1×10^8 parásitos/ml crecidos en 100 ml medio LIT fueron centrifugados a 1200 g durante 15 min. Luego se lavaron 2 veces con PBS 1x. El precipitado fue resuspendido para su fijación en 500 µl de p-formaldehído 4 %, glutaraldehído 0,25 % en PBS durante 30 min. a temperatura ambiente. Todas las incubaciones y lavados fueron realizados con agitación, y las centrifugaciones fueron realizadas a 1200 g durante 5 min. El precipitado se resuspendió suavemente con 200 µl de glicina 20 mM en PBS y se incubó 5 min. Luego de una nueva centrifugación se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 200 µl de PBS- Tritón X-100 0,2 %, incubándolo durante 10 min. Se centrifugó y se resuspendió para bloquear en PBS-BSA 1 % incubando durante una hora a temperatura ambiente o a 4° C durante toda la noche. Se colocaron alícuotas de 30 µl de las muestras en tubos de 0,5 ml. Se centrifugaron para retirar la solución de bloqueo y se incubó cada uno con 300 µl del primer anticuerpo diluido 1/150 a 1/300 en PBS-BSA 1 % Tween 20 0,05%. Se incubó durante dos horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C. Se centrifugó para retirar la solución con el 1^{er} anticuerpo y se lavó cada muestra 3 veces durante 5 min. con PBS-BSA 1 %- Tween 20 0,05 %, realizando centrifugaciones de 5 min. Al precipitado se le agregó 100 µl de

solución con el 2^{do} anticuerpo antiratón acoplado al fluoróforo TRSC® (Texas Red sulfonyl choride de Jackson Immuno Research) diluido 1/100 en PBS - BSA 1%- Tween 20 0,05 %. Se observó en un microscopio de fluorescencia utilizando una longitud de onda de 596 nm, siendo su emisión a una longitud de onda de 620 nm. Se fotografió con un rollo Kodak® color de 400 ISO.

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS COS-7 CON LIPOFECTAMINAS.

A partir de un cultivo de células COS-7 crecido en medio DMEM 10 % suero fetal bovino, se sembraron las células en placas de cultivo de 6 pocillos y se las crecieron toda la noche hasta obtener un 50-70 % de confluencia. Se preparó en un tubo eppendorf® (Tubo A) 100 µl de medio OptiMEM® (GIBCO) con 1-2 µg del plásmido a transfectar. Se preparó en un tubo de vidrio (Tubo B) 100 µl de medio OptiMEM® con 8 µl de lipofectamina (GIBCO). Se pasó el contenido del tubo A al tubo B y se incubó entre 15-45 min. a temperatura ambiente. Se le agregó 800 µl de OptiMEM®. Por otro lado se lavaron las células con 2 ml de OptiMEM® para retirar el medio DMEM-10 % suero fetal bovino (El medio OptiMEM® está formulado para reacciones de transfección por poseer baja concentración de suero fetal bovino que inhibe la transfección). Se colocó lentamente sobre las células (gota a gota) la mezcla del tubo B. Se incubó de 3 a 6 horas a 37° C en estufa con 5 % CO₂.

Se aspiró el medio de transfección y se le agregó medio DMEM-10 % suero fetal bovino. Se incubó durante 24 a 48 horas a 37° C 5 % CO₂.

DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS COS-7 TRANSFECTADAS

Después de 24 a 48 horas de la transfección, se aspiró el medio y se lavaron las células 2 veces con 2 ml de PBS 1x. Se fijaron las mismas con 500 µl de metanol : acetona (1:1) que se colocó en gotas con una pipeta y se dejó 2 min. a

temperatura ambiente. Luego de lavarlas 2 veces con PBS 1x se incubaron con 800 µl del primer anticuerpo (las diluciones del mismo se realizaron en PBS 1x con 10 % de suero fetal bovino, utilizándose 1/500 a 1/1000). Se aplicó sobre las células gota a gota y se incubaron durante 1 a 2 hs. a temperatura ambiente. Luego se lavaron 5 veces con PBS 1x. Se incubaron con el conjugado anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina diluido 1/250 a 1/500 en PBS 1x con 10 % de suero fetal bovino. Se incubaron durante 1 a 2 hs. a temperatura ambiente. Se volvieron a hacer 5 lavados con PBS 1x y se incubaron con 800 µl de revelador BCIP/NBT Sigma a temperatura ambiente hasta la aparición del color. Para detener la reacción se lavó con agua. Para guardar las muestras, las células fueron cubiertas con PBS 1x 50 % de glicerol.

INMUNIZACIÓN DE RATONES CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Ratones Balb/C hembras de 6 semanas (peso promedio 16,65 gramos) fueron inmunizados por inyección de 100 µg de plásmido disueltos en 100 µl de solución fisiológica. La inyección intramuscular se realizó en los músculos tibiales anteriores izquierdo y derecho (50 µg de ADN en cada uno) utilizando agujas 30 G. Los animales controles recibieron igual cantidad del vector no recombinante. El esquema de inmunización consistió en tres inyecciones aplicadas a intervalos de tres semanas cada una. Tanto para realizar las inmunizaciones como para la toma de electrocardiogramas y colectas de sangre, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con avertina (2,2,2,- tribromoetanol, Aldrich Chem. Co) 2 % con una dosis que variaba entre 12 a 15 µl/gr de ratón.

TOMA DE COLECTAS Y OBTENCIÓN DE LOS SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Las colectas se realizaron por incisión en la cola de los ratones y la sangre fue tomada con capilares heparinizados. Las colectas se tomaron antes de la primera inmunización (suero preinmune), tres semanas después de la primera inmunización (colecta I), tres semanas después de la segunda inmunización (colecta II) y tres semanas después de la tercera inmunización (colecta III). Para la obtención de los sueros se procedió del mismo modo que para las inmunizaciones con proteínas recombinantes.

TOMA DE ELECTROCARDIOGRAMAS

El electrocardiograma de los ratones inmunizados se realizó en los mismos tiempos en que se tomaron las colectas. Se registraron las derivaciones DI, DII, DIII, aVR, aVL y aVF (Cardimax Fx-2111, Fukuba Denshi). Como controles, se realizaron los trazados electrocardiográficos de animales inmunizados con el vector no recombinante y no inmunizados (López Bergami y col, 1997).



Fotografía mostrando una toma de electrocardiogramas a ratones

CULTIVO DE CARDIOMIOCITOS DE RATA NEONATAL

Para aproximadamente 20 - 30 placas (35 mm). Antes de comenzar con el cultivo, se gelatinizaron las placas, dispensando gelatina 0,1 % en agua como para cubrir el fondo de la placa. Se dejaron dos horas a temperatura ambiente y se aspiró la gelatina sobrante. Las placas se pusieron en la estufa a 37° C para secar.

Se preparan las siguientes soluciones que permanecieron todo el tiempo en hielo.

PBS-Glucosa 1 %: Se fraccionaron 10 ml en un Falcon® de 50 ml para colocar los corazones adentro, otros 25 ml se usaron para la solución de pipeteo y el resto fue usada para hacer los lavados.

Solución enzimática: 80 mg de tripsina, 5 mg de collagenasa y 2,5 mg de ADNasa en 50 ml de PBS 1x. Se esterilizó por filtrado con filtros Millipore® 0,22 µm.

Solución de pipeteo: 2,5 mg de ADNasa en 25 ml de PBS-glucosa 1 %, agregando 1 ml de suero fetal bovino (SFB). Toda esta mezcla se esterilizó con filtros Millipore® 0,22 µm.

DMEM F12 10% SFB: Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12® (GIBCO) disuelto en aproximadamente 900 ml de agua destilada con 3,574 g HEPES, 1,2 g Na₂CO₃, 1 g glucosa, 10 ml penicilina-streptomycin (GIBCO). Se llevó a pH: 7,2-7,4 con NaOH y se ajustó el volumen a 1 litro con 10 % suero fetal bovino inactivado por calor.

Se tomaron 5 - 6 ratas Wistar neonatas (idealmente de 1-3 días pero no de más de 5 días de edad). Se sacrificaron por decapitación, se roció el cuello con etanol 70 % y se hizo un corte en el tórax rompiendo el esternón. Con una pinza de punta curva se extrajo el corazón y se lo colocó inmediatamente en un tubo Falcon® de 50 ml con 10 ml de PBS-glucosa 1 %. Del mismo modo se procedió con las otras ratas.

Se descartó el PBS-glucosa 1 % y se pasaron los corazones a una placa de petri de vidrio de 35 mm autoclavada mantenida en hielo. Todos los procedimientos siguientes se realizaron en hielo. Se cortaron los corazones en pedazos sin desgarrar. Se tomaron cuidadosamente los pedazos de corazones con una pipeta 10 ml y se pasan a un Falcon® de 15 ml con 5 ml de PBS-glucosa 1 %. Se descartó el PBS-glucosa 1 % para hacer otro lavado y descartando el sobrenadante dejando lo menos posible de líquido.

A los pedazos de corazón se agregaron 8 ml de solución enzimática. Se tomó en la mano el Falcon® de 15 ml, para darle una temperatura aproximada de 37° C, y suavemente se agitó por inversión durante 10 min. Al terminar, el tubo se colocó en hielo. Se agregaron 4 ml de solución de pipeteo y se pipeteó muy cuidadosamente durante 2 min. para devolver las células a un medio isotónico e inactivar las enzimas.

Se dejó decantar los pedazos de tejido y se tomó el sobrenadante pasándolo a un tubo Falcon® de 15 ml limpio y se lo colocó en hielo. Al tubo con los pedazos de tejido se le agregaron nuevamente 8 ml de solución enzimática. Se agitó suavemente 8 min. y se agregaron 4 ml de solución de pipeteo. Se pipeteó 2 min. y se tomó el sobrenadante pasando a un 2^{do} tubo limpio de 15 ml. Los dos tubos con los sobrenadantes se centrifugaron en una centrífuga clínica durante 5 min. a aproximadamente 1000 g.

Con los pedazos de corazón se continuaron haciendo extracciones con solución enzimática-solución de pipeteo (aproximadamente 6 extracciones).

Se descartó el sobrenadante de las células centrifugadas y se resuspendieron ambos tubos en un volumen total de 1 ml de medio DMEM-F12 10 % SFB y se guardaron en hielo hasta plaquear.

Se contaron las células viables en una cámara de Neubauer (50 µl Trypan blue + 50 µl de suspensión celular). Se sembraron aproximadamente 1×10^5 células por placa de 35 mm colocando 1,5 ml de DMEM-F12 10 % SFB por placa y agregando los microlitros correspondientes de la suspensión celular

(previamente homogeneizada con una pipeta), se homogenizó bien y se observó al microscopio. Se incubaron a 37° C con 5 % CO₂. El medio se cambió al día siguiente.

A los 4-5 días los cardiomiocitos podían verse latiendo. Las determinaciones de incremento en cronotropismo se realizaron hasta aproximadamente 7 días luego de hecho el cultivo.

PRECIPITACIÓN DE Ig G TOTALES A PARTIR DE SUEROS CON 40 % DE SULFATO DE AMONIO

Se preparó una solución saturada de sulfato de amonio utilizando 375 g de (NH₄)₂SO₄ y se agregó agua c.s.p. 500 ml. Se disolvió la mayor parte de las sales calentando en un agitador magnético, la solución es saturada a temperatura ambiente. Para la precipitación de las Ig G se utilizó la fase acuosa.

Se centrifugó durante 5 min. a 13000 r.p.m. a temperatura ambiente el suero total. Se tomó 100 µl de suero cuidando de no tomar la capa de grasa de la superficie. Se le agregó 500 µl de PBS 1x y se lo colocó en un vórtex mientras se le agregaba 400 µl de solución saturada de (NH₄)₂SO₄ dosificados en gotas. Se dejó 20 min. a 4° C y se centrifugó durante 5 min. a temperatura ambiente a 13000 r.p.m. El precipitado se resuspendió en 100 µl de PBS 1x y dializados contra 2 litros de PBS 1x a 4° C con agitación durante 24 hs. con recambios de buffer de 2 veces. Las muestras de Ig G se guardaron a -20° C.

ENSAYO DE ACTIVIDAD FUNCIONAL DE ANTICUERPOS EN CULTIVO DE CARDIOCITOS (FRECUENCIA DE CONTRACCIÓN)

Los ensayos de anticuerpos se realizaron por duplicado. Una hora antes de realizar las determinaciones se cambió el medio DMEM-F12 10 % SFB a medio DMEM-F12 sin suero.

En las placas de 35 mm con los cultivos de cardiocitos se realizaron 10 marcas de campos en el fondo de la placa, para analizar en microscopio invertido.

Se determinó la frecuencia de contracción basal de los cardiocitos de cada campo por espacio de 15 segundos por observación directa en un microscopio invertido. Las frecuencias de contracción basal ideal deben ser de 60 a 120 latidos/min.

Se agregó a cada placa, 60 µl de la fracción de Ig G totales obtenidas por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de sueros policlonales contra la proteína MBP-GARP, o contra MBP como control negativo o de sueros de pacientes chagásicos como control positivo. Se incubaron durante 1 hora a 37° C 5% CO_2 , y se determinó la frecuencia de contracción de los cardiocitos contando los latidos durante 15 seg. en cada campo y realizando un promedio de los mismos.

Se agregó luego en forma secuencial las siguientes drogas: 1 µM de atropina (antagonista específico contra el receptor colinérgico M_2), 1 µM propanolol (antagonista específico contra receptores β_1 adrenérgicos).

En los casos en que no se observó variaciones en la frecuencia ante el agregado de los anticuerpos, se utilizó 1 µM isoproterenol (agonista receptores β_1 - β_2 adrenérgicos) como control positivo de la condición normal de los cardiocitos.

SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS PARA LA DETERMINACIÓN DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS

Se utilizaron dos vectores de levaduras capaces de replicar en bacterias:

- pBTM116 de 5681 pb, que posee un múltiple sitio de clonado detrás de gen procariota *lexA*, al cual se fusiona el gen de interés, obteniéndose así una proteína de fusión LexA-proteína de interés. La proteína LexA presenta un dominio de unión al ADN, sobre un operador *lexA*. Esta fusión está bajo un promotor de levaduras P-ADH (alcohol deshidrogenasa) y el terminador T-ADH. Este plásmido además posee el gen *TRP1*, que permite a las levaduras que fueron transformadas crecer en un medio mínimo carente de triptofano.

También presenta un sitio de replicación en levaduras 2μ y en bacterias ColE1, y el gen de la β -lactamasa que le otorga resistencia a ampicilina en *E. coli*.

- pVP16 de 8100 pb, que contiene el dominio de activación ácido VP16 (proteína de herpes simples virus), expresado bajo el promotor *ADH1*, seguido por un múltiple sitio de clonado que fusiona el gen de interés a la proteína VP16. Río arriba de la región codificante para PV16 esta la secuencia de localización nuclear del antígeno "large T" del virus simio 40 (SV40). Además el plásmido contiene el gen *leu2*, el cual permite a las levaduras que contienen este plásmido crecer en ausencia de leucina; posee también el origen de replicación 2μ y un origen bacteriano de replicación ColE1, así como también el gen de resistencia a ampicilina para su selección en procariotas.

COTRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

Se inoculó una colonia de levadura en 10 ml de YPD y se creció durante toda la noche a 30° C. Se hizo una dilución del cultivo en YPD hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,5$ y se creció durante 2 a 4 horas a 30° C. Se centrifugó durante 5 min. a 2500 r.p.m., se lavaron con 40 ml de TE o agua y se centrifugaron nuevamente en iguales condiciones. Las células se resuspendieron en 2 ml de solución LiAcTE y se dejaron durante 1 hora a 30° C con agitación. Se separaron en tubos Eppendorf 100 μ l de las levaduras resuspendidas y se le agregaron 600 μ l de solución LiAcTE-PEG, 5 μ l de ADN de espermatozoos de salmón y 3 μ l de cada plásmido. Se incubaron 30 min. a 30° C y luego fueron sometidas a un shock térmico a 42° C durante 15 min. Se lavaron las células con 1 ml de TE o agua o YPD y se centrifugó durante 5 min. a 2500 r.p.m. Se resuspendieron las células en 150 μ l de TE y se sembraron en medio selectivo (THULL y TUL).

DETECCIÓN DE INTERACCIÓN EN DOBLE HÍBRIDO CON X-GAL

Las levaduras cotransformadas con las diferentes combinaciones de los plásmidos pBTM116 y pVP16 fueron crecidas en el medio de selección THULL a 30° C durante 2 ó 3 días.

Las colonias de levadura obtenidas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Las membranas se colocaron con las colonias hacia arriba sobre un soporte de aluminio que flotaba sobre nitrógeno líquido durante 30 seg. y luego se sumergieron por 5 seg. Los filtros se colocaron de igual manera sobre papel Whatman® 3MM hasta que se descongelaron a temperatura ambiente, y se colocaron dentro de una caja de Petri de 90 mm sobre papel Whatman® 3MM humedecido con buffer Z y 62,5 µl de X-gal 0,02 %. La caja se tapó y se colocó a 30° C durante 30 min. a 1 hora.

Resultados

Obtención del EST y del gen completo

Con el objeto de encontrar proteínas de *Trypanosoma cruzi* capaces de generar los anticuerpos que dan reacción cruzada con los receptores muscarínicos M₂, se rastreó una biblioteca de expresión en fagos λ gt11 de tripomastigotes con sueros de pacientes con y sin la enfermedad de Chagas con altos niveles de anticuerpos anti M₂ encontrándose sólo antígenos ya caracterizados tales como proteínas ribosomales P (Levin y col., 1989) o la HSP 70 (Levy-Yeyati y col., 1991) de *T. cruzi*, por lo cual se decidió que éste no era un buen método para encontrar proteínas que podían dar reacción cruzada contra los receptores muscarínicos M₂.

Dado que muchos de los epítopes de proteínas parasitarias que tienen reacción cruzada con secuencias presentes en el 2^{do} bucle extracelular de los receptores β_1 adrenérgico y M₂ muscarínico (AESDE y EDGE respectivamente) presentan residuos aminoácidos ácidos, decidimos realizar búsquedas de secuencias de ADN que codificaran para regiones de aminoácidos ácidos en bases de datos de ESTs (expressed sequence tags). De las búsquedas, se encontró un EST generado por el Proyecto Genoma de *Trypanosoma cruzi*. El mismo tenía 718 pb y poseía grandes porciones de residuos de ácido glutámico y aspártico. Este EST presentaba identidad con nucleolina, una proteína nuclear que participa en el ensamblaje de los ribosomas. Además de poseer regiones ricas en aminoácidos ácidos, la nucleolina resultaba una proteína interesante para este proyecto ya que había sido definida como autoantígeno en la enfermedad de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Minota y col., 1991). Si la nucleolina de *T. cruzi* hubiese sido antigénica en la infección chagásica, nos encontrábamos ante una situación semejante a la descrita en detalle para la proteína ribosomal P del parásito TcP2 β , cuyo extremo C-terminal (R13) es un epítipo inmunodominante en la enfermedad de Chagas crónica y reconocido también por sueros de pacientes lúpicos (Levitus G. y col. 1991, Kaplan D. y col. 1997). Por tal motivo nos propusimos caracterizar con profundidad este EST.

Este EST había sido informado por el laboratorio del Dr. Antonio González Aguilar del Instituto de Parasitología y Biomedicina de Granada, España. El mismo había sido obtenido por RT-PCR con oligonucleótidos al azar y un oligonucleótido específico que se apareaba con la secuencia del *spliced leader*. El EST fue subclonado en el vector para productos de PCR pGEM-T y secuenciado. Dicha secuencia reveló que para su amplificación el oligonucleótido complementario al *spliced leader* no había apareado y que sólo el otro oligonucleótido lo había hecho en ambas cadenas. Por lo tanto no presentaba la región 5' terminal del gen.

En nuestro laboratorio se subclonó en los vectores de expresión pMAL-c2 y pGEX-4T1. A pesar de que las secuencias de los plásmidos recombinantes eran las esperadas, la expresión de las proteínas de fusión fue nula.

Para encontrar el gen completo se rastreó con sondas radiactivas realizadas a partir del EST una biblioteca genómica de cósmidos de la cepa CL Brener de *T. cruzi* ordenada en filtros de nylon y cedida por el laboratorio del Dr. J. D. Hoheisel en Suecia (Hanke y col., 1996). En el filtro 5A se encontró una señal positiva correspondiente al clon 3L11. Liberando el inserto con enzimas de restricción se determinó que su tamaño correspondía a aproximadamente 38 Kpb. Se purificó a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se cortó el inserto con la enzima de restricción Sac II y se subclonó en plásmidos pGEM-5Zf+ para su posterior secuenciación. Con el EST se realizó una sonda radiactiva (sonda 1) que fueron hibridadas con membranas de nylon Hybond N+ a las cuales se transfirieron los distintos plásmidos recombinantes para así ubicar cuales lo contenían. Dos plásmidos resultaron positivos, uno con un inserto de aproximadamente 2000 pb y el otro de 5000 pb, ambos insertos fueron secuenciados completamente. En el plásmido de 5000 pb, siguiendo el marco de lectura del EST, se encontró un codón de terminación TGA. Pero en la secuencia completa del plásmido de 2000 pb no pudo observarse el codón de iniciación.

Estudiando el mapa de restricción de este fragmento secuenciado, se encontró un sitio Pst I. De este modo se realizaron cortes en el fragmento de 38 Kpb del cósmido con esta enzima y se subclonaron los productos de dicha digestión en el vector pGEM-3Zf+. Se transfirieron la colección de plásmidos obtenida a una membrana de nylon y fueron hibridadas con una sonda radiactiva (sonda 2) realizada con el fragmento de 115 pb resultante del corte con las enzimas Sac II y PstI del inserto clonado en el plásmido pGEM-5Zf+ de 2000 pb ya secuenciado (Fig. 1).

Al obtener la secuencia completa de este nuevo inserto se pudo encontrar el codón de iniciación del marco de lectura abierto derivado del EST de 718 pb. De este modo se pudo secuenciar el gen completo de 3500 pb.

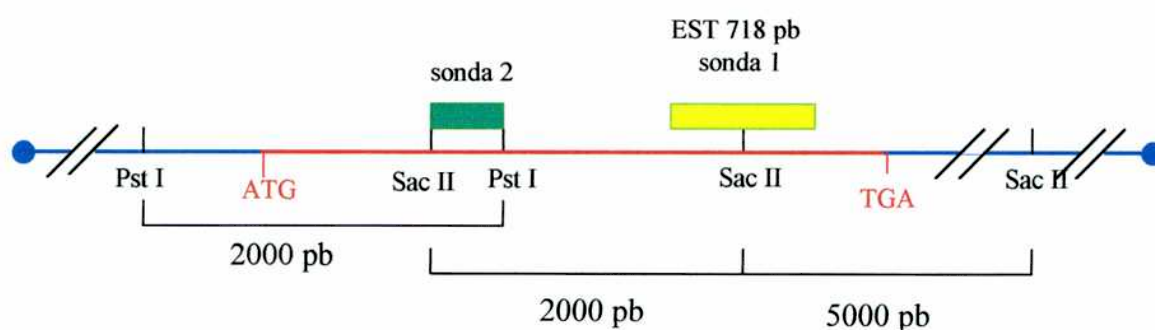


Figura 1: Disposición del gen *garp* en el cósmido 3L11

La comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida no presentó identidad con ninguna secuencia almacenada en los bancos de datos disponibles. La identidad con nucleolina era debida a las regiones ricas en residuos de ácido glutámico y aspártico y no en otras regiones, lo mismo ocurrió con otras proteínas ricas en aminoácidos ácidos. Debido a que poseía alto contenido en residuos de ácido glutámico decidimos denominar este gen como *garp* (glutamic acid rich protein) (Fig. 2).

```

1   CT GCA GCT GCA TTA TTT CTA CCG CAA CGA GAG GTG GCG TCT AAC ACA
48  CCC TTG TGG TAG GAG ACA TGA TGA TGA CAG AAA TAA GGA GGG AGG ATG
96  TGG GCC TTT CCC TAA GGG AAA AAG AGA AGG AAA TAT TTT GTC TCT TAG
144 CAA AAT TCC CTT TTC TAT TGT TGT TAT TTG CGT AAT TAT TCC CAT TTG
192 CGT TGA TTC ACG CCT GTG CAT CAA CGA TAA ACA CGT GTT GAA GAC TCC
240 CAC AGT GAC GTG ACT GAA TGA AAA TCT TTA ATA ATA ACA AAA AAG GAG
288 TCT TGT GGC ATG CGC CTG TTG GTC GTC ACA TTG GAT TGC CGC GTT GAG
336 TCT CCT TGT TTA TTT CTT TTT TCC TTT TTT TTT GTT TGT TTT TTT TTG
384 TTT GTT TGT TTC TTT GCT TNT TTG CTT CGT GTG GCA GTG GGG AGT AAC
432 GGG AAG AAG AGA GTA CTG GGG AGA AGG CAA AGA GCG TGT GTG CGT GTG
480 TGT GAC TCC ACG GAA CAC TGT GCC ACA CCC ACC AAA GAA AAC AAC GCA
528 AGG AAA CAT CAT TAA CGA AGT CTG TGG GGG GGG GGA AGC AAT TGG GTG
576 GGT TCA TTG CCC CGG CAA ATA GAA CAC ATA GAG TCC ACT TCG GAA GAA
624 GGG AAG AGG GAA AAC AAG GAA AAA GAA ACA AAA CAA GTG TAG TTT TGT
672 CTC CCG TGA AGG GAA TAA ATG CTG CGC CGA CGT ATC ACG GTC GGT TTT
1   M L R R R I T V G F
720 GTA CCG CAA ACT ACT TTT ACA AGT GGT GTC GTG GCA GCC ACG TGG AGT
11  V P Q T T F T S G V V A A T W S
768 CAT GCA ACT TAC AGC ACA GAT GCC ATT GGT ACA TTC AAA CCG CTG CCC
27  H A T Y S T D A I G T F K P L P
816 ACA TCC TTC AGA CGT ATC GGA GCT TCT TGT CGA TAT GCC GCG GGA TCT
43  T S F R R I G A S C R Y A A G S
864 CAC ACG GGG CTG TAC GTT GGC AGC CGA GCA CAG TCC ACC TCG ACG CCG
59  H T G L Y V G S R A Q S T S T P
912 TCG CTG TGT ACA TTA ACC ACA CGC CCA CTT CCC GCC TCT CCG CAC CAG
75  S L C T L T T R P L P A S P H Q
960 TGC TCC ATT GAA AAA GTT TTG CTC CCG AGC GTG CAG GCA AGT GGG AGT
91  C S I E K V L L P S V Q A S G S
1008 GGC ATT CGC ACG GAC ACA CTG CGG GGC ATG GTG CAG CTG CTG TTA GAC
107  G I R T D T L R G M V Q L L L D
1056 CCT GAC GCA ACT GAC GTG GAG GAT GTC TTC ATG CTG GAC TTT GTC GTT
123  P D A T D V E D V F M L D F V V
1104 ATG GTC CCT AAG CGA CAG ATG GCG GCA TTG CAT GGC CGA AAG GAG TGG
139  M V P K R Q M A A L H G R K E W
1152 CTG GAT GTG GTG CTG AGT TCG GAA CGG TAT CAG GCA TGC AAA GAC GAA
155  L D V V L S S E R Y Q A C K D E
1200 AGT GTG TTG CGA CTG GCG GGG ATT ACA ACT GTC GGC CGC TGG GAT GAA
171  S V L R L A G I T T V G R W D E
1248 AAC CGC GAG CGT GTA CCC ATA TCC GCC TAT TCC CGT GGT ATT CTT GAA
187  N R E R V P I S A Y S R G I L E
1296 GAG GCG TAC GCG GCA ATG GCA CGA CAA CCC GTG GAG TCA CAA AAA AAT
203  E A Y A A M A R Q P V E S Q K N
1344 CAG GTC ATC ACG TGG CTG ACG AAG ACG ATA CAA AAG GCC GTC ATT GAG
219  Q V I T W L T K T I Q K A V I E
1392 GAG TTT GCA GCG AAT AAA AGC AAC CGG CAA TTT CTT GCC CCA CTC ATT
235  E F A A N K S N R Q F L A P L I
1440 ACG GGT ATG CAG GCA CTG CCA GAG ACT GCG GAT GCC GCA TCC AAC GCC
251  T G M Q A L P E T A D A A S N A
1488 GCC AAC GCC GCG GCG ATG AAG GAG GGA GAC GAG ACG TAT CCA CAA GGC
267  A N A A A M K E G D E T Y P Q G
1536 GAG GCG GAC GTT CCG AGG AAG AAG CGC GCT GAG GAT GCA GCC GCT GAG
283  E A D V P R K K R A E D A A A E
1584 GAT GGG AAT GGA GGT AAC AAC ACT GCC AAG CCG AAC AAA CCT GCG AGA
299  D G N G G N N T A K P N K P A R
1632 GTT CGC GGA AGA AAA CAC GCC AAA CAC CCT GAG CCT GTG GAG GAG GTG
315  V R G R K H A K H P E P V E E V
1680 ACA GAA CAC GCA GGA GAC GGC GCT GCA AAA TCC GCT GCG TCG GCC ACA
331  T E H A G D G A A K S A A S A T

```

```

1728 TCC ACA ACC GAA GAT GTC AAG AAG AAT GAC AAG CCC CAC TCC GTT TCC
347 S T T E D V K K N D K P H S V S
1776 CCT GCC GCT GCC ACT GAT GAT GAC GAG GAC GCT GAG ATT GCA AGG CTG
363 P A A A T D D D E D A E I A R L
1824 CTG CAA GAA ACG GAA CAG GAG TTT GCC CCG GCA CCG TAC ATA CGC GGC
379 L Q E T E Q E F A P A P Y I R G
1872 AGT ATT CAC AGC AAA GGC GCA TCA GAA GGT TCC GCG GCA GCA TCA ACA
395 S I H S K G A S E G S A A A S T
1920 TCA CCA CCA CAA ATA TCG ACA GCA ACA ACT TCG GTG GCG ACG GCC
411 S P P Q I S T A A T T S V A T A
1968 AGG GCA GAA GCC GAG GAT GTG AAG CCT TCC AAG TTG AAG AAA AAG AAG
427 R A E A E D V K P S K L K K K K
2016 TCT GCA GAC GCT GCG AAC AAG TTG GCC GAG CCT GAA CAC CAC AAC CAG
443 S A D A A N K L A E P E H H N Q
2064 CAG CAG GAA GAA AAC GCG ACC GCT GTG ACG GAC GCC GGA AAG ACA TTG
459 Q Q E E N A T A V T D A G K T L
2112 CCT GAT TCA AAG CAA AAC AAA TCC CTA GCA CGT CTT GCA GAG CTG ATG
475 P D S K Q N K S L A R L A E L M
2160 CTA ATT CAG TTC AAT AGC GCC GAT GGA TAC CTT CAT CTT CCC GAC ATT
491 L I Q F N S A D G Y L H L P D I
2208 AAA GAC GAT GAA AAA AAG GGA TTT GTC ATT GCT CTA GAT GGT GAT AGT
507 K D D E K K G F V I A L D G D S
2256 GCG CAA GTG GAC CCA TTT GCG CTG TAC AGT ACA TTT GGT GCG GCC AAA
523 A Q V D P F A L Y S T F G A A K
2304 CTG GCA GGC GGC GAA TCC CCA GCG ATC ACG GCG TTG TAT CAG GTG TGG
539 L A G G E S P A I T A L Y Q V W
2352 TCT GCA TAC AGC GCC TAC ACG GAA GCG CAT GAA GCC GCT GAA GAT GAT
555 S A Y S A Y T E A H E A A E D D
2400 GCC ACA GCG AAG TTT TTC AAG GAA AAG GGT GTG GAA GCA TTA GTG CAT
571 A T A K F F K E K G V E A L V H
2448 GGC GCT GTC TTG CTT CGC GCC ATC TCG CGT GAG CAA GCA GTC ACA CTG
587 G A V L L R A I S R E Q A V T L
2496 GAG CCG CAA GAT ATT CCA GCG TAC GGT TTT CCT TTG CTT TCC TCC GAC
603 E P Q D I P A Y G F P L L S S D
2544 CGT CGG CCA CAT CGC ACG CGG CGC AGT AAA GTT GCA ACG GAC ATG ACA
619 R R P H R T R R S K V A T D M T
2592 GCA GAA AAA GTT GCC GAT GCC GTC AAG GCT TAC ACG GCG TTC TTC TCT
635 A E K V A D A V K A Y T A F F S
2640 ACC AAA GGC AAG AAG TTC ACT CCA ATT CGC CCA ACC ATC GAT TAC AAC
651 T K G K K F T P I R P T I D Y N
2688 TCC GGG TGT AGT GTG GCG GCG TTG ATG GGC ACA ACT CTG CAC TTA TAT
667 S G C S V A A L M G T T L H L Y
2736 GAA ACT TCC CTG AAA GAG ACG GTA CGA GAG GAA GAC ATT CGC TGC CGC
683 E T S L K E T V R E E D I R C R
2784 TTT GGC GAG GCG ATG CTC GGT GTT TTG CAT GTG GTG GAA AAG AAA GTT
699 F G E A M L G V L H V V E K K V
2832 ATG ACG CGC ATT AAT GTC GTG CAC TAT CAC ATT CTT GCC ACA TCT ATC
715 M T R I N V V H Y H I L A T S I
2880 AGT GGG GGG AGT GGT GGA TCA AAC AGC ATG GAG AGC ATG ACA ACC TCC
731 S G G S G G S N S M E S M T T S
2928 ATT GTT AGC ATT GAC ATT ACT GGT TCC TTT ACA ACA GCA GAG AAG ACG
747 I V S I D I T G S F T T A E K T
2976 CGT CTA CTA CAA CTT GCG GAG CCA CTC GGT ATG GCA GGC GCC ATC GCC
763 R L L Q L A E P L G M A G A I A
3024 GAC TGC ACG TGT GTC TCG GAT ATC GTA GAC AGC ATT GAG GCT CTC GGT
779 D C T C V S D I V D S I E A L G
3072 GTC TCG GTG GTG CAC GAC ATA TTG ACC AAC CGC GAC GAT CTG GAA GCG
795 V S V V H D I L T N R D D L E A

```

```

3120 CTT CTC ACA CCC ACA CTT GTG CAG CTA TTG CCA GAA GCG GAG GAG GAG
811 L L T P T L V Q L L P E A E E E
3168 GAG GAG GAA GAA GAA GAA GAA GCT GAG AAA CAG CCT TCC ACA AGA CGC
827 E E E E E E E A E K Q P S T R R
3216 ACG TCT GCA GCG GCC TCC ACC CCC GCA AAG GAC GCA TCC TCT AAG TCC
843 T S A A A S T P A K D A S S K S
3264 GGT AGC CAC AGC AGC CAT GCA GCC GCA GGT GTA AAG GCG GCA GCT ACC
859 G S H S S H A A A G V K A A A T
3312 GCA GCG GAG GAC GAC GAT GAT GAC GAG GAA GAG GAG GAA GAA GAG GCT
875 A A E D D D D E E E E E E A
3360 GAT GGT GTT GAT GCC GTG GGC GAG GAA GCG GCG GAA GAA GAA GAA AAT
891 D G V D A V G E E A A E E E E N
3408 GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAA GAA GAA GTC AAG CCT GCG AGG GGT GGA
907 E E E E E E E E E E V K P A R G G
3456 AAA CAG AAG AGC GCT GCT GCA AAG CAC AAG ACC GAC ACC GTT AAT GAG
923 K Q K S A A A K H K T D T V N E
3504 GAT GAA GAA AAT GAA GAG GTG GAG GAA GAG GAA GAG GAG GAG GAG GAA
939 D E E N E E V E E E E E E E E
3552 GAT GAA GAA CAA AAG GCG GGT AAT GGA GAA GAG GAA GAT GAT GAG GAA
955 D E E Q K A G N G E E E D D E E
3600 CAA GAA GAA GAA GAA GAG GCA CCA CGT GAG CCT CCC ACA ATC AGT GGC
971 Q E E E E E A P R E P P T I S G
3648 AAC AGC AGG CGA CAC TCC TCG CCG GCT CCT GTG AAG GGA CGC TCA GCC
987 N S R R H S S P A P V K G R S A
3696 CGG GGC CGT GCG CAT CCT GCG GAG GAC GCG AAG AAA ATG AGG GAG AAG
1003 R G R A H P A E D A K K M R E K
3744 GAC GAG GAA TAT GAT GGC GAG GGT GAC GGC GAT GAG CCA CCG CGG CAA
1019 D E E Y D G E G D G D E P P R Q
3792 CAT GTG CAG CAC GTG CAG CAG CGG GCC CCT CCG TTG AGG AAG ACG AGT
1035 H V Q H V Q Q R A P P L R K T S
3840 CAT GCT GGC AAA CGT GCA CCG CCA CCT CCT CCT CCA GCG GCC TCC GGA
1051 H A G K R A P P P P P P A A S G
3888 GAC GAC AAT GAC GAT GAC GAT GAT GCT TCG GAC GCC GAC GAC AAC AAG
1067 D D N D D D D D A S D A D D N K
3936 GAA GAA GAG GTA CAC GCA CAA CCA CAA TCA CAG CAG CAC ACG GCA GTA
1083 E E E V H A Q P Q S Q Q H T A V
3984 TCG AAG AAA GGA CAT GCG ACG AAG AAA TCA CCA CCG CCG CCA CCA TCT
1099 S K K G H A T K K S P P P P P S
4032 ACA GCC GTC ACA GAT AAT GAT GAA GAC GAG GAA GAA GAA GAA GTC GTC
1115 T A V T D N D E D E E E E E V V
4080 CGG CGA CCG ACG AAG AAA GGG GTA AGT TCA AAG CGC GCA CCA CCG CCG
1131 R R P T K K G V S S K R A P P P
4128 CCG GTC GCG GCA CAA AAC GAT GAT TCC AAG GAG GAG GAG GAA GAA GTT
1147 P V A A Q N D D S K E E E E E V
4176 GTT GTG GCA CCG CGT GTA CGT AAT CGT GGC CGA CGT ATG GGC CGT GCC
1163 V V A P R V R N R G R R M G R A
4224 CTT CCC CAA TCT TCC AGC GAT TCC AAT GAC GAA GAC CGT TGG TTT CAA
1179 L P Q S S S D S N D E D R W F Q
4272 AGA GCA AGG CGT TGA GGT GGA GGA GAC TGT TGC TGG TGT GTT TCT CTC
1195 R A R R *
4320 CAC GGT ATT TCC ATG GCT GAG AAT CAA TCT GTG AGC CTA TGC ATA TTA
4368 TTA TGA TAT GTG TCT GGC TCT CCC TCT CTC TGT GTG TTT TCG TGC GTG
4416 GAA GGA TAA TTG TGA ATA TAG ACC ATA GAT TAA AGG GGA GGG GGA AAG
4464 GGA GCA AAA AGG GCA CAA CTG ACA CAT ACA CAA ACA CAA AAA TAT ATA
4512 TAT ATA TAT ATG GGA GGA GGG CAA AGA AAT GTT GGG AAG GTG ACA AAA
4560 AAG AAC TTT TCT CCA TAC ATT TCA AGA AGG CGT TAT TAG CGG ATT ATT
4608 GGG AAA ACT TGT TTG CTT GTT TGT TTG TGT GTC TGG GAG GTC GTT GTG
4656 TAA TAA CGT GAA TTT TCA AAG CTT CTG AGT GGC ATC ATA CAA AAG CCC

```

```

4704  GTA  CGT  GTG  TGG  GCT  TTG  GTT  CTC  CTC  CTC  CCT  CAC  AAC  TCA  TAT  TTA
4752  TGA  TGA  TAC  ATA  TTT  TTT  TTA  TAT  TTT  TTT  GTT  TTT  ATT  TGT  GTG  TTG
4800  CCG  ACC  CTT  TTG  ATG  GAA  CGC  GTT  GTT  GCC  GGC  TGC  ATG  CAT  CAC  ATA
4848  GAA  TTG  AAC  GAA

```

Figura 2: Región genómica del cósmido secuenciada que contiene a *garp*

Se indican el sitio aceptor de *trans*-splicing (AG recuadrado), ATG de iniciación y el codón terminador (en azul). En rojo se indica el EST de 718 pb. En negritas se resalta las regiones de secuencias aminoacídicas ácidas.

Caracterización genética de *garp*

Para estudiar la transcripción de este gen se realizó un Northern blot con ARN total de *T. cruzi* y una sonda radiactiva correspondiente al gen *garp* (Fig. 3). La exposición de la membrana reveló una única banda que se estimó en 4000 bases.

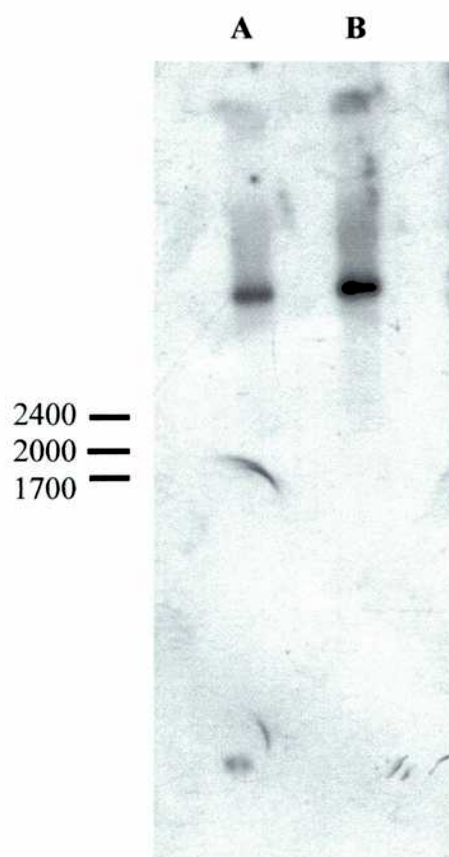


Figura 3: Northern blot con ARN total de *T. cruzi* hibridado con una sonda radiactiva del gen *garp*

Calles A y B: 5 y 10 µg de ARN total respectivamente. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los ARN ribosomales de *T. cruzi* de 2400, 2000 y 1700 nucleótidos.

Para determinar el sitio de *trans*-splicing de este gen en el cual se inserta el *spliced leader* en el extremo 5', se realizó transcripción reversa sobre ARN total de *T. cruzi* y luego reacciones de PCR con 2 oligonucleótidos internos al gen (*garp11* y *garp12*) y un oligonucleótido LSSL, conteniendo a las 17 pb iniciales del *spliced leader* de *T. cruzi*. (Fig. 4). Los oligonucleótidos *garp11* y *garp12* estaban separados por 490 pb, de modo que los productos obtenidos en cada reacción de PCR debían diferir en esa cantidad de nucleótidos. En efecto, en la reacción en la cual se usó *garp11* se obtuvo una única banda de aproximadamente 900 pb, y en la realizada con el *garp 12* se obtuvieron tres, una de las cuales era de 400 pb (Fig. 5). Otras bandas observadas en la calle 2 no fueron tenidas en cuenta.

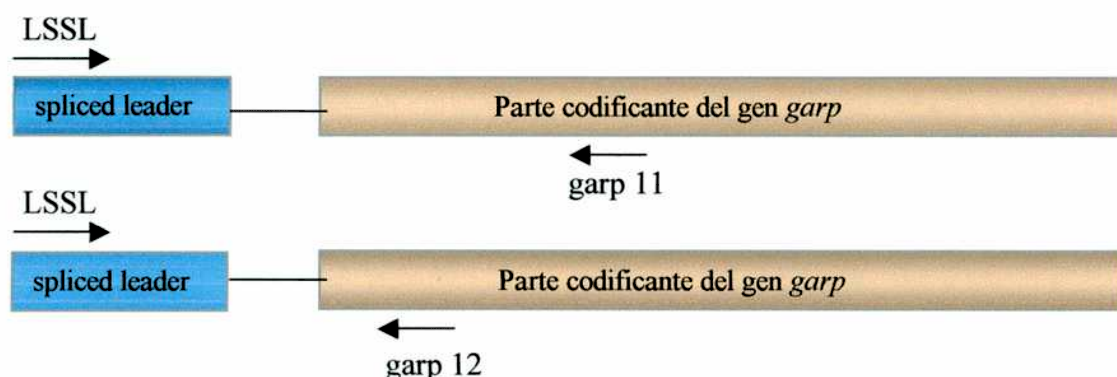


Figura 4: Esquema que muestra la ubicación de los oligonucleótidos en la reacción de PCR para la determinación del sitio de *trans*-splicing

La banda de 900 pb fue purificada de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y subclonada en un plásmido pGEM-T. La secuencia de este inserto permitió localizar el sitio aceptor de *trans*-splicing, el cual está determinado por dos nucleótidos AG luego de una secuencia de pirimidinas. Clásicamente el sitio aceptor AG es el primero luego de las pirimidinas, pero en este caso resultó ser el tercero (Fig. 2). La región 5' no codificante resultó tener 293 pb (incluyendo al *spliced leader*).

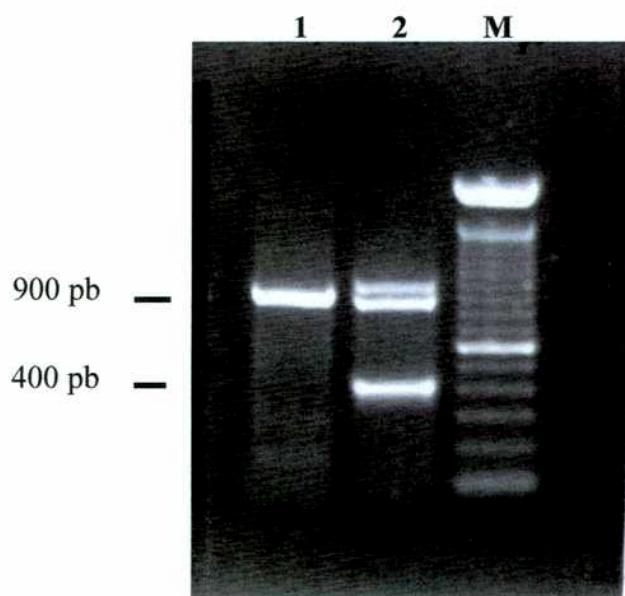


Figura 5: Electroforesis de los productos de RT-PCR:

- 1: producto de PCR con oligonucleótido LSSL y *garp* 11.
- 2: producto de PCR con oligonucleótido LSSL y *garp* 12.
- M: marcado de peso molecular 100 pb ladder (Promega)

Para determinar el número de copias y diferencias entre alelos del gen *garp* dentro del genoma de *T. cruzi*, se realizaron ensayos de Southern blot a partir de ADN total de *T. cruzi* de la cepa CL Brener digerido con enzimas de restricción. Se corrieron dichas digestiones en un gel de agarosa que fue transferido a una membrana de nylon Hybond N⁺ e hibridado con una sonda radiactiva del gen *garp*. Se utilizaron enzimas que por secuencia se sabía que cortaban dentro del inserto para observar las posibles diferencias entre alelos de *garp* y otras que lo hacían en las regiones flanqueantes al gen (Fig. 6).

Entre los fragmentos obtenidos por cortes con la enzima de restricción *Ava* I se encontró un fragmento esperado de 2700 pb así como también otros dos de aproximadamente 1800 y 6000 pb. Con la enzima *Nci* I se observaron los 3 fragmentos esperados de aproximadamente 900, 1000 y 1300 pb. También se observó una banda suave de aproximadamente 3700 pb y una bien definida de 4000 pb. Para los cortes realizados con la enzima *Pst* I se observaron dos

bandas esperadas de 1200 y 2000 pb, y una banda no prevista por la secuencia del gen de 1000 pb, además de dos bandas de aproximadamente 3300 y 4000 pb.

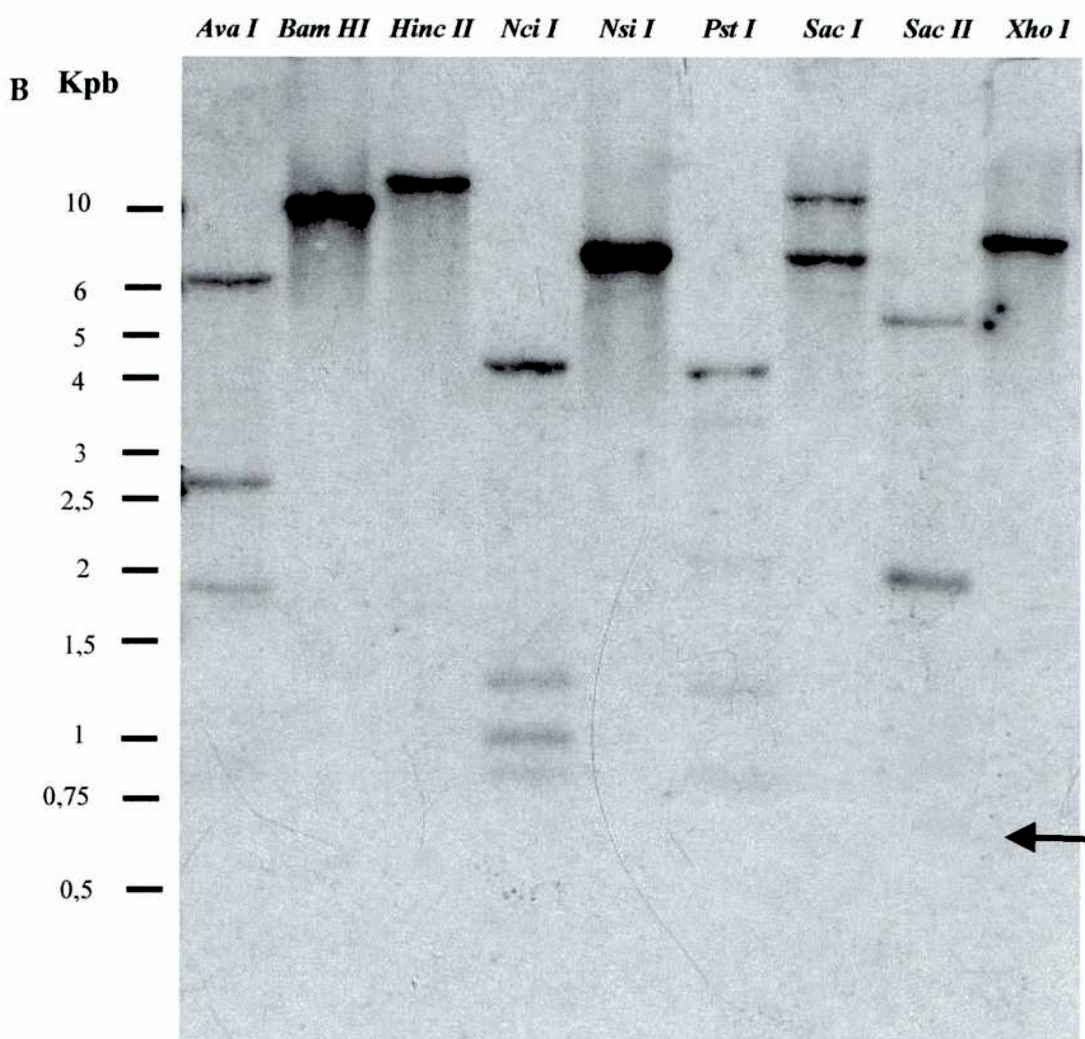
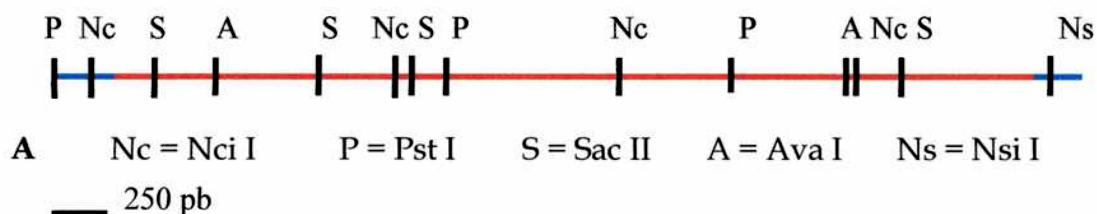


Figura 6: Esquema del mapa de restricción del gen *garp* y Southern blot revelado con una sonda radiactiva realizada con el gen completo.

A Mapa de restricción del gen *garp*, en rojo región que codifica para el gen, en azul regiones no codificantes.

B Southern blot revelado con el gen *garp* completo. La flecha negra señala una banda de 650 pb observada débilmente en la autoradiografía.

Por la digestión de Sac II se observan dos bandas que corresponden con el mapa de restricción del gen, una muy suave de aproximadamente 650 pb y una bien definida de 1900 pb. También aparece una banda muy suave de aproximadamente 3000 pb y una de 5000 pb, ésta última corresponde al C-terminal del gen (correspondiendo con el fragmento de 5000 pb subclonado a partir del inserto del cósmido 3L11 digerido con Sac II). No se observó la banda de 400 pb revelada por el mapa de restricción, esto probablemente se deba a la baja representatividad de este fragmento en la sonda, ya que la misma fue hecha con el gen completo de 3500 pb representando así poco más del 10 % de la misma.

Estos resultados nos estarían mostrando que este gen es de copia única y que las bandas encontradas en las digestiones con enzimas con sitios externos al gen, podrían deberse a las diferencias entre los dos alelos del gen *garp*.

Para determinar en qué cromosomas mapea el gen *garp*, se corrieron electroforesis de campos pulsados en geles de agarosa para separar los cromosomas de *T. cruzi*. Luego se transfirieron a membranas de nylon Hybond N⁺ y fueron hibridadas con una sonda radiactiva realizada con el gen *garp* completo o con una sonda realizada con secuencias teloméricas. Se observaron dos bandas en la hibridación con el gen *garp*, una de aproximadamente 0,7 Mpb y otra de 1,1 Mpb (Fig. 7).

Con la sonda realizada con secuencias teloméricas se pudo observar el patrón de cromosomas del parásito.

Con estos resultados y los del Southern blot podemos inferir que si bien el gen es de copia única los alelos del mismo se encuentran en cromosomas homólogos de tamaños diferentes.

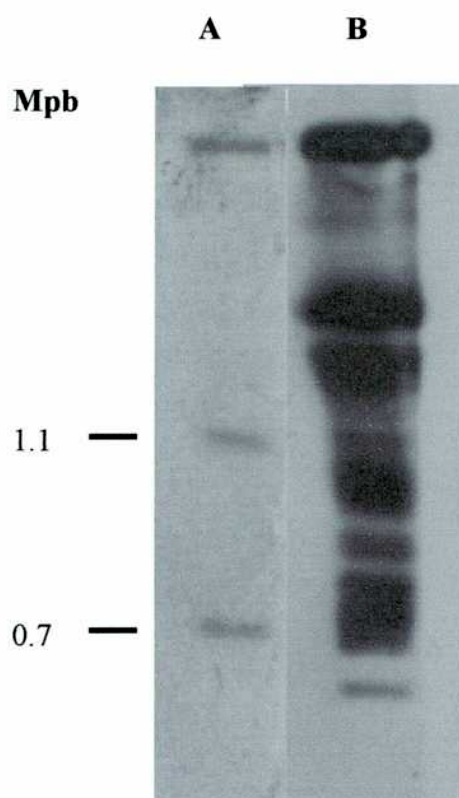


Figura 7: Electroforesis de campos pulsados de ADN de *Trypanosoma cruzi*
A cromoblot revelado con una sonda radiactiva realizada con el gen *garp*
B cromoblot revelado con una sonda radiactiva realizada con secuencias teloméricas

Análisis de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen *garp*

Los últimos análisis de la secuencia nucleotídica realizados contra los bancos de datos disponibles revelaron alta identidad con secuencias almacenadas en dbGSS (genome survey sequences), el cual contiene secuencias obtenidas a partir de los extremos de los insertos genómicos presentes en YACs, BACs o cósmidos, o de lecturas preliminares de secuencias genómicas al azar, entre otras. La búsqueda de homología utilizando el programa BLASTP, en la cual la secuencia nucleotídica de *garp* es traducida en los 6 marcos de lectura posibles y comparada con los 6 marcos de lectura obtenidos de todas las secuencias almacenadas en el dbGSS, reveló una identidad de hasta un 72 % con secuencias

aminoacídicas obtenidas a partir de fragmentos nucleotídicos de aproximadamente 600 pb con secuencias de *Trypanosoma brucei* (Fig. 8).

gb | AQ656447.1 | AQ656447 Sheared DNA-9M3.TR
Sheared DNA *Trypanosoma brucei* genomic clone **Sheared DNA-9M3.**
 Length = 591

Score = 272 bits (688), Expect = 2e-71

Identities = 135/189 (71%), Positives = 161/189 (84%), Gaps = 2/189 (1%)

Frame = +3

Query: 645 YTAFFSTKGKKFTPIRPTIDYNSGCSVAALMGTTLHLYETSLKETVREEDIRCRFGEAML 704
 +TAFF+ K +FTPIRP ID+NSGCSV ALMGTTLHLYETSLK +VREEDIRCRF EAML
 Sbjct: 3 FTAFFANKKCRFTPIRPAIDFNSGCSVVALMGTTLHLYETSLKSSVREEDIRCRFAEAML 182

Query: 705 GVLHVVEKKVMTRINVVHYHILATSISGGSG--GSNSMESMTTSIVSIDITGSFTTAEKT 762
 GVLHV+++++TR+NVVHYHILATSISGGSG + +M + TSIVSID G F+ AEK
 Sbjct: 183 GVLHVLDDQILTRNVVHYHILATSISGGSGTNRATAMSNANTSIVSIDTEGPFVSVAEKK 362

Query: 763 RLLQLAEPLGMAGAIADCTCVSDIVDSIEALGVSVVHDILTNRDDLEALLTPTLVQLLPE 822
 RL QLAEPLG+A AIA C VS +V++IE VSVVHDILTNRDDLEALLTPTLVQLLPE
 Sbjct: 363 RLYQLAEPLGLANAIAQCESVSSLVEAIEEFDVSVVHDILTNRDDLEALLTPTLVQLLPE 542

Query: 823 AEEEEEEEEEE 833

A++++ +E E

Sbjct: 543 ADDDDDFDEME 575

gb | AQ638873.1 | AQ638873 927P1-8A3.TV 927P1
***Trypanosoma brucei* genomic clone 927P1-8A3.**
 Length = 439

Score = 213 bits (536), Expect = 1e-53

Identities = 103/142 (72%), Positives = 121/142 (84%)

Frame = -1

Query: 569 DDATAKFFKEKGVEALVHGAVLLRAISREQAVTLEPQDIPAYGFPLLSSDRRPHRTRRSK 628
 D A+ +F+KEKGVEAL+H AVLLR ISR VT++ +D+P +GFPLLSSDRRP+R+RR K
 Sbjct: 427 DVASVRFYKEKGVEALIHAAVLLRTISRGHVPVTVDRDVPFPGFPLLSSDRRPYRSRRGK 248

Query: 629 VATDMTAEKVADAVKAYTAFFSTKGKKFTPIRPTIDYNSGCSVAALMGTTLHLYETSLKE 688
 TDMTAEKV +AVKA+TAFF+ K +FTPIRP ID+NSGCSV ALMGTTLHLYETSLK
 Sbjct: 247 NVTDMTAEKVDEAVKAFTAFFANKKCRFTPIRPAIDFNSGCSVVALMGTTLHLYETSLKS 68

Query: 689 TVREEDIRCRFGEAMLGVLHV 710

+VREEDIRCRF EAMLGVL V+

Sbjct: 67 SVREEDIRCRFAEAMLGVLQVL 2

Figura 8 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a *garp* con secuencias almacenadas en dbGSS (genome survey sequences)

En menor grado, la secuencia aminoacídica de *garp* presentó identidad con secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de secuencias genómicas de *Leishmania major* alcanzando una identidad de alrededor de 35 % en aproximadamente 150 pb.

El análisis de la secuencia aminoacídica de GARP realizadas con GCG *Sequence Analysis Software* version 9 y en la base de datos *ProDom* (base de datos de dominios de proteínas putativas) predijeron que la proteína no parece ser globular. La composición de la estructura secundaria predicha es 37,7 % α -hélice, 12,8 % hoja β plegada y 49,5 % de vueltas. La búsqueda de motivos consenso reveló sitios posibles de N-acetilación (4 sitios), de fosforilación de proteína-quinasa de cAMP y de cGMP- dependiente (7 sitios), de fosforilación de proteína-quinasa C (25 sitios), de fosforilación de caseína-quinasa II (17 sitios), de fosforilación de tirosina-quinasa (3 sitios), de N-miristoilación (12 sitios), de amidación (5 sitios) y de unión de ATP/GTP motif A (P-loop)] (1 sitio). La composición aminoacídica de GARP y otros datos obtenidos a partir de análisis realizados con GCG *Sequence Analysis Software* es mostrada en la figura 9.

Arg	R	70	Leu	L	65
Asp	D	84	Ile	I	36
Cys	C	8	Ser	S	95
Glu	E	140	Thr	T	82
His	H	31	Met	M	18
Lys	K	73	Asn	N	31
Tyr	Y	19	Gln	Q	43
Gly	G	69	Phe	F	22
Ala	A	158	Trp	W	6
Val	V	75	Pro	P	73

Punto isoeléctrico = 4.70
El peso molecular calculado es de 129 668.19 Da

Figura 9: Composición aminoacídica, punto isoeléctrico y peso molecular calculados con GCG *Sequence Analysis Software*

*Expresión del gen *garp**

Como la expresión del EST fue nula, quizás debido a su alto contenido de cargas ácidas, y teniendo ya la secuencia completa se decidió expresar la parte no ácida de GARP para inmunizar ratones y obtener un antisuero policlonal, y así poder seguir la purificación y expresión de la proteína completa. Aprovechando un sitio de restricción Xba I en el amplicón del gen completo se pudo obtener un inserto de los 1551 pb que comprende el N-terminal de la proteína y no incluye las secuencias codificantes para las regiones de residuos ácidos. Este fragmento de GARP (*f*-GARP) fue subclonado en el vector de expresión pMAL-c2 y obteniéndose una proteína fusionada a MBP del peso molecular esperado (Fig. 10).

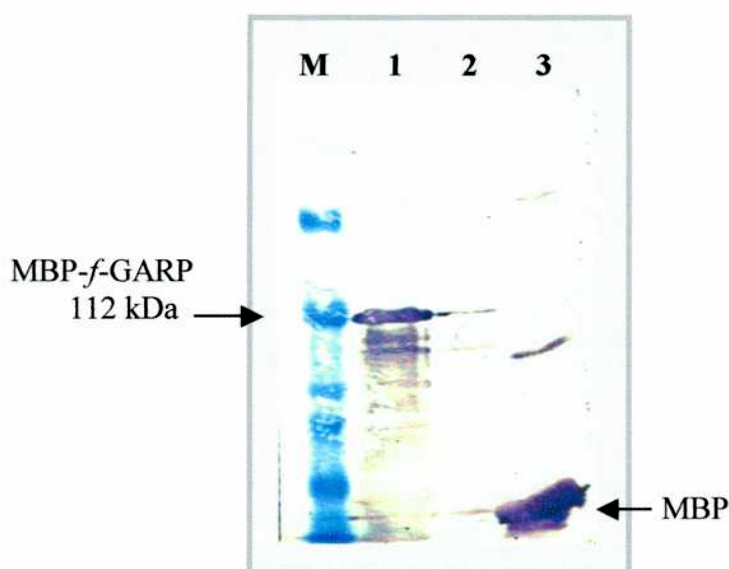


Figura 10: Expresión de la proteína recombinante MBP-*f*-GARP

Los extractos correspondientes a las bacterias transformadas con pMAL-c2-*f*-GARP inducidos con IPTG (1) y no inducidos (2) y bacterias transformadas con pMal-c2 sin inserto inducida con IPTG (3) se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se enfrentaron a un suero policlonal anti-MBP.

Antes de la purificación por afinidad, se observó que la proteína recombinante MBP-*f*-GARP formaba cuerpos de inclusión (Fig.11). Por tal motivo se tuvo que

modificar el protocolo de purificación centrifugando a velocidades menores. La purificación se realizó con columnas de resina de amilosa siguiendo el protocolo del fabricante (New England Biolabs®). La elución de la proteína se realizó con 10 mM de maltosa, pero la elución de la columna no fue total, sino que parte quedó unida a la amilosa.

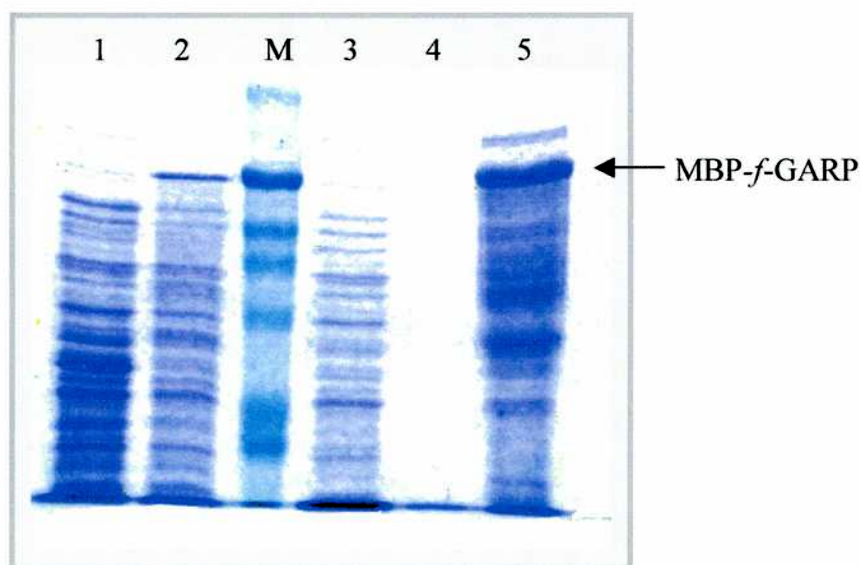


Figura 11: Electroforesis en gel de acrilamida 10% teñido con Coomassie blue de cultivos y fracciones obtenidas para detectar formación de cuerpos de inclusión. (Ver materiales y métodos: Detección de cuerpos de inclusión).

Lisado a partir de cultivo no inducido e inducido respectivamente (1,2). Sobrenadante 1 (3), sobrenadante 2 (4) y sobrenadante 3 con cuerpos de inclusión (5). **M** marcador de peso molecular 193, 112, 86, 70, 57, 39.5 y 36 kDa.

Con el material eluido y el retenido en la columna, se inmunizaron intraperitonealmente ratones Balb/C para la obtención de anticuerpos policlonales anti-GARP. Paralelamente, se subclonó el fragmento *f*-GARP en el plásmido pGEX-4T1, que expresa a la proteína fusionada con GST. Este plásmido recombinante se secuenció previamente para corroborar la inserción del fragmento en el marco de lectura correcto. Los anti-sueros producidos por

inmunización con MBP-*f*-GARP se probaron en Western blots contra GST-*f*-GARP. Desafortunadamente, estos sueros reconocieron muy poco a GST-*f*-GARP (Fig. 12), aunque tenían altos niveles de anticuerpos anti-MBP (no mostrado).

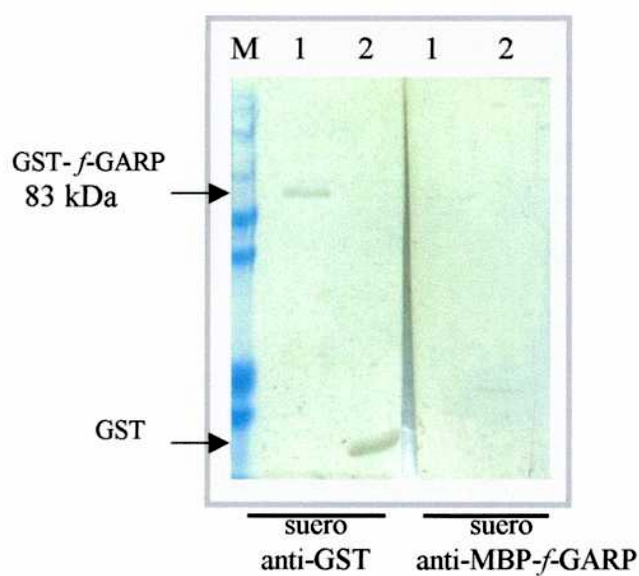


Figura 12: Reactividad de un suero policlonal anti MBP-*f*-GARP y un suero anti GST

Extactos de bacterias transformadas con pGEX-4T1 -*f*-GARP inducido con IPTG (1) y con pGEX-4T1sin inserto inducido con IPTG (2). M marcador de peso molecular 193, 112, 86, 70, 57, 39.5 y 36 kDa.

Después de probar sin éxito diferentes métodos para subclonar el gen *garp* completo, se decidió utilizar el sistema de clonado directo a partir del producto de PCR en el plásmido pGEM-T (kit pGEM-T easy® Promega), como una etapa previa al subclonado en pMAL-c2 y obtener una proteína recombinante MBP-GARP (aproximadamente 170 kDa) (Fig. 13).

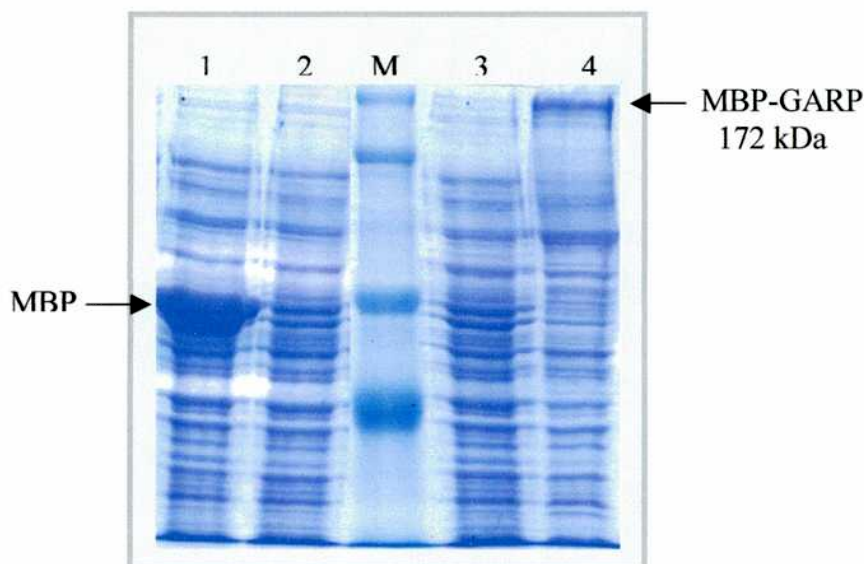


Figura 13: Expresión de la proteína recombinante MBP-GARP

Extractos a partir del cultivo de *E. coli* transformado con pMAL-c2 sin inserto, inducido y no inducido respectivamente (1, 2) y con pMAL-c2-*garp*, no inducido e inducido respectivamente (3,4). M marcador de peso molecular 180, 120, 55 y 40 kDa

Debido a la falta de un antisuero específico, empleamos sueros de pacientes chagásicos para la detección de la proteína recombinante MBP-GARP. Como resultado se obtuvo que algunos sueros reconocían a la banda de MBP-GARP, sin que se observara un reconocimiento de la proteína MBP (Fig. 14).

Para purificar la proteína se utilizó la resina de amilosa de New England Biolabs®. La proteína fue eluida con matosa 10 mM. Los eluidos y alícuotas tomadas en las distintas etapas de la purificación fueron corridos en geles de poliacrilamida 10% y teñidos con Coomassie blue. En este caso también se observó que no eluía toda la proteína que se unía a la resina (Fig. 15).

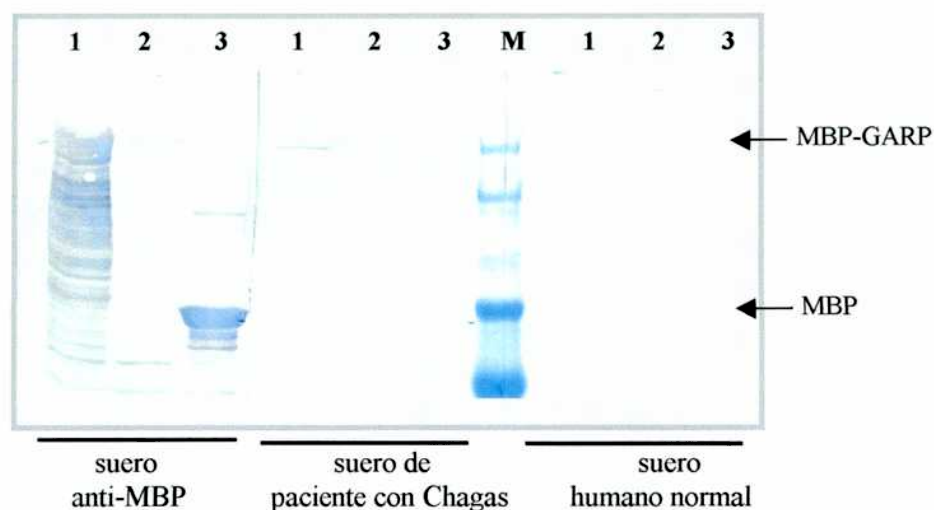


Figura 14: Detección de la proteína recombinante MBP-GARP por Western blot

Extractos a partir del cultivo de *E. coli* transformado con pMAL-c2-*garp*, inducido y no inducido respectivamente (1, 2) y con pMAL-c2 sin inserto inducido (3). Los sueros se emplearon en una dilución 1/100 y fueron competidos con lisado de *E. coli*. M marcadores de peso molecular 180, 120, 55 y 40 kDa.

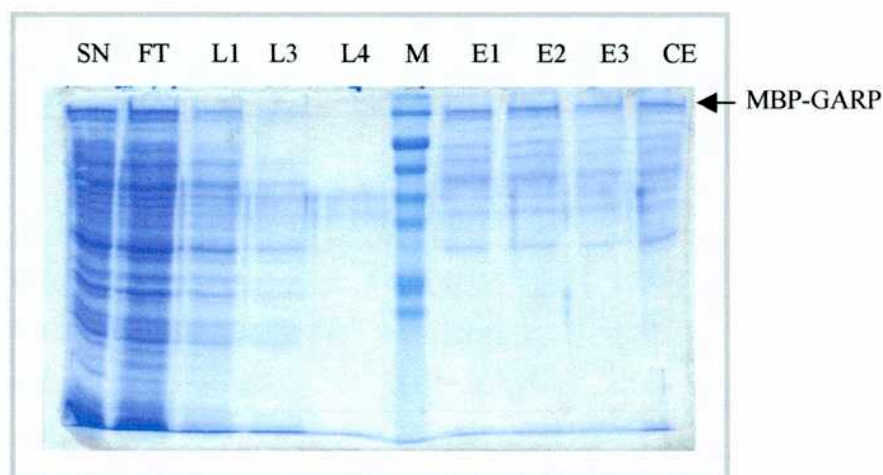


Figura 15: Purificación de la proteína recombinante MBP-GARP analizada por SDS-PAGE

SN: Sobrenadante del lisado obtenido por centrifugación a 1500 r.p.m. FT: Percolado luego de incubarse con la resina de amilosa L1, L3, L4: lavados. E1, E2, E3: eluidos con maltosa 10mM. CE: Resina de amilosa luego de las eluciones. M marcador de peso molecular 193, 112, 86, 70, 57, 39.5 y 36 kDa.

Cuando se obtuvo la proteína MBP-GARP purificada, se prepararon sueros policlonales en 4 ratones Balb/C. La presencia de anticuerpos contra GARP en los sueros murinos se verificó por Westerns blot (Fig. 16).

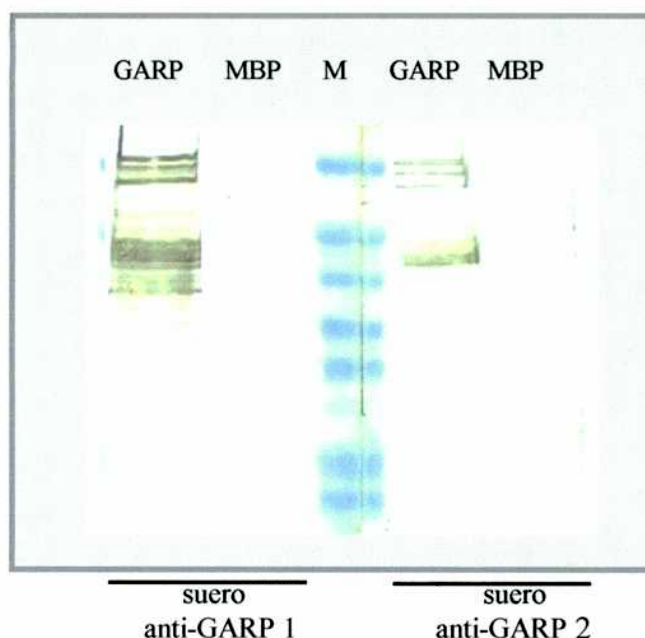


Figura 16: Western blot de las proteínas MBP-GARP purificadas con sueros policlonales anti-GARP producidos en dos ratones.

M marcador de peso molecular 193, 112, 86, 70, 57, 39, 36 kDa.

Como se mencionó anteriormente, GARP era reconocida por sueros de pacientes con Chagas crónico (Fig. 13). Para determinar la inmunoreactividad de la misma en un mayor número de sueros, se pusieron a punto las condiciones para realizar ensayos de ELISA con MBP-GARP. Los pocillos de las placas fueron cubiertos con diferentes concentraciones de la proteína MBP-GARP y MBP, y se probaron diferentes diluciones de un suero humano que reaccionaba con MBP-GARP. Como control de la correcta adhesión de las proteínas a la placa se utilizó un suero policlonal anti-MBP. La concentración óptima de proteína fue de 200ng/pocillo y la de los sueros fue de 1/100. De este modo fue posible ensayar 60 sueros de pacientes chagásicos y 20 sueros normales para determinar su

reactividad contra GARP. La línea de corte fue determinada como la media de las densidades ópticas (DO) obtenidas con los sueros normales más 3 desvíos standard (para cada suero, los valores de DO obtenidos contra la proteína MBP-GARP fueron restados a los obtenidos con MBP). Alrededor del 20 % de los sueros chagásicos superaron la línea de corte establecida (Fig. 17).

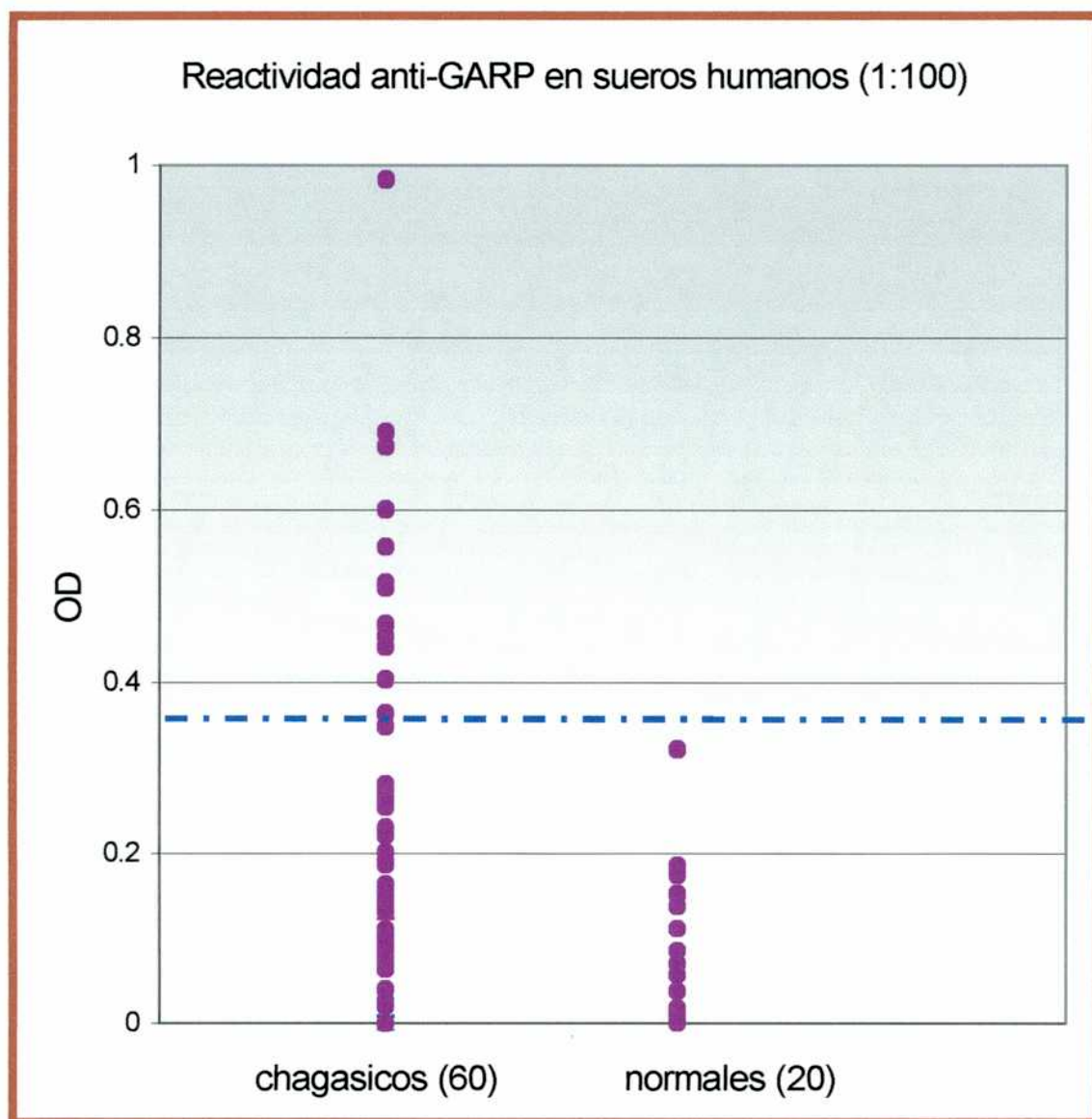


Figura 17: Reactividad de sueros de pacientes chagásicos y normales contra GARP analizados por ELISA

Cada punto indica la reactividad de un suero individual. La línea punteada corresponde a la línea de corte ($\bar{X} + 3SD$).

Para determinar la región de GARP reconocida por los anticuerpos de pacientes con la enfermedad de Chagas se corrieron y transfirieron geles de poliacrilamida 10 % conteniendo las proteínas MBP-GARP, MBP-*f*-GARP y MBP, y fueron revelados con sueros de pacientes que habían reconocido a GARP en experiencias anteriores. La dilución de los sueros usada fue 1/100. Ninguno de los sueros probados reaccionó con MBP-*f*-GARP o MBP (Fig. 18).

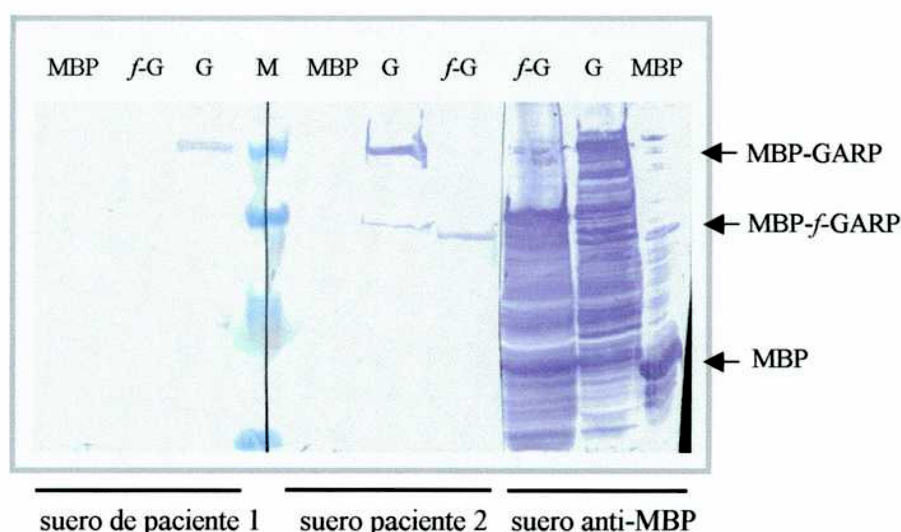


Figura 18: Reactividad de sueros de pacientes con Chagas contra GARP y *f*-GARP

Extractos a partir del cultivo de *E. coli* transformado con pMAL-c2-*garp* (G), pMal-c2-*f-garp* inducidos (*f*-G) y con pMAL-c2 sin inserto inducido (MBP). Los sueros se emplearon en una dilución 1/100 y fueron competidos con lisado de *E. coli*. M marcadores de peso molecular 180, 120, 55 y 40 kDa.

Del mismo modo se realizaron ELISA con *f*-GARP para determinar qué región de la proteína GARP era reconocida por los anticuerpos de los pacientes con Chagas crónico. Los pocillos se cubrieron con MBP-*f*-GARP, MBP-GARP y MBP. Los resultados muestran que el o los epítopes reconocidos por los sueros de los pacientes se encuentran en la mitad C-terminal de la proteína GARP (Fig. 19).

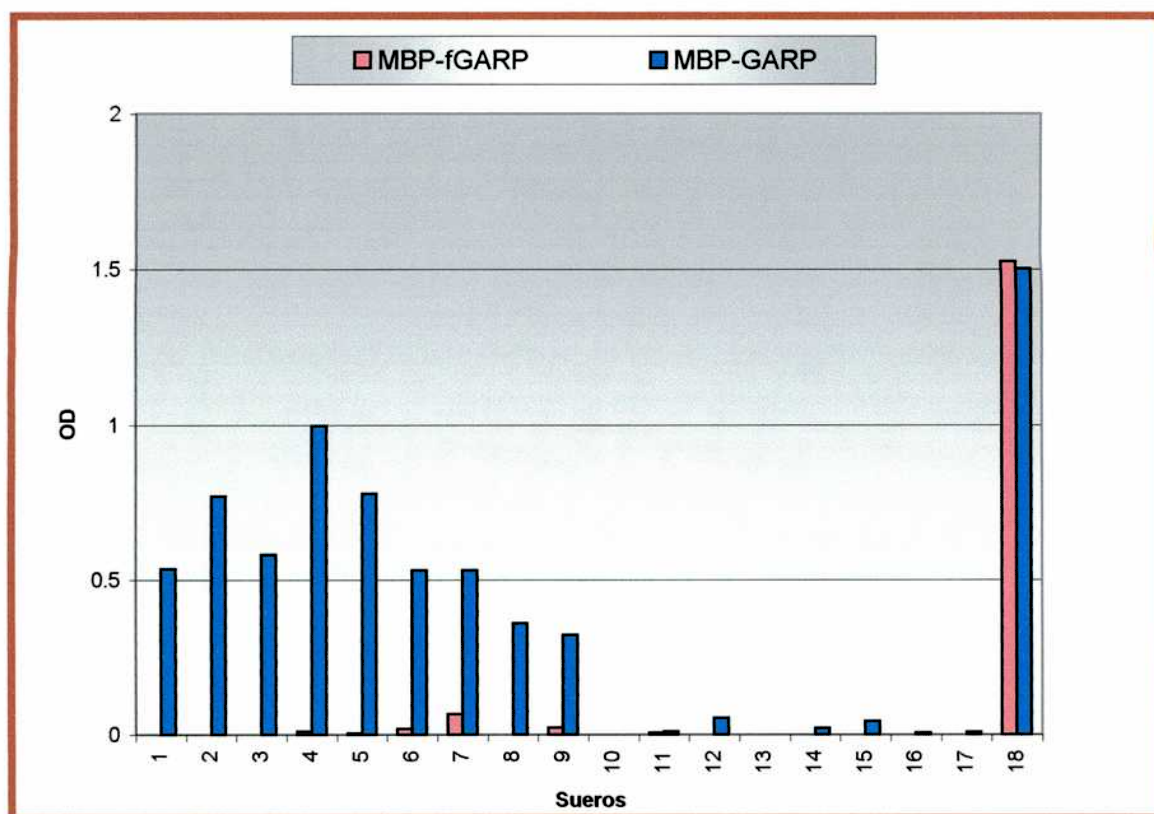


Figura 19: Reactividad de sueros de pacientes con Chagas GARP positivos y normales contra *f*-GARP analizados por ELISA (1:100)

1 a 9: Sueros de pacientes con Chagas 10 a 17: Sueros humanos controles.

18: Suero de ratón inmunizado con MBP.

Reconocimiento de GARP en lisados de parásitos

Para confirmar la expresión del gen *garp* en epimastigotes, se realizaron western blots con lisados totales de parásitos. Los mismos se revelaron con un suero de ratón inmunizado con MBP-GARP. Como se muestra en la figura 20, se observa una banda del peso esperado, que desaparece completamente cuando el suero es competido con la proteína recombinante MBP-GARP y parcialmente cuando es competido con MBP-*f*-GARP.

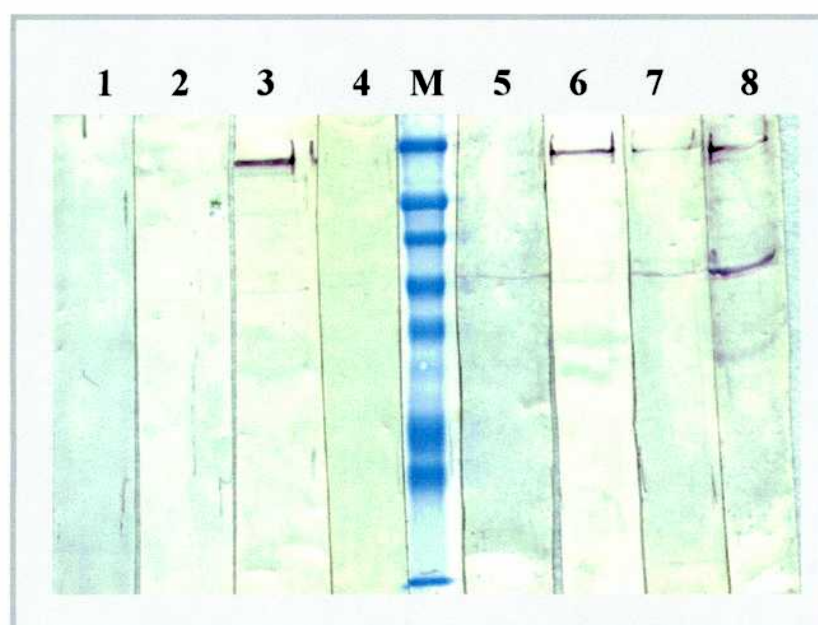


Figura 20: Western blot de proteínas totales de *T. cruzi* con sueros de ratones inmunizados con MBP-GARP

Revelado con suero de ratón inmunizado con MBP (1), suero preinmune de ratón (2), suero de ratón inmunizado con MBP-GARP (3), sueros de ratones inmunizados con MBP-GARP competidos con 10 (4) y 50 μ g (5) de MBP-GARP, sueros de ratones inmunizados con MBP-GARP competidos con 10 (6) y 50 μ g (7) de MBP-f-GARP, suero de ratón inmunizado con MBP-GARP competido con 50 μ g de MBP (8). M marcador de peso molecular 200, 112, 87, 69, 56, 38.5 y 33.5 kDa.

Localización celular de GARP

Se realizó una centrifugación diferencial a partir de un cultivo de epimastigotes obteniéndose fracciones nuclear, flagelar, mitocondrial, glicosomal-lisosomal "heavy", lisosomal "light", microsomal y citoplasmática. Las distintas fracciones se corrieron geles de poliacrilamida 10 % y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o teñidos con Coomassie Brilliant Blue. Los Western blots fueron revelados con un suero anti GARP o como control con un suero anti P0 (no mostrado). La proteína GARP fue localizada sólo en la fracción citoplasmática (Fig. 21).

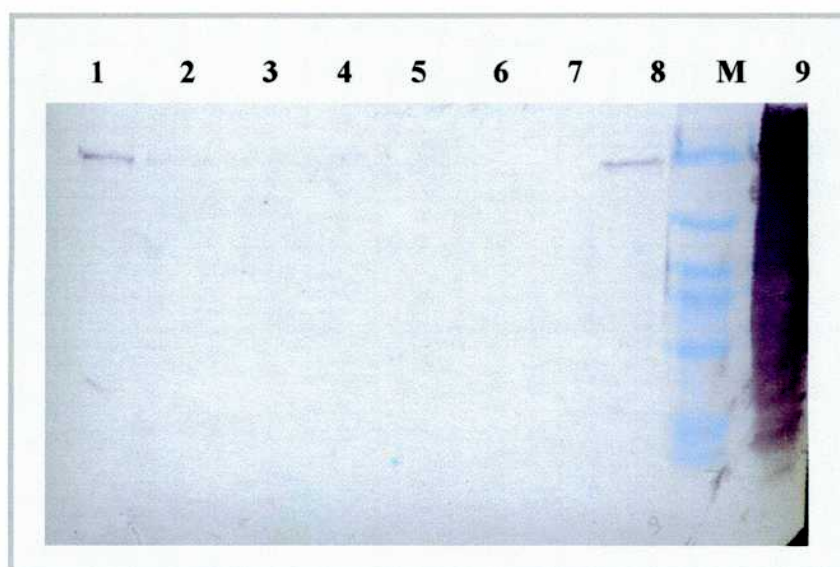


Figura 21: Western Blot de las fracciones celulares de *T. cruzi* con suero de ratón inmunizado con MBP-GARP

Lisado con proteínas totales (1), Fracción nuclear (2), Fracción flagelar (3), Fracción mitocondrial (4), Fracción glicosomal - lisosomal "heavy" (5), Fracción lisosomal "light" (6), Fracción microsomal (7), Fracción citoplasmática (8), marcador de peso molecular 200, 112, 87, 69, 56, 38.5 y 33.5 kDa (M), proteína GST-GARP purificada (9).

*Inmunofluorescencia en epimastigotes de *T. cruzi**

Utilizando sueros policlonales realizados en ratones inmunizados con MBP-GARP, se realizaron experiencias de inmunofluorescencia sobre epimastigotes. Con el anticuerpo anti-MBP-GARP pudo observarse una distribución citoplasmática de la proteína, destacándose la ausencia de fluorescencia en las zonas correspondientes al núcleo y al kinetoplasto, así como también en la membrana celular y el flagelo (Fig. 22 y 23).

Como controles se utilizaron sueros anti-MBP (Fig. 23) y sin primer anticuerpo (no mostrado), en los cuales no se observó fluorescencia.

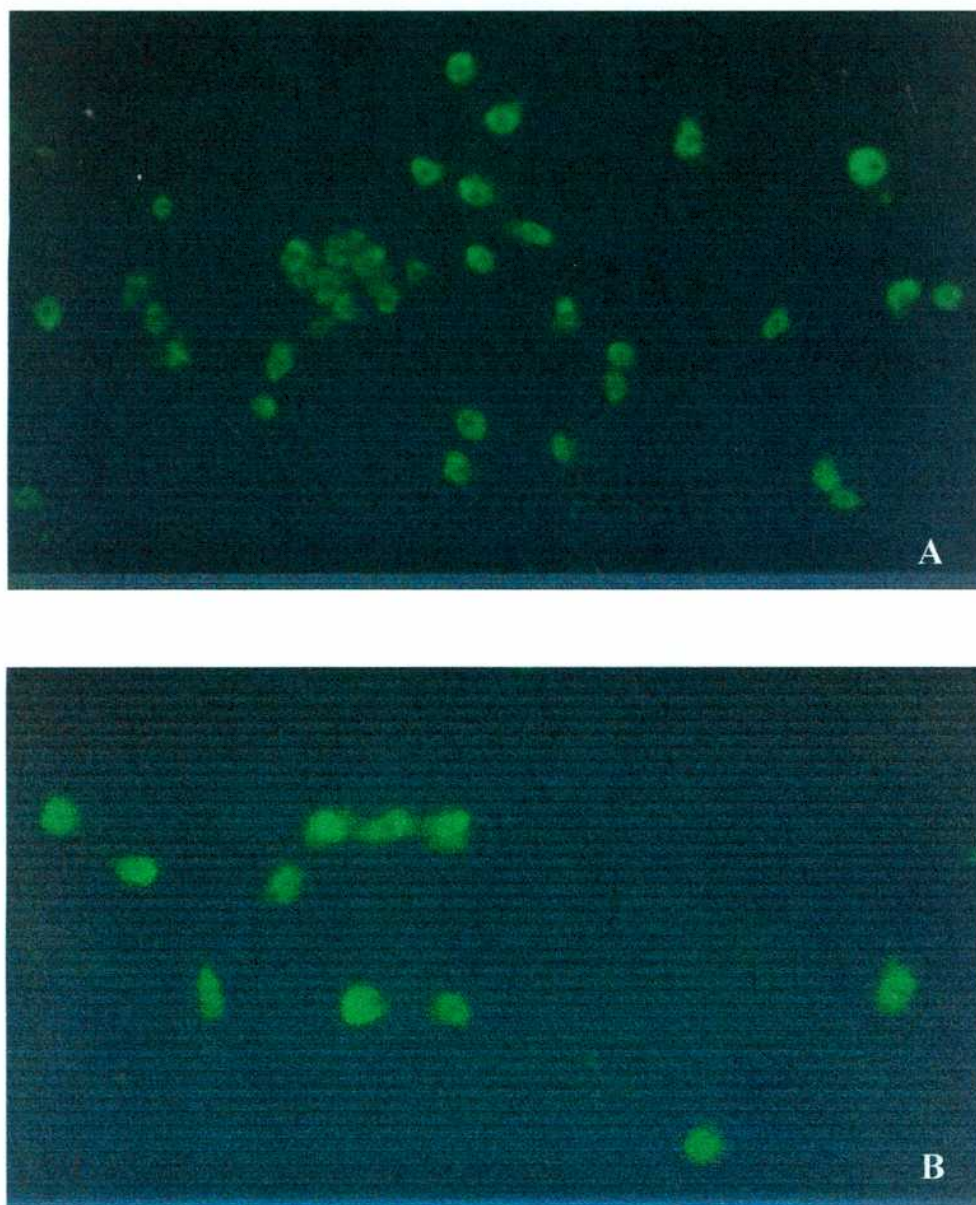


Figura 22: Inmunofluorescencia en epimastigotes de *T. cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi* fijados e incubados con un suero de ratón inmunizado con MBP-GARP. A y B aumento 400X.

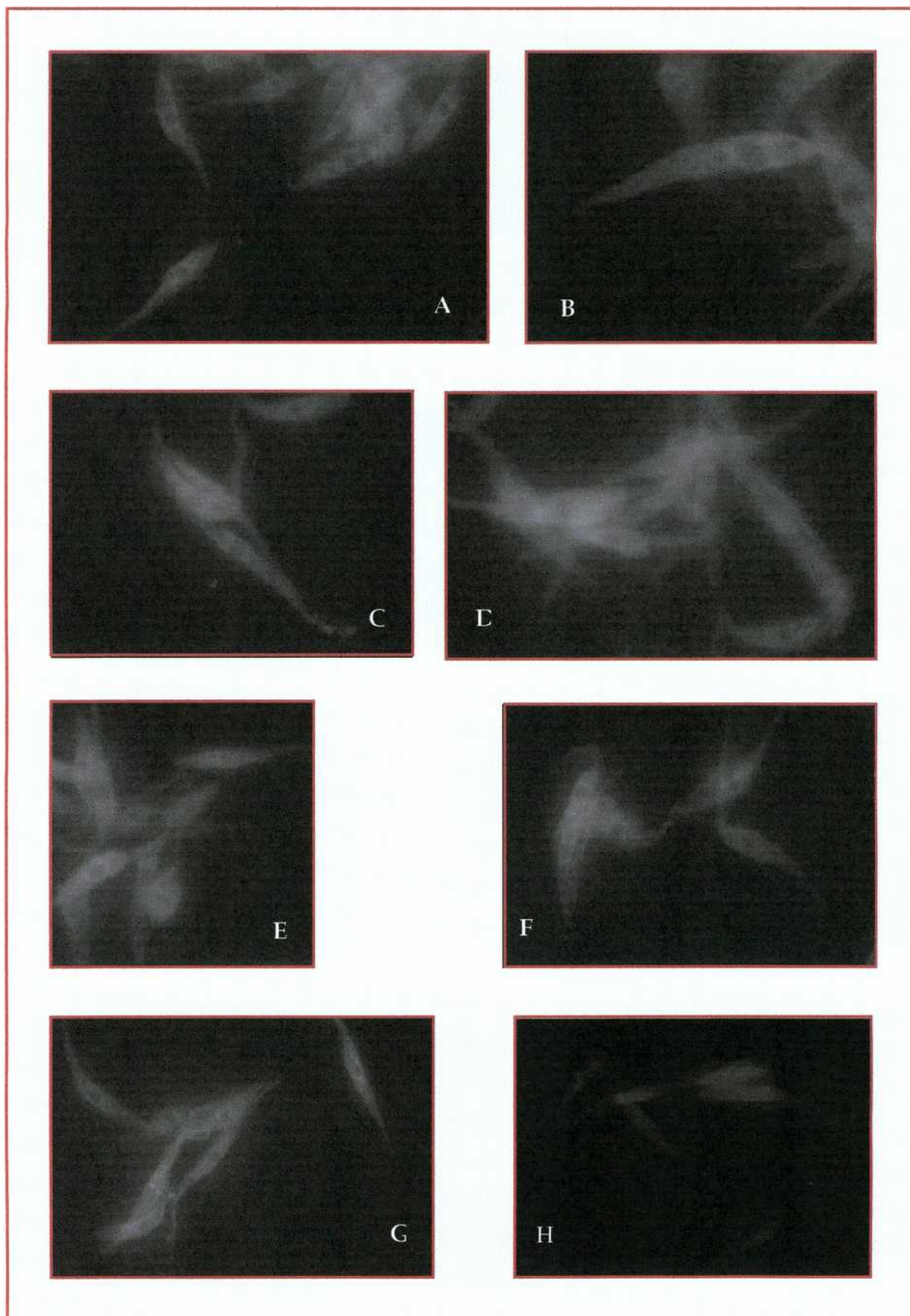


Figura 23: Inmunofluorescencia en epimastigotes de *T. cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi* fijados e incubados con suero de ratón inmunizado con MBP-GARP (A - G) o con MBP (H). Aumento 1000 X

Ensayos funcionales sobre cardiomiocitos de ratas neonatas

Los cardiomiocitos de ratas neonatas Sprague Dawley que laten espontáneamente en cultivos fueron incubados con IgG totales obtenidas a partir de sueros de ratones inmunizados con MBP-GARP. No se observaron cambios en la frecuencia de latidos con respecto a la frecuencia basal registrada antes de la incubación. Para distinguir posibles enmascaramiento del efecto por mezclas de anticuerpos que reaccionen con receptores muscarínicos y β -adrenérgicos, se trató con antagonistas muscarínicos (atropina 1 μ M) y luego β -adrenérgicos (propranolol 1 μ M). Como resultado no se observaron cambios con ninguna de las fracciones de IgG de los sueros anti GARP ni con los antagonistas utilizados. Como control se incubaron los cardiomiocitos con un agonista β -adrenérgico (isoproterenol 1 μ M), los cuales aumentaron la frecuencia de los latidos, demostrándose que las células estaban en buen estado y eran capaces de responder cuando eran estimulados sus receptores.

Inmunización con ADN

Dado que luego de identificadas las proteínas con secuencias ácidas se planeaba utilizarlas para estudiar los daños generados por los anticuerpos en modelos animales de inmunización, se decidió en paralelo con la expresión de GARP, poner a punto el método de inmunización con ADN. Con este método pretendíamos reflejar mejor la situación de la infección crónica, ya que la presentación constante de los antígenos parasitarios por las células musculares del hospedador podría ser más adecuada para estudiar la patogénesis de la enfermedad. Además, este método de inmunización probablemente refleje la presentación de los antígenos tal como ocurre en la infección natural ya que los epítopes relevantes podrían encontrarse en las proteínas recombinantes en una conformación diferente a la de la proteína nativa y el empleo de adyuvantes podría inducir una respuesta inmune distinta a la respuesta adquirida naturalmente.

Para poner a punto esta metodología y dado que disponíamos en el laboratorio de los anticuerpos policlonales y proteínas recombinantes correspondientes, la proteína ribosomal P2 β de *Trypanosoma cruzi* fue clonada en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen), bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Para el clonado, la región codificante completa correspondiente a la proteína ribosomal TcP2 β (Fig. 24) fue amplificada por PCR a partir del clon genómico λ Zap G2a1 ya caracterizado en nuestro laboratorio (Vázquez M. y col. 1992). Para tal fin se diseñaron oligonucleótidos con sitios de restricción para el subclonado direccional en el plásmido pcDNA3. En el caso del oligonucleótido de la región 5', se incluyó una purina (A) en posición -3 para garantizar la traducción del inserto en células eucariontes (Kozak, M. 1989).

Los clones recombinantes se identificaron por hibridación con oligonucleótidos marcados radiactivamente y correspondientes a regiones internas de los genes TcP2 β . Se eligieron las colonias correspondientes a una señal radiactiva y se extrajeron los plásmidos, que fueron analizados en geles de agarosa. De este modo se obtuvieron 4 clones correspondientes a pcDNA3-TcP2 β con insertos de 300 pb. La autenticidad de los clones se verificó por mapeo de restricción y secuenciación completa de los insertos.

```

CTTTA TAAGTTGTCT TGTCAGATGA AGTACCTTGC CGCTTATGCT CTTGTTGGCC
                        TcP2 $\beta$ /01 BamHI
TCTCAGGGGG GACCCCTCA AAGTCTGCAG TTGAGGCCGT ATTGAAGGCT GCCGGCGTTC
CTGTCGATCC TTCTCGCGTG GATGCACTTT TTGCCGAGTT TGCAGGCAAG GACCTTGATA
CGGTATGCAC TGAAGGCAAA TCGAAGCTTG TAGGAGGGGC TACACGTCCC AATGCTGCCA
CCGCTTCTGC ACCCACTGCC GCTGCCGCCG CCTCTAGTGG TGCCGCCGCG CCTGCTGCAG
CTGCGGAAGA GGAGGAGGAC GATGACATGG GATTGGTCT TTTGTACTAA AGACAAATGC
                        TcP2 $\beta$ /02 XbaI
TTATTTTATT TTATTTTGA

```

Figura 24: Localización de los oligonucleótidos TcP2 β /01 BamHI y TcP2 β /02 XbaI en la secuencia de TcP2 β .

Los plásmidos fueron preparados a gran escala con el QIAGEN Plasmid Mega Kit® (QIAGEN), según las indicaciones de los fabricantes y finalmente disueltos en solución fisiológica.

Se realizaron experiencias de transformación en células COS-7 para comprobar la capacidad de los plásmidos recombinantes de expresar los polipéptidos de interés en células de mamífero. Para poner a punto esta técnica se hicieron transfecciones con un plásmido conteniendo el gen *lacZ*, y se detectó la actividad β -galactosidasa con el agregado de X-gal. Las células transfectadas con pcDNA3-TcP2 β se dejaron 48 hs creciendo con medio DMEM-completo, se fijaron y los productos de interés se inmunodetectaron con sueros policlonales de ratón contra TcP2 β , seguidos de anticuerpos anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina y el sustrato para fosfatasa alcalina BCIP/NBT (SIGMA) (Fig. 25). Se usaron como controles positivos células transfectadas con un plásmido conteniendo el gen *lacZ* y el anticuerpo anti- β -gal (no mostrado).

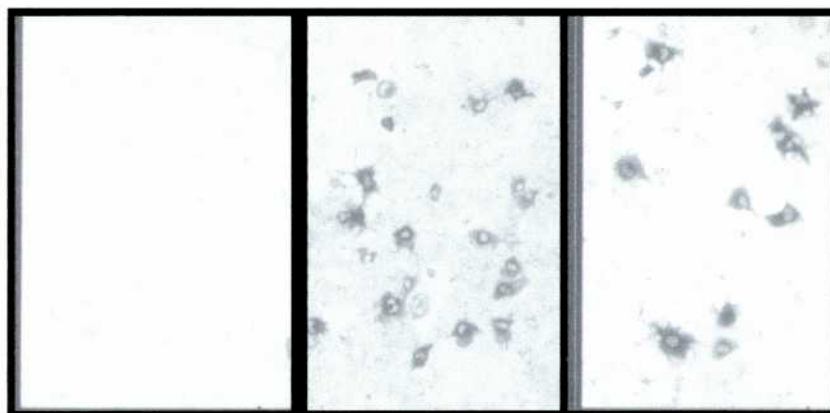


Figura 25: Inmunodetección de los productos de expresión de los plásmidos recombinantes. Las células COS-7 se transfectaron con los plásmidos pcDNA3 (A), pcDNA3-TcP2 β (B y C, 40X y 100X, respectivamente). Luego de 48hs, las células se fijaron e incubaron con anticuerpos anti-TcP2 β , seguidos de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina y el sustrato correspondiente.

Luego de esta etapa se procedió a inmunizar intramuscularmente ratones Balb/C según el esquema de la tabla I. El primer grupo de inmunizaciones fue

realizado con pcDNA3 sin inserto, pcDNA3-TcP2 β y pcDNA3-TcP2 β /pcDNA3-GMCSF. La coinmunización con pcDNA3-TcP2 β y pcDNA3-GMCSF se realizó ya que la expresión de GMCSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) podría estimular una mejor respuesta contra el antígeno expresado (Arai y col. 1990).

Grupo de ratones	Immunizados con	Día 0	3 ^{ra} Sem.	6 ^{ta} Sem.	7 ^{ta} Sem.
Controles	pcDNA3	C - I	C - I	C - I	C
	pcDNA3-TcP2 β	C - I	C - I	C - I	C
I	pcDNA3-TcP2 β	C - I	C - I	C - I	C
	pcDNA3-GMCSF	C - I	C - I	C - I	C
II	pcDNA3-TcP2 β	C - I	C - I	C - I	C

Tabla I: Esquema de inmunización con ADN

Se empleó 100 μ g de cada plásmido por ratón. C: colecta de suero
I: inmunización

Los sueros obtenidos fueron analizados por ELISA. Como antígeno se utilizó la proteína recombinante GST-TcP2 β disponible en nuestro laboratorio. Se observó una muy baja respuesta en los grupos I y II.

Para comprobar que se había desarrollado una respuesta primaria en los ratones inmunizados con pcDNA3-TcP2 β , se realizó un desafío con proteína recombinante (MBP-TcP2 β). Como control se inmunizó con MBP. Se inyectaron intraperitonealmente 50 μ g de proteína MBP o MBP-TcP2 β . Los ratones del grupo control fueron inmunizados solamente con MBP-TcP2 β , y los del grupo I y II fueron inmunizados con MBP o MBP-TcP2 β según se muestra en la tabla II. A los 7 días se sangraron los ratones para analizar la respuesta IgG. Para ello se repitieron las experiencias de ELISA en las mismas condiciones utilizadas anteriormente. Se observó que los sueros de los ratones del grupo II que fueron desafiados con la proteína recombinante presentaban altos niveles de

anticuerpos IgG anti-TcP2 β , mientras que en los ratones restantes los niveles eran significativamente menores (Fig. 26), de modo que en ellos ya se había desarrollado una respuesta primaria.

Grupo	Ratón	DNA inmunizado	Proteína utilizada para Inmunizar
I	1	TcP2 β + GM-CSF	MBP-TcP2 β
	2	TcP2 β + GM-CSF	MBP-TcP2 β
	3	TcP2 β + GM-CSF	MBP-TcP2 β
	4	TcP2 β + GM-CSF	MBP
	5	TcP2 β + GM-CSF	MBP
II	6	TcP2 β	MBP-TcP2 β
	9	TcP2 β	MBP-TcP2 β
	7	TcP2 β	MBP
	8	TcP2 β	MBP
control	C1	pcDNA3	MBP-TcP2 β
	C2	pcDNA3	MBP-TcP2 β
	C3	pcDNA3	MBP-TcP2 β
	C4	pcDNA3	MBP-TcP2 β

Tabla II: Tabla con los grupos de ratones inmunizados

Los ratones señalados en azul fueron los que produjeron anticuerpos a la semana de haber sido inmunizados con proteínas recombinantes

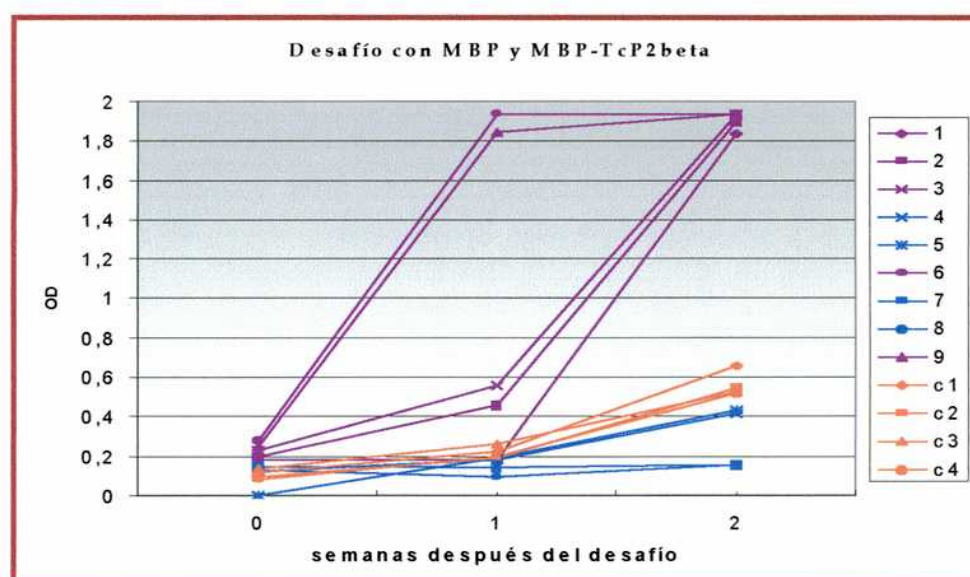


Figura 26: Reactividad de los sueros de ratones inmunizados contra la proteína recombinante GST-TcP2 β .

Los sueros se ensayaron (1/50) por ELISA al finalizar el esquema de inmunización con ADN (0 semanas después del desafío) y después de 1 y 2 semanas del desafío con la proteína recombinante.

Estos resultados demuestran que la inmunización con la construcción pcDNA3-TcP2 β fue capaz de inducir una respuesta primaria contra los epítopes relevantes de TcP2 β .

Se repitieron las experiencias de inmunización con pcDNA3-TcP2 β utilizando el esquema anterior. Se utilizaron 20 ratones Balb/C de 8 semanas pero solamente se ensayaron pcDNA3-TcP2 β y pcDNA3, ya que anteriormente la coinmunización con el plásmido pcDNA3-GMCSF no mostró mejoras en la respuesta.

Se ensayaron los sueros de los ratones por ELISA y se observó que muchos de ellos reaccionaban positivamente contra la proteína TcP2 β (Fig. 27).

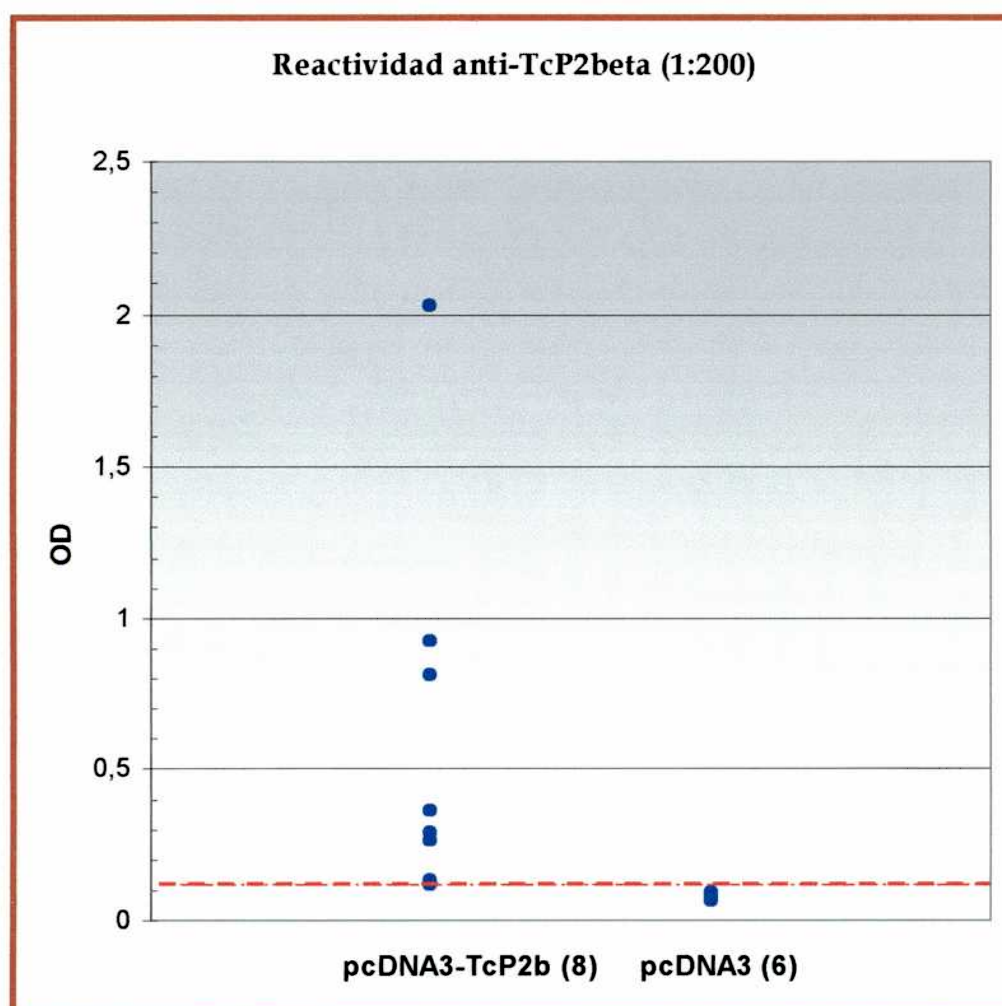


Figura 27: Gráfico de la reactividad de los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA3-TcP2 β en ensayos de ELISA.

Previamente a la primera inmunización se le realizaron electrocardiogramas a los ratones con el fin de poder observar alguna alteración cardíaca producida por los anticuerpos generados contra TcP2 β . Esta operación fue realizada una vez más antes de la última colecta de sangre. Los electrocardiogramas no mostraron cambios significativos antes ni después de las inmunizaciones. Por el contrario, la inmunización de ratones con la proteína recombinante TcP2 β sí había provocado alteraciones electrocardiográficas (aumento de la duración del complejo QRS) (López Bergami P. y col., 1997).

También se determinó el perfil de isotipos de las inmunoglobulinas anti-TcP2 β generadas por inmunización con ADN. La respuesta en los animales inmunizados con pcDNA3/TcP2 β fue predominantemente del tipo IgG2a (Fig. 28). En cambio, en la inmunización con MBP-TcP2 β el tipo de respuesta fue IgG1 e IgG2b (no mostrado).

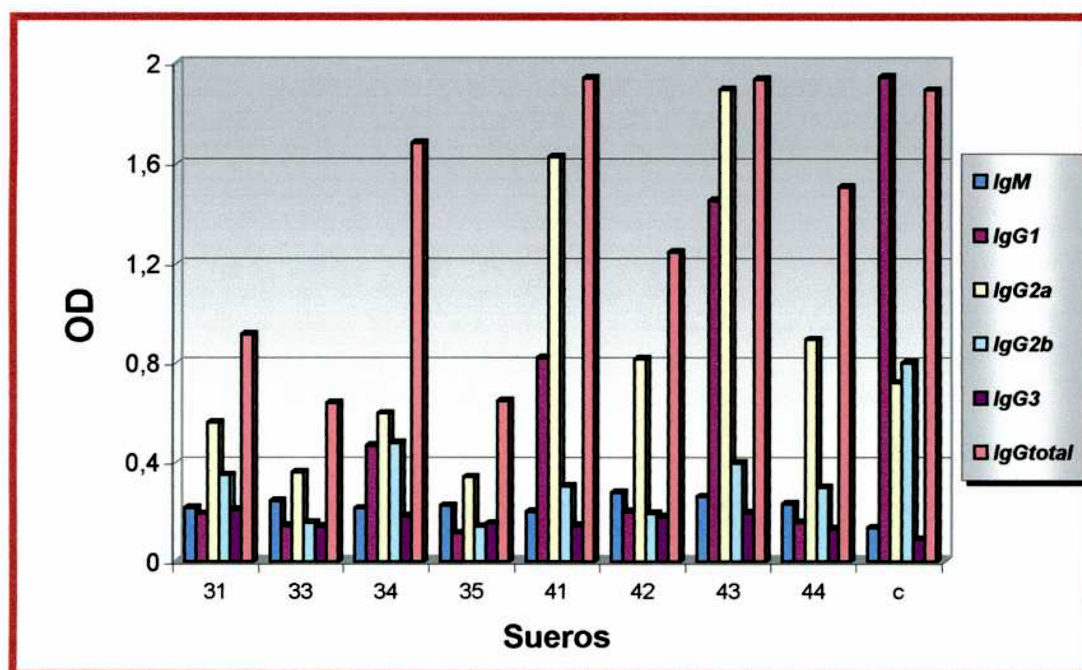


Figura 28: Perfil de subclases de los sueros de los ratones inmunizados con el plásmido pcDNA3/TcP2 β .

Se determinaron por ELISA los niveles de anticuerpos IgM, IgG (totales) y subclases de IgG anti-GST-TcP2 β en los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA3/TcP2 β (ratones 31, 33, 34, 35, 41, 42, 43 y 44). Como control se muestra el perfil de un suero policlonal anti-MBP- TcP2 β (c).

Por otra parte se dispuso también utilizar el gen de la proteína ribosomal P0 (TcP0) para realizar inmunizaciones con ADN del mismo modo que con TcP2 β y estudiar la respuesta contra esta proteína.

Debido a que no se disponía de un clon genómico que incluyera la región codificante de TcP0 completa (Fig. 29), ésta debió amplificarse a partir del ADNc de *T. cruzi* (cepa Tulahuen).

```

TTCTGTACTA TATTGAATCC GGGACTCAAG TATCTTTTAT TATGCCGTCT GTCTCCGAGG
CCAAGCGGGA GTACGAGGAG CGTTTCAATG GCTGCCTCAC CAAGTACGGC CGCGTGCTCT
TCTGCCTGAT GGATAACGTC CGCTCGCAGC AGGTGCATGA CGTTCGTCGC GACCTCCGTG
GTTTGGGTGA ACTTGTGATG GGCAAGAAGA CGCTCCAGAA GAAGATTGTG GAGAGGCGCG
CGGAGGACAA GAAGGCCAGC GCGTACGACA AGTTGCTTTA CAACACGTGC ATCGAAAAGA
AGCTGTTGTG CGGCAACACC GCCCTCATCT TTACGAACGA GGAGATCCCA GTCATCACGG
CCGTGCTGGA CAAGCACCGC GTACAGGCC CCGCCCGTGT GGGCGCATCG CCATGCGACG
TCATTGTCCC CGCTGGTAAC ACCGGCATGG AGCCCAAGGC GACATCCTTC TTCCAGGCAC
TGAACATTGC GACGAAGATT GCAAAGGGTA CAGTCGAAAT TGTGAGTGAC AAGAAGGTAC
TGAGCGCTGG TGATCGTGTG GACAACTCGA CGGCCACGCT GCTGCAGAAG CTGGATATCT
CCCCGTTCTA CTACCAGGTG GAGGTGCAGT CCGTGTGGGA CCGTGGTATG CTGTTTCTTC
GCGAGGACCT TTCCATCACC GACGACGTTG TGGAGAAATA CCTTCTGGAA GGTATCAGCA
ACGTTGTGGT TTCGCTGGGT GCTGGCATCC CGACGGCAGC GACCTTGCCA CATATGATCA
TGGACGCGTT CAAGACCCTT CTTGGCGCCT CCGTTGCCAC CGAATACGAG TTCGATGAGT
TTGATGGCAA GAACCTGCGC AAGGCCGCTC TGGAGGGCAA CCTTGGTGGA GGTGCGGCTG
ACGCTGCTGC CGCTACCGAC ACCGGCGCTG CTGCCGCTCC TGCCGCTGCC GCTGAGCCCG
AAGAGGAGGA TGATGACGAC GACTTTGGCA TGGGGGCGCT GTTCTAACCT ACAAGGTAGA
GAAGAAAGTT TTCGGAAGTT ATTTTATTTT GTTTTTGTGTT TTTTATTTCT CATATTTAAA
AAAAAAAAA

```

TcP0/01 BamHI

TcP0/02 XbaI

Figura 29: Localización de los oligonucleótidos TcP0/01 Bam HI y TcP0/02 XbaI en la secuencia de TcP0.

Una vez amplificados, los insertos fueron cortados con las enzimas de restricción BamHI y XbaI. Luego de la ligación, se transformaron en *E. coli* DH5 α . Para la identificación de las colonias transformadas con la construcción se efectuaron los mismos procedimientos que para TcP2 β . De este modo se obtuvo 1 clon correspondiente a pcDNA3-TcP0. La autenticidad del clon se verificó por mapeo de restricción y secuenciación completa de los insertos. El clon obtenido de pcDNA3-TcP0 resultó tener una delección de una base que cambiaba todo el marco de lectura. Por lo tanto se debió obtener nuevos clones recombinantes. Varios clones resultaron positivos para pcDNA3-TcP0, se secuenciaron para verificar su secuencia correcta. Los plásmidos fueron preparados con el QIAGEN Plasmid Mega Kit y la expresión de los mismos fue ensayada por transfección de células COS-7.

Se inmunizaron 14 ratones con pcDNA3/TcP0 y 6 ratones con pcDNA3 (grupo control). Con el mismo esquema de inmunización que para TcP2 β (Tabla I). En la figura 30 se ve que los niveles significativos de anticuerpos aparecieron luego de la primera inmunización para el caso de II7 y recién después de la segunda inmunización para el I4.

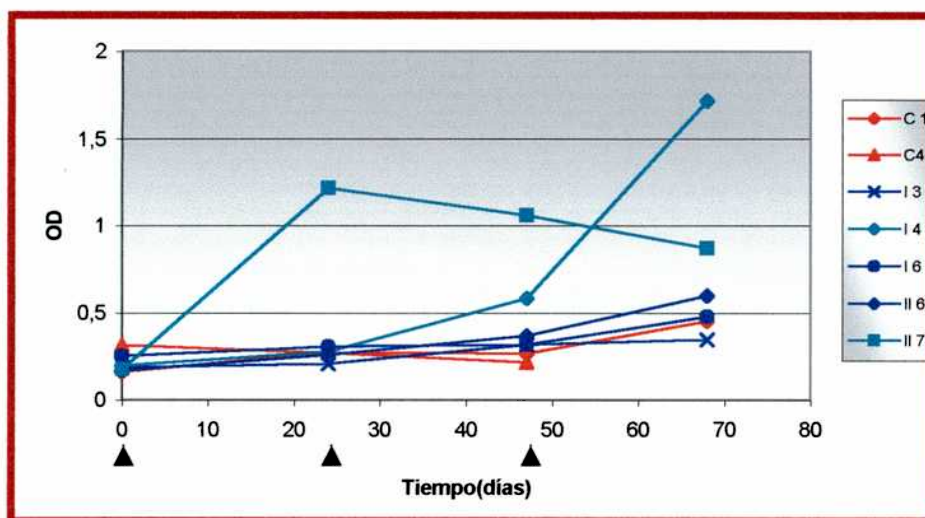


Figura 30: Reactividad de los sueros contra la proteína TcP0 a lo largo del esquema de inmunización.

Los sueros C1 y C4 corresponden a ratones inmunizados con pcDNA3 y los sueros I3, I4, I6, II6, II7 a ratones inmunizados con pcDNA3/TcP0. Las flechas indican las inmunizaciones. La dilución de suero usada fue 1/50.

A partir de este esquema se obtuvo que los sueros de sólo 2 de los 14 ratones dieron niveles significativos de anticuerpos para la colecta II (Fig. 31). Aunque sólo uno de ellos (ratón I4) fue capaz de reconocer la proteína recombinante en ensayos de Western blot (no mostrado).

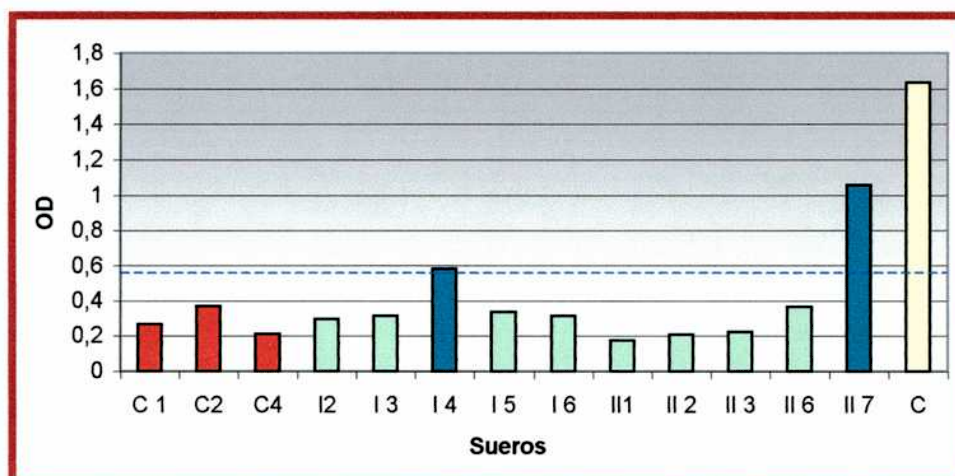


Figura 31: Reactividad de los sueros de ratones inmunizados contra la proteína GST-TcP0.

Los sueros C1, C2 y C4 corresponden a ratones inmunizados con pcDNA3 y los sueros restantes a ratones inmunizados con pcDNA3/TcP0. La línea de corte fue 0,58 (línea punteada). Todos los sueros corresponden a la colecta II (dilución 1/50). En verde oscuro se muestran los sueros positivos. El suero C es un control positivo obtenido de la inmunización con la proteína MBP-TcP0.

Se determinó el isotipo de inmunoglobulinas del suero del ratón positivo contra P0 y se observó que los anticuerpos fueron predominantemente del tipo IgG1 e IgG2a.

Se tomaron también antes de cada inmunización electrocardiogramas, sin observarse cambios con respecto al obtenido antes de la primera inmunización.

A partir de estos resultados procedimos a inmunizar ratones con la construcción pcDNA3-GARP. Para eso, el gen *garp* completo se subclonó en pcDNA3. La capacidad de esta construcción de expresar la proteína de interés en células de mamífero se verificó por transfección de células COS-7 y la detección de GARP

con anticuerpos policlonales específicos. Se siguió el esquema de inmunización mostrado en la tabla III.

<i>Grupo de ratones</i>	<i>Immunizados con</i>	<i>Dia 0</i>	<i>3^{ra} Sem.</i>	<i>6^{ta} Sem.</i>	<i>9^{ta} Sem.</i>
Controles	pcDNA3	C - I	C - I	C - I	C
I	pcDNA3-GARP	C - I	C - I	C - I	C

Tabla III: Esquema de inmunización con ADN

Se empleó 100µg de cada plásmido por ratón. C: colecta de suero I: inmunización

Los niveles de anticuerpos anti-GARP fueron seguidos por ELISA, observándose la aparición de anticuerpos anti-GARP luego de la primera inmunización, con un aumento en el transcurso del esquema y llegando a un pico luego de la tercera inmunización. Los niveles de anticuerpos comenzaron a decaer considerablemente en la colecta de sangre realizada tres semanas después de la última inmunización (Fig. 32). Con los sueros correspondientes a la tercera colecta de sangre de los ratones inmunizados con pcDNA3-GARP se realizaron ELISAs utilizando la proteína MBP-GARP para evaluar la reactividad de los mismos. El punto de corte ($X + 3 SD$) de 0,28 permite observar que 5 de 15 ratones alcanzaron niveles significativos de anticuerpos contra la proteína recombinante MBP-GARP (Fig. 33).

También se determinaron los perfiles de isotipos de los anticuerpos generados por inmunización con pcDNA3-GARP y de los anticuerpos producidos en respuesta a la inmunización con la proteína recombinante MBP-GARP. En el perfil obtenido con la inmunización con ADN, se observó un predominio de isotipos Ig G2a para algunos ratones y de Ig G2b para otros (Fig. 34). En cambio, la respuesta inducida por la inmunización realizada con la proteína recombinante fue principalmente Ig G1 e Ig G2b, y en menor medida IgG2a (Fig. 35).

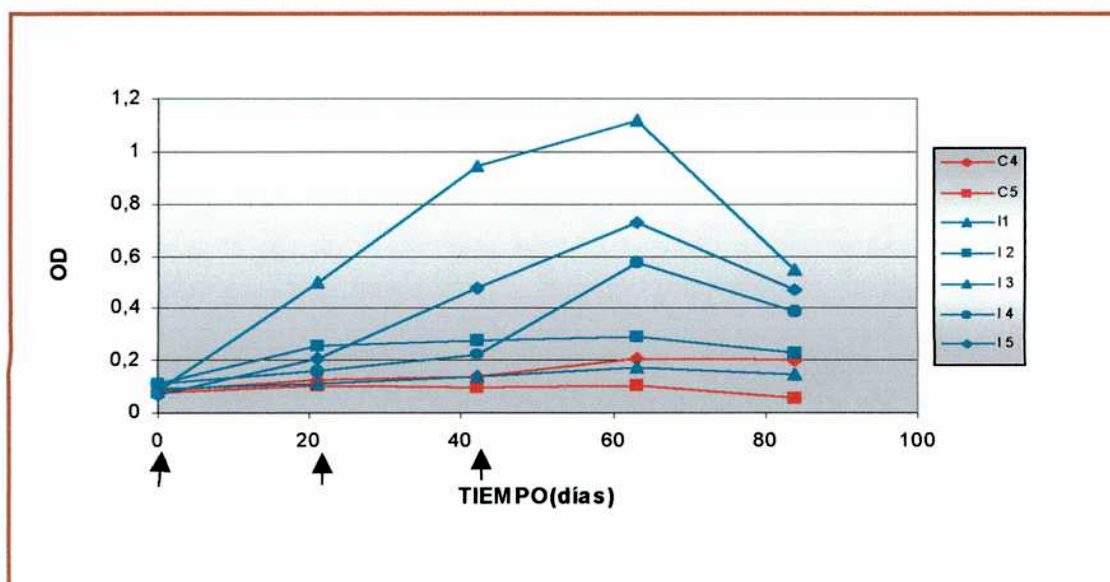


Figura 32: Aparición de anticuerpos anti-GARP durante el esquema de inmunización con el plásmido pcDNA3-GARP.

C4-C5 representan al grupo de los ratones controles inmunizados con pcDNA3 y como ejemplo se muestran los sueros I1-I5 correspondientes a ratones inmunizados con pcDNA3-GARP. Las flechas señalan los días en los que se realizaron las inmunizaciones.

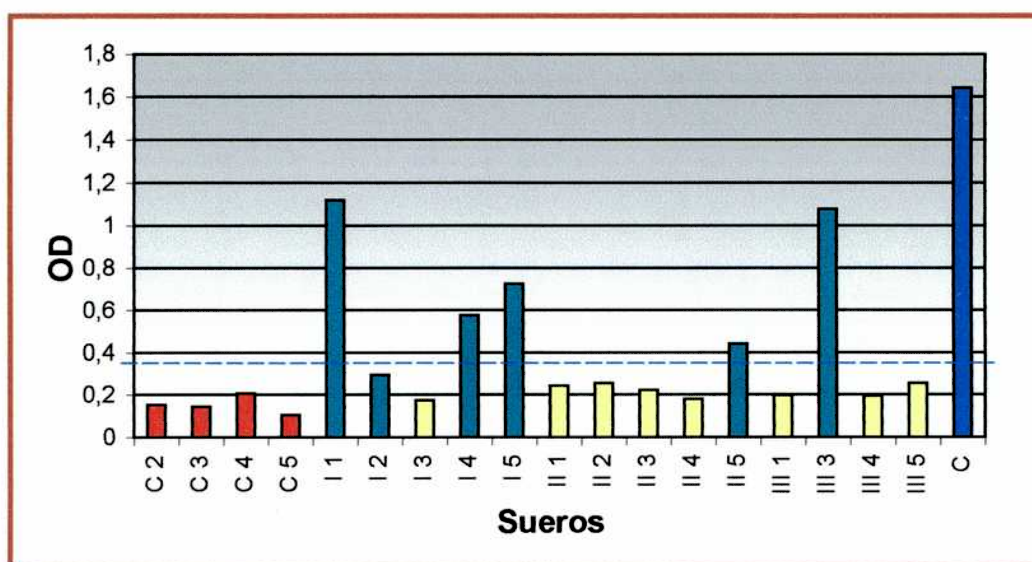


Figura 33: Reactividad de los sueros de los ratones inmunizados con ADN contra la proteína MBP-GARP.

Los sueros C2 - C5 corresponden a ratones controles inmunizados con pcDNA3, el resto a ratones inmunizados con pcDNA3-GARP. Los datos corresponden a la colecta III de suero (dilución 1/50). Las barras verdes corresponden a los sueros positivos. La línea de corte fue 0.28 (línea punteada). Como control positivo (C) se usó un suero anti-GARP obtenido de la inmunización con la proteína recombinante.

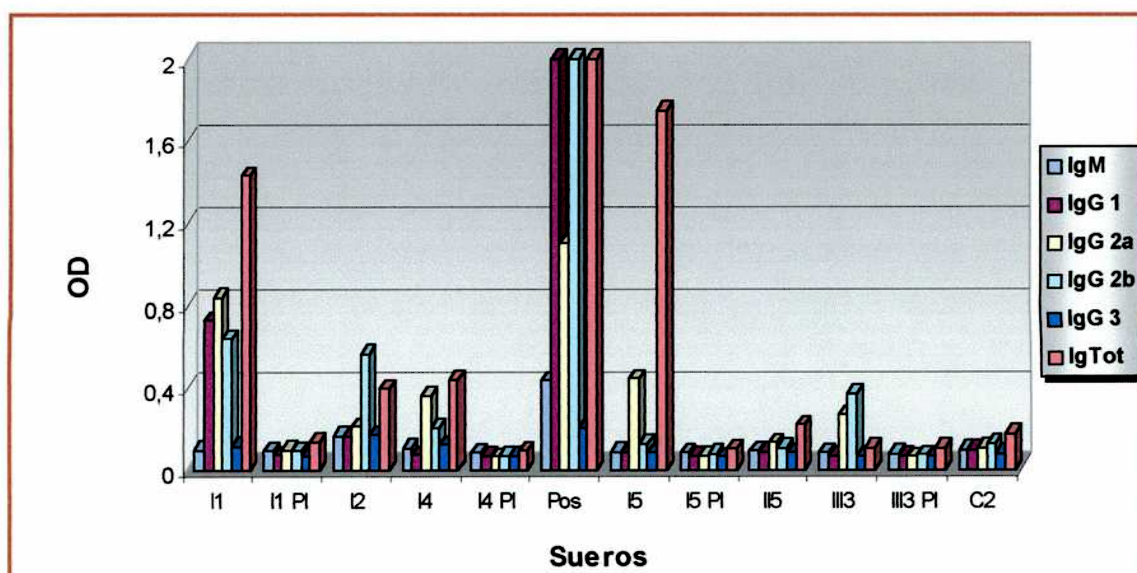


Figura 34: Perfil de subclases de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con pcDNA3- GARP

Se determinaron por ELISA los niveles de anticuerpos IgM, IgG (totales) y subclases de IgG anti-GST-GARP de ratones inmunizados con pcDNA3-GARP (colectas III y PI preinmune, dilución 1/50). Como controles se muestran los perfiles de un suero policlonal anti-MBP-GARP (pos, dilución 1/200) y de un suero de un ratón inmunizado con pcDNA3 (C2, colecta III, dilución 1/50).

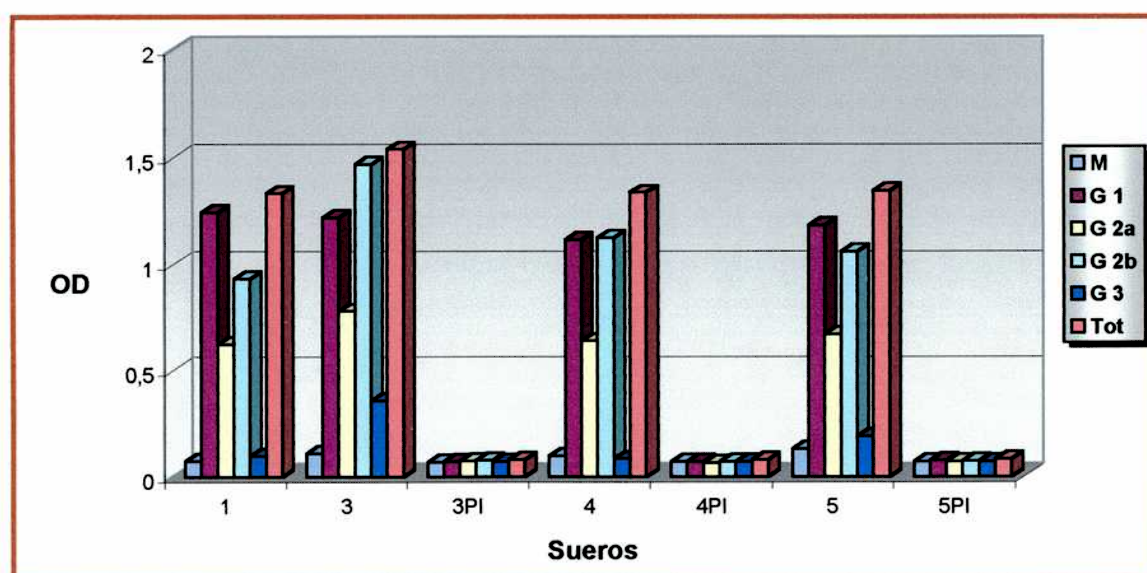


Figura 35: Perfil de subclases de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con proteínas recombinantes MBP-GARP

Se determinaron por ELISA los niveles de anticuerpos IgM, IgG (totales) y subclases de IgG anti-GST-GARP en los sueros de ratones inmunizados con MBP-GARP (ratones 1, 3, 4 y 5). Los datos corresponden a las colectas PI (pre-inmune) y III (dilución 1/200).

Para poder comparar la inmunización con ADN con la infección natural en cuanto a los epítopes reconocidos, se hicieron ELISAs contra GST-*f*-GARP. En la infección natural en humanos se había observado que los sueros de pacientes que reconocían a GARP no lo hacían contra *f*-GARP (Fig. 19). En los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA3-GARP, se observó que los ratones reaccionaban contra el N-terminal y contra la proteína completa, como sucedía también con los sueros de ratones inmunizados con la proteína recombinante (Fig. 36).

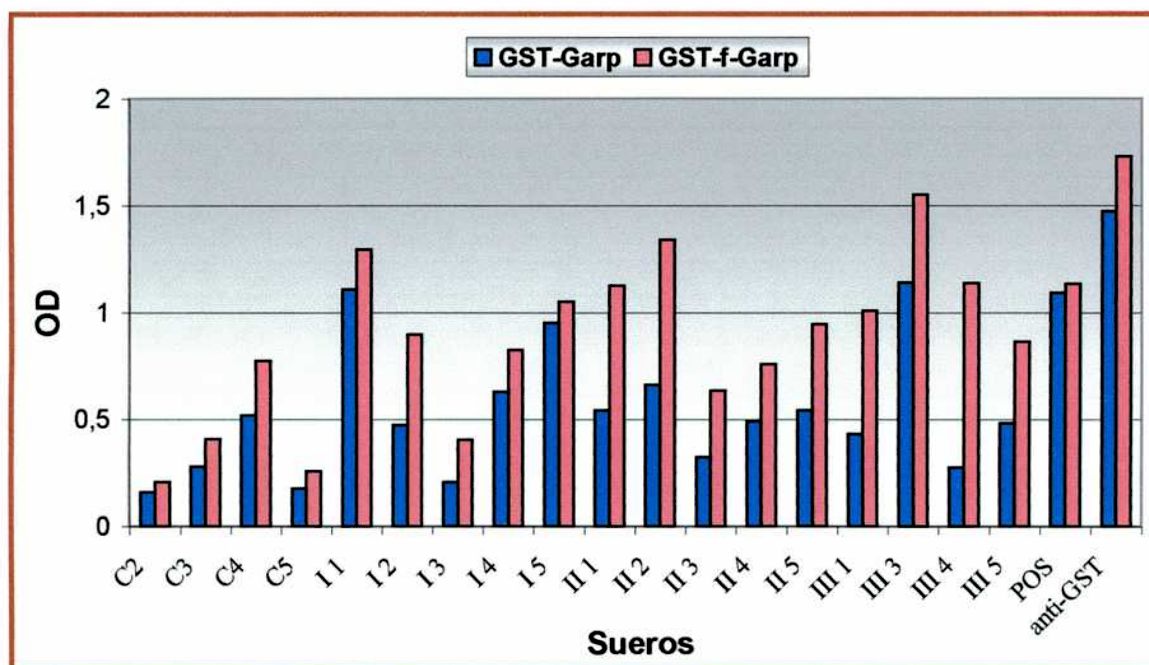


Figura 36: Mapeo de epítopes reconocidos por los sueros de ratones inmunizados con ADN.

Los sueros (dilución 1/50) de ratones inmunizados con pcDNA3 (C2-C5) o con pcDNA3-GARP (I, II y III) se ensayaron por ELISA con las proteínas GST-GARP y GST-*f*-GARP. Controles: sueros policlonales anti-MBP-GARP (POS) y anti-GST (dilución 1/2000).

En los ratones inmunizados con ADN conteniendo el gen *garp* se realizaron electrocardiogramas durante todo el esquema de inmunización. Se registraron las derivaciones DI, DII, DIII, AVR, AVL y AVF. Las principales características

del registro que se tuvieron en cuenta fueron la onda P, el complejo QRS y la onda T. Como control, se realizó el trazado electrocardiográfico de animales inmunizados con el vector no recombinante y no inmunizados. No se observaron alteraciones electrocardiográficas significativas en comparación con los animales controles, tanto en la inmunización con ADN como con la proteína recombinante MBP-GARP. Por otra parte se realizaron ensayos funcionales sobre cardiocitos de ratas neonatas con los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA3-GARP. Tampoco se observó alteraciones en la frecuencia de latidos.

Interacción entre proteínas ribosomales P

Para buscar interacciones de GARP con otras proteínas tratamos de poner a punto el sistema de doble híbrido en levaduras. Como contábamos con las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* se propuso clonarlas en vectores adecuados para la observación de interacciones específicas entre las mismas. Elegimos este sistema ya que en nuestro laboratorio habíamos observado empleando geles nativos de poliacrilamida interacciones entre algunas proteínas ribosomales P recombinantes.

Varios trabajos se hicieron para determinar las interacciones entre algunas de las proteínas ribosomales P, entre ellos los realizados en bacterias, en levaduras y en humanos (Uchiumi y col., 1987; Rich y col., 1987; Tchórzewski, 2002). En general uno de los métodos más utilizados para determinar interacciones específicas entre dos proteínas es el sistema de doble híbrido en levaduras.

En *T. cruzi* podemos encontrar 4 proteínas ribosomales P diferentes: P1, P2 α , P2 β y P0, ya bien caracterizadas por nuestro grupo de trabajo.

Para el clonado de las proteínas ribosomales disponibles se diseñaron oligonucleótidos para su amplificación por la técnica de PCR y la introducción de sitios para enzimas restricción adecuados para colocarlos en el marco de

lectura correcto y de ese modo producir su fusión con las proteínas correspondientes de los plásmido pBTM116 y pVP16.

Los oligonucleótidos que aparean en el 5' de cada gen se colocó el sitio BamHI en el segundo marco de lectura, de este modo, los genes amplificados podían ser introducidos en ambos vectores: pBMT116 y pVP16. En cuanto a los oligonucleótidos que aparean en el 3' se usaron algunos existentes en el laboratorio, con sus correspondientes sitios de terminación y sitios de restricción, tales como XbaI para P0 y P2 β . Para los genes que codifican para las proteínas P1 y P2 α , se diseñaron oligonucleótidos con el sitio de restricción PstI. La estrategia para el clonado fue la siguiente:

- 1) Amplificación de los genes por PCR a partir de plásmidos disponibles en el laboratorio.
- 2) Clonado en el vector pGEM-T (para clonado directo de fragmentos de PCR).
- 3) Extracción de los genes con enzimas de restricción cuyos sitios fueron introducidos en los oligonucleótidos y/o con los presentes en el múltiple sitio de clonado de pGEM-T (NotI, PstI o Sall).
- 4) Ligado de los genes extraídos en los vectores pBMT116 y pVP16 cortados con las enzimas correspondientes.

Para el clonado de los genes en el plásmido pBMT116 se utilizaron los sitios BamHI y PstI o BamHI y Sall (cuando el sitio PstI estaba presente dentro del gen, como en el caso de P0 y P2 β) y para el plásmido pVP16 los sitios BamHI y NotI o BamHI y extremo romo (cuando NotI estaba presente dentro del gen, como en P2 α).

De este modo los fragmentos de aproximadamente de 1000 pb de P0, de 330 pb de P1, 335 pb de P2 α y 321 pb de P2 β fueron introducidos en pBMT116. Para el plásmido pVP16 se clonó solamente hasta el momento el gen correspondiente TcP1. (Fig. 37)

Mientras se trataba de introducir los genes restantes en el vector pVP16, se intentó probar las construcciones obtenidas.

Se cotransformaron con los pares de las construcciones en la cepa L40 de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Esta cepa contiene dos genes reporteros integrados: el gen *HIS3* de levadura y el gen bacteriano *LacZ*. El primer gen reportero *HIS3* se ubica bajo el control de cuatro operadores LexA, mientras que el segundo reportero *lacZ* se ubica bajo el control de ocho operadores LexA. La asociación de las dos proteínas de fusión activa la transcripción de ambos genes, *HIS3* y *lacZ*. Como resultado la levadura crece en un medio en ausencia de histidina y se torna azul cuando la actividad β -galactosidasa es ensayada usando el sustrato cromogénico X-Gal.

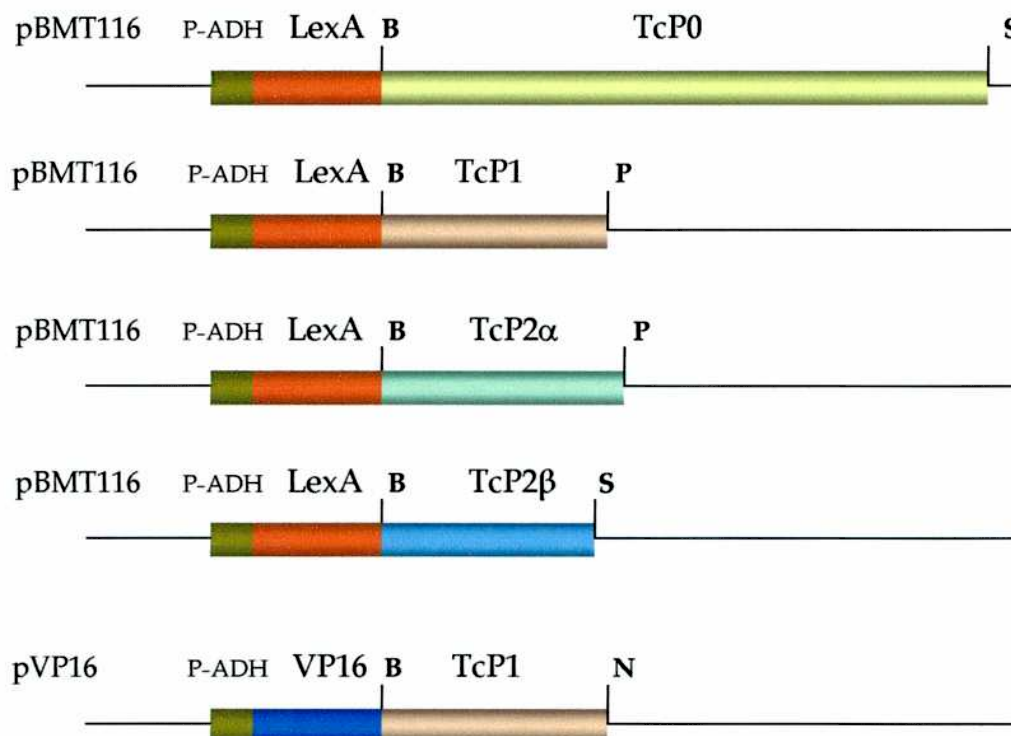


Figura 37: Esquema de los genes correspondientes a las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* clonados en pBMT116 y pVP16

P-ADH promotor de levadura de alcohol deshidrogenasa. Se indican los sitios de restricción con que fueron clonados. B: BamHI S: Sall P: PstI N: NotI

Por lo tanto las transformantes se seleccionaron en medio mínimo sólido carente de triptofano, histidina, uracilo, leucina y lisina (THULL). Se las creció durante 2

ó 3 días y se las paso a una membrana de nylon para luego ser ensayadas con X-gal (Fig. 38)

Como controles se transformaron L40 con el plásmido pBMT116 y pVP16 y se plaquearon en medio mínimo libre de triptofano, uracilo y leucina (TUL). De este modo se comprueba si existe activación de los genes reporteros sin proteínas que interaccionen.

Se observaron interacciones fuertes entre P0-P1 y P2 β -P1 e interacciones débiles con sí misma P1-P1 y entre P2 α -P1.

Los resultados obtenidos pueden verse resumidos en la tabla de la figura 39.

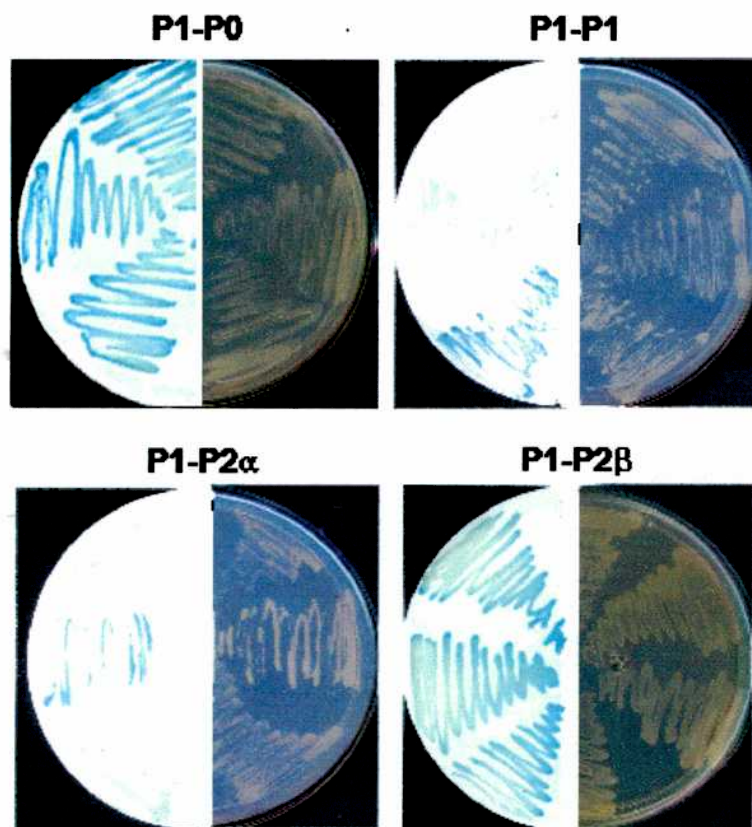


Figure 38: Interacción in vivo de las proteínas ribosomales P.

Filtros con ensayos de actividad β -galactosidasa y placas con medio sólido THULL, donde claramente se ven las interacciones fuertes entre P0-P1 (A) y P2 β -P1 (D); e interacciones débiles entre P1-P1 (B) y P2 α -P1 (C).

	P1	
	THULL	X-gal
P0	+++	+++
P1	+	+
P2 α	+	+
P2 β	+++	+++

Figura 39: Interacciones observadas entre la proteína P1 vs. las proteínas ribosomales P0, P1, P2 α y P2 β .

Se indican con + de acuerdo al crecimiento o intensidad de la reacción cromogénica con X-gal

Discusión

Y

Conclusiones

Discusión:

Con el objetivo de encontrar nuevos antígenos de *T. cruzi* que pudieran originar una reactividad cruzada con los receptores muscarínicos M₂, se rastrearon bibliotecas de expresión de *T. cruzi* en el fago λgt11 con sueros de pacientes con y sin la enfermedad de Chagas con altos niveles de anticuerpos capaces de reconocer a estos receptores. Como resultado, se aislaron fagos que codificaban para antígenos ya caracterizados tales como las proteínas ribosomales P (Levin y col., 1989) y HSP 70 (Levy-Yeyati P. y col., 1991). Por esta razón se decidió que no sería ésta una metodología apropiada para tal búsqueda.

Dado que muchos de los epítopes de proteínas parasitarias que tienen reacción cruzada con secuencias presentes en el 2^{do} bucle extracelular de los receptores β₁ adrenérgico y M₂ muscarínico (AESDE y EDGE respectivamente) presentan residuos aminoacídicos ácidos, decidimos realizar búsquedas de secuencias de ADN que codificaran para regiones de aminoácidos ácidos en bases de datos de ESTs (Expressed Sequence Tags), generados por el Proyecto Genoma de *Trypanosoma cruzi*. Entre las búsquedas realizadas se encontró un EST de 718 pb que poseía bastas regiones de residuos ácidos, el cual podría ser un buen candidato a antígeno. El EST se utilizó para encontrar el gen completo de 3500 pb, que fue clonado en vectores de expresión. Al gen se lo denominó *garp* (glutamic acid rich protein) ya que posee un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 1200 aa rica en residuos de ácido glutámico.

Las experiencias de Southern blot de ADN genómico sugieren que hay una copia de este gen por genoma haploide. Las diferencias encontradas en las bandas producidas en las digestiones de algunas enzimas, en general externas al gen, podrían deberse a las diferencias entre los dos alelos del gen *garp*.

La hibridación del cariotipo electroforético determinó que el gen *garp* se localiza en dos cromosomas de la cepa CL-Brener, probablemente, y como se ha sugerido en otros casos (por ejemplo: CRA, H49, HSP70, KAP), cromosomas homólogos con diferentes tamaños (Henriksson y col., 1990; Cano y col., 1995).

Las bandas se corresponden con los marcadores de peso molecular de 1,1 y 0,7 Mpb.

Los ensayos de Northern blot mostraron un único transcripto de aproximadamente 4 kb, correspondiendo así con el tamaño esperado para este gen y del estimado por la expresión de la proteína GARP en lisados de *T. cruzi*.

Los ensayos de RT-PCR y secuenciación permitieron encontrar el sitio de *trans*-splicing, el cual corresponde al tercer AG siguiente al tracto de pirimidinas, en contraposición con lo que indica la literatura, que en general señala al primer AG como sitio aceptor (Chen y col., 2000). Se ha observado que cuando se mutó el primer AG, se tomó como sitio aceptor del *trans*-splicing al próximo siguiente al mismo, también se observó una pequeña cantidad de transcriptos tomando otros sitios distintos al primer AG (Hummel y col., 2000). En nuestro caso existen dos AG siguientes al tracto de pirimidinas, y el tercero es el utilizado. Podríamos estar en un caso diferente o en el cual el clon obtenido por RT-PCR que fue secuenciado representaba una minoría de transcriptos maduros que no utilizaron el primer AG. Otras teorías proponen que la estructura secundaria de algunos precursores de la molécula ARN puede afectar la disponibilidad del sitio consenso para ser reconocido por la maquinaria del splicing (Solnick, 1985; Deshler y Rossi, 1991).

La comparación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de *garp* con las bases de datos revelaron una identidad de hasta un 72 % con secuencias nucleotídicas de *Trypanosoma brucei* almacenadas en el dbGSS (Genome Survey Sequences), el cual contiene secuencias obtenidas a partir de los extremos de los insertos genómicos presentes en YACs, BACs o cósmidos, o de lecturas preliminares de secuencias genómicas al azar. Por lo tanto la cantidad de nucleótidos con la cual se alinearon no fue mayor de 600 pb, ya que los fragmentos secuenciados en dbGSS rondan aproximadamente por ese tamaño. A pesar de ello podemos decir que el gen *garp* se encuentra, al menos en parte,

en *T. brucei*, aunque no podemos asegurar que el gen se transcriba o se exprese en este parásito. También se observó identidad, aunque más baja (35 %), con *Leishmania major*. La comparación con otras bases de datos no reveló una identidad con secuencias de nucleótidos o aminoácidos conocidas.

El análisis de la composición aminoacídica mostró que GARP contiene 140 residuos de ácido glutámico y 84 de ácido aspártico. Su peso molecular calculado es de 129.668,19 Da y su punto isoelectrico de 4,7. Según el análisis empleando programas como *ProDom*, la estructura de la proteína GARP no sería globular. Además, se determinó la presencia de posibles sitios de N-acetilación, de fosforilación de proteína-quinasa dependiente de cAMP y de cGMP, de fosforilación de proteína-quinasa C, de fosforilación de caseína-quinasa II, de fosforilación de tirosina-quinasa, de N-miristoilación, de amidación y 1 de unión de ATP/GTP.

En este trabajo se expresó el gen *garp* en forma parcial (el fragmento N-terminal de 1550 pb o la proteína *f*-GARP), y en forma completa (GARP) en varios vectores de expresión. El EST no se pudo expresar si bien fue clonado y se corroboró el correcto marco de lectura del mismo, probablemente por el gran contenido de residuos ácidos resultaba tóxico para las bacterias (Dr. González Antonio comunicación personal). La expresión del gen completo quizás evita la exposición de los aminoácidos ácidos hacia la bacteria por lo tanto es tolerado por la misma.

Con los anticuerpos obtenidos de inmunizaciones de ratones con la proteína MBP-GARP se realizaron ensayos de Western Blot con extractos de proteínas totales de epimastigotes, revelando una única banda del peso esperado, confirmando así su expresión en este estadio del parásito. Cuando se compitió con la proteína recombinante MBP-GARP la banda desapareció, demostrando la especificidad de la reacción.

Con Western Blot realizados con fracciones subcelulares de epimastigotes de *T. cruzi*, se observó la localización de GARP en la fracción citoplasmática. Esta localización se confirmó por ensayos de inmunofluorescencia sobre epimastigotes. En éstos no se observó fluorescencia en núcleo ni en kinetoplasto, así como tampoco en la membrana plasmática o el flagelo. Por otra parte se realizaron también ensayos de inmunofluorescencia sobre promastigotes de *Leishmania* los cuales fueron negativos, sugiriendo que si bien el gen puede encontrarse no se estaría expresando, quizás por tratarse de un pseudogen, o los epítopes en este organismo resulten diferentes a los de *T. cruzi*.

Mediante experiencias de ELISA se pudo examinar un mayor número de suero de individuos infectados (60) y no infectados (20) contra GARP. Alrededor del 20 % de los sueros de los pacientes reaccionaron con GARP, mientras que los sueros controles resultaron negativos. Con este porcentaje de sueros podríamos decir que GARP no sería un buen antígeno para ser usado en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Cuando se realizaron ELISAs contra *f*-GARP con los sueros de pacientes que reaccionaban con GARP se observó un resultado negativo. Por otra parte para corroborar lo obtenido por ELISA, se realizaron ensayos de Western blot revelados con sueros de pacientes infectados. Al igual que lo obtenido por ELISA, los sueros que reaccionaban con GARP tampoco lo hacían con *f*-GARP. Cabe recordar que *f*-GARP comprende los 1550 pb N-terminales y no posee las grandes regiones de residuos aminoácidos ácidos. Por lo tanto los epítopes reconocidos por los sueros de los pacientes con la enfermedad de Chagas crónica estarían en la región C-terminal de la proteína. En cuanto a las propiedades antigénicas de GARP y dada la cantidad de regiones con residuos aminoácidos ácidos pensamos que podría haber una reactividad cruzada con receptores cardíacos cuyos epítopes están compuestos en su mayoría por aminoácidos ácidos (AESDE para β -adrenérgicos y EDGE para M₂ muscarínicos). Para corroborar esta hipótesis realizamos la inmunización de ratones con la proteína MBP-GARP. El análisis de la respuesta

humoral inducida en este caso reveló la presencia de anticuerpos dirigidos tanto contra la región C-terminal de la proteína como contra el fragmento representado por *f*-GARP. Las IgG totales de estos ratones no modificaron la frecuencia de latidos de cardiocitos en cultivo y, consecuentemente, los animales inmunizados no sufrieron alteraciones electrocardiográficas significativas.

Como una estrategia alternativa para estudiar la respuesta humoral inducida por GARP, ensayamos la metodología de inmunización con ADN. Con esta metodología pretendíamos reflejar mejor la situación de la infección crónica, ya que la presentación constante de los antígenos parasitarios por las células musculares del hospedador podría ser más adecuada para estudiar la patogénesis de la enfermedad. Además, los antígenos expresados por las células del hospedador presentarían una conformación más parecida a la de la proteína nativa en la infección natural ya que no se presenta fusionada a ninguna proteína "carrier". También con este tipo de inmunización se evita el empleo de adyuvantes que podrían estar induciendo una respuesta diferente a la adquirida naturalmente por la infección del parásito.

Para poner a punto esta metodología y dado que disponíamos en el laboratorio de los anticuerpos policlonales y proteínas recombinantes correspondientes, se utilizaron las proteínas ribosomales TcP2 β y TcP0 de *T. cruzi*.

El gen completo de TcP2 β fue extraído de un clon genómico λ Zap G2a1 (Vázquez y col., 1992) y clonado en el vector de expresión eucarionte pcDNA3. El gen completo de P0 fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de la cepa Tulahuen II, ya que el gen completo no había sido clonado en el laboratorio. Se comprobó la correcta expresión de los genes en células COS7 transfectadas con las construcciones y su posterior revelado con los sueros policlonales disponibles en nuestro laboratorio. En un primer intento, el clon obtenido en pcDNA3 de TcP0 presentaba una mutación provocada por una

delección cerca del N-terminal de la proteína. De este modo se tuvo que repetir los procedimientos para obtener el gen completo con su secuencia correcta. Todos los clones fueron secuenciados para asegurar el marco de lectura y la secuencia correcta de los genes introducidos en el vector pcDNA3. Una vez asegurada la funcionalidad de los plásmidos, se procedió a inmunizar intramuscularmente ratones Balb/c con las construcciones pcDNA3-TcP2 β , pcDNA3-TcP2 β /pcDNA3-GM-CSF y pcDNA3 sin inserto. Los sueros analizados por ELISA contra la proteína recombinante GST-TcP2 β mostraron una muy baja respuesta. Para verificar si la inmunización con estas construcciones había inducido una respuesta primaria en los ratones se desafió con la proteína recombinante MBP-TcP2 β y como control con MBP. Cuando se analizaron los sueros obtenidos a los 7 y 14 días post-inmunización se pudo observar que los ratones inmunizados con pcDNA3-TcP2 β habían producido una respuesta, la cual no mejoraba con la coadministración del plásmido que codificaba para la citoquina. El grupo que fue inmunizado con pcDNA3-TcP2 β y desafiado con MBP-TcP2 β mostraron altos niveles de anticuerpos, mientras los coinmunizados con pcDNA3-TcP2 β /pcDNA3-GM-CSF y con el vector sin inserto la respuesta fue menor. La coinmunización con el gen de GM-CSF fue realizada por que podría estimular una mejor respuesta contra el antígeno expresado (Arai y col. 1990), ya que la coexpresión de esta citoquina resulta en un aumento en la respuesta humoral (activa Th2) y no parece inducir la actividad CTL (Watts y Kennedy, 1999). Sin embargo en este caso no se detectaron anticuerpos, por lo tanto se decidió prescindir de esta construcción en futuras inmunizaciones. Quizás esta falta de respuesta visible inducida por estas construcciones se deba a que las inmunizaciones no hayan sido realizadas correctamente. Esto puede deberse a la falta de práctica en este tipo de inmunizaciones; las mismas deben hacerse en forma precisa en el músculo tibial anterior del ratón y evitar los reflujos producidos por la tensión muscular del animal.

Por lo tanto decidimos repetir las inmunizaciones con pcDNA3-TcP2 β solamente y vector sin inserto. En esta oportunidad anestesiando a los animales la reactividad fue favorable, la mayoría de los sueros de estos ratones presentaban niveles variables de anticuerpos contra TcP2 β .

Para determinar si la presencia de estos anticuerpos provocaban alteraciones electrocardiográficas como lo hacían los producidos por inmunizaciones con la proteína recombinante MBP-TcP2 β , se realizaron electrocardiogramas previos a cada inmunización. Aquí no se observaron cambios en la duración del complejo QRS como en el caso mencionado (López Bergami y col., 1997). A partir del mapeo de los epítopes reconocidos por los anticuerpos generados por inyección con pcDNA3-TcP2 β , podemos concluir que la respuesta está dirigida contra epítopes internos de la proteína (Grippio, 2001). Por el contrario, los anticuerpos anti-TcP2 β de pacientes con Chagas crónico y ratones infectados reconocen exclusivamente el extremo C-terminal de la proteína (R13), y los generados por inmunización con la proteína recombinante reaccionan tanto con péptidos internos como con R13. Los anticuerpos anti-R13 de los pacientes crónicos mostraron una actividad funcional sobre cardiocitos aislados (Kaplan y col, 1997). Estos resultados sugieren una correlación directa entre los anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de la proteína (R13) y la actividad funcional de los anticuerpos.

Se determinaron los perfiles de los isotipos de inmunoglobulinas presente en ambos tipos de inmunizaciones y se observó que en los animales inmunizados con pcDNA3-TcP2 β predominaban del tipo IgG2a, mientras que en los inmunizados con la proteína MBP-TcP2 β presentaban en mayor medida IgG1 e IgG2b. En general las inmunizaciones con ADN por vía intramuscular tienden a producir este tipo de isotipos favoreciendo una respuesta (Th1), en cambio las efectuadas con proteínas o con pistola génica favorecen la aparición de los otros isotipos, especialmente IgG1 (Pertmer y col., 1996; Feltquate y col., 1997; Ulmer y col., 1996). Es decir que en nuestro caso se está favoreciendo una respuesta del

tipo Th1, mientras que para la vía de inmunización con pistola génica o con proteína se induce una respuesta tipo Th2 (Gurunathan y col., 2000).

Se realizaron inyecciones con la construcción pcDNA3-TcP0 con el mismo esquema que con pcDNA3-TcP2 β , aunque la respuesta no fue buena ya que muy pocos ratones reaccionaron positivamente cuando fueron analizados por ELISA. Se determinó los isotipos de los sueros positivos y se encontró que fueron predominantes los del tipo IgG1 sobre los IgG2a, al contrario que en la realizada con pcDNA3-TcP2 β . Tampoco se observaron alteraciones en los electrocardiogramas tomados previos a cada inmunización.

Finalmente, cuando se inmunizó con pcDNA3-GARP se observó la presencia de anticuerpos luego de la primera inmunización. La misma llegó a un pico con la tercera inmunización. Por ELISA se observó que sólo 6 de 15 ratones alcanzaron niveles significativos de anticuerpos. Cabe destacar que siempre hay un porcentaje grande de ratones que no responden a la inmunización con ADN y esto ha sido también observado por otros grupos. Por ejemplo, Hoffman y col. (1994) han reportado que sólo 9 de 16 ratones inmunizados intramuscularmente con un plásmido que codificaba para la proteína del circumsporozoíto de *Plasmodium yoelii* presentaron una respuesta humoral y celular contra esta proteína.

Para comparar si la inmunización con ADN era similar a la infección natural en cuanto a los epítopes reconocidos se realizaron ELISA contra la proteína completa y contra *f*-GARP. En la infección natural, se había observado que los sueros de pacientes con Chagas que reconocían GARP no lo hacían contra *f*-GARP. Los anticuerpos generados por la inmunización con ADN al igual que con la proteína recombinante reconocían también a *f*-GARP, indicando una respuesta diferente a la producida en la infección natural. Tal vez el procesamiento de la proteína para su exposición a las células presentadoras de antígenos sea un factor determinante para la generación de anticuerpos contra esta proteína.

El perfil de isotipos de anticuerpos generados fue de un predominio de IgG2a y de IgG2b para algunos, mientras que de IgG1 e IgG2b y en menor medida IgG2a para los generados por inmunización con la proteína recombinante MBP-GARP.

En ensayos funcionales utilizando los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA3-GARP no se observaron cambios en la frecuencia de los latidos de los cardiocitos. En ambos tipos de inmunizaciones se tomaron electrocardiogramas durante el esquema sin observarse alteraciones.

Por lo tanto podemos concluir que la respuesta contra GARP es diferente entre inmunizaciones y la infección natural en humanos. A pesar del alto contenido en residuos ácidos de GARP, no pudimos demostrar que los anticuerpos anti-GARP tengan actividad funcional o provoquen alteraciones electrocardiográficas. Desafortunadamente, no pudimos hacer ensayos funcionales con anticuerpos humanos específicos contra GARP, dado que los escasos niveles presentes en los sueros no fueron suficientes para estos ensayos.

Como una estrategia alternativa para estudiar la posible función de GARP, se analizó la interacción de ésta con proteínas conocidas de *T. cruzi*. Para ello se introdujo en la proteína recombinante un sitio de fosforilación para proteína quinasa A (PKA). De esta manera la proteína fue marcada con fósforo radiactivo y utilizada para rastrear una biblioteca de expresión realizada en fago λ gt11 de epimastigotes de la cepa Tulahuen II disponible en nuestro laboratorio (Stone, 1997). Con esta metodología utilizada no se observaron resultados, ya que la proteína GARP es grande y se degrada muy fácilmente, quedando así fragmentos de la misma no marcados, o la proteína "carrier" solamente, además de obtenerse falsos positivos. Cabe destacar que este método no sirve para todas las proteínas ya que la inmovilización de las proteínas en las membranas provoca la desnaturalización de algunas proteínas,

que no en todos los casos puede interaccionar con la proteína “señuelo” (Carr y Scott, 1992; Stone y col., 1994). Nosotros quisimos probar esta metodología por ser rápida en comparación con otras técnicas, y porque disponíamos de bibliotecas de expresión en fagos y del plásmido con el sitio de fosforilación. Por otra parte se puso a punto la metodología de doble híbrido en levaduras como otra opción para poder esclarecer la o las funciones de GARP en el parásito al determinar interacciones de la misma con otra u otras proteínas parasitarias. Para la puesta a punto, se ensayaron con las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* las combinaciones de TcP1-TcP0, TcP1-TcP1, TcP1-TcP2 α y TcP1-TcP2 β ; observándose interacciones fuertes entre TcP1-TcP0 y TcP1-TcP2 β , e interacciones más débiles entre las restantes. Esto confirma los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en donde se evidencia la interacción de TcP1-TcP2 β en geles de poliacrilamida nativos y en gradientes de urea (Juri Ayub y col. no publicado), así como también resultados obtenidos en otros organismos (Uchiumi y col., 1987; Rich y col., 1987; Tchórzewski, 2002). Con esta metodología ya puesta a punto se podrá rastrear una biblioteca de ADNc usando a GARP como señuelo. De este modo se podrá secuenciar el ADNc que codifique la proteína que se una a GARP y así, si resultase conocida, poder dilucidar la función de GARP dentro del parásito.

Conclusiones

Partiendo de un EST pudimos localizar un gen que codificaba una proteína de *T. cruzi* con propiedades antigénicas. La proteína GARP es un antígeno de *T. cruzi* compuestos por grandes secuencias de residuos ácidos. Reconocido por aproximadamente un 20 % de los sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica, por tanto no resulta un buen antígeno para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Esta proteína citoplasmática de alrededor de 130 KDa presenta una estructura que no parece ser globular y está codificada por un gen de copia única que presenta un sitio de *trans*-splicing inusual. Dicho gen está presente en otros kinetoplástidos, como *Trypanosoma brucei*, pero no presenta identidad de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas con ningún otro organismo presente en los bancos de datos. Por lo tanto su función es desconocida. A pesar de presentar secuencias de aminoácidos ácidos, no se observó reactividad cruzada en ensayos con cardiocitos de ratas, por lo tanto no se estaría presentando un caso similar a los efectos producidos por los anticuerpos generados en los pacientes con la enfermedad de Chagas contra las proteínas TcP2 β y TcP0, y por ende no se estaría produciendo una actividad agonista sobre receptores cardíacos (M₂ muscarínicos ni β -adrenérgicos).

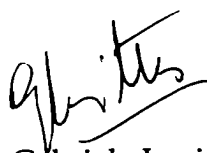
Por otro lado se trató de reproducir en parte los efectos inducidos por las inmunizaciones con proteínas ribosomales P utilizando la metodología de inmunización con ADN ya que podría reproducir de mejor modo la infección natural del parásito, libre de adyuvantes y proteínas "carriers". Con estas experiencias se pudo observar que esta vía estaría induciendo la activación de linfocitos contra otros epítopes diferentes a los inducidos con la proteína recombinante o la infección natural como quedó demostrado en los ensayos realizados con los plásmidos codificando las proteínas TcP2 β y GARP. Esto nos estaría dando la pauta que este tipo de inmunización podría ser útil al momento de generar una vacuna contra *T. cruzi*, ya que los epítopes reconocidos con esta metodología serían diferentes a los detectados en la infección natural. Por lo

tanto un mismo antígeno podría producir diferentes respuestas dependiendo del tipo de inmunización del mismo modo como lo ocurrido con TcP2 β .

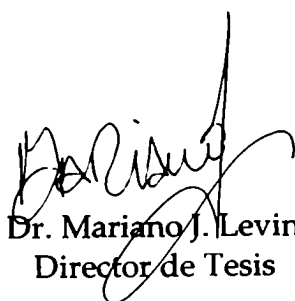
En un futuro próximo se podrán realizar ensayos mediante la metodología de doble híbrido para buscar interacciones posibles con otras proteínas y poder dilucidar la función de GARP dentro del parásito. Así mismo la puesta a punto de este sistema permitió confirmar y abrir nuevas propuestas en cuanto a las interacciones entre las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*, ya que pudimos corroborar las interacciones fuertes entre TcP1-TcP2 β y TcP1-TcP0 que se habían observado *in vitro*.



Lic. Sergio C. Ghio
Doctorando



Dra. Gabriela Levitus
Director Asistente



Dr. Mariano J. Levin
Director de Tesis

Bibliografía

- **Acosta A. M., Sadigursky M., Santos Buch C. A. 1983.** Anti-striated muscle antibody activity produced by *T.cruzi*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172: 364-369.
- **Akbari O., Panjwani N., Garcia S., Tascon R., Lowrie D., Stockinger B. 1999.** DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* 189:169-78
- **Albert M.L., Pearce S.F., Francisco L.M., Sauter B., Roy P., Silverstein R.L., Bhardwaj N. 1998. b** Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via aVb5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188:1359-68
- **Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj N. 1998.a** Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86-89
- **Amons R., Pluijms W., Moller W. 1979.** The primary structure of ribosomal protein eL12/eL12-P from *Artemia salina* 80S ribosomes. *FEBS Lett.* 104: 85-89.
- **Arai K., Lee F., Miyajima A., Miyatake S., Arai N., Yokota, T. 1990.** Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry* 59:783-836.
- **Araujo F.G. 1986.** Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. *Infect Immun.* Jul; 53(1):179-85.
- **Atias A. 1991.** *Parasitología Clínica*, Atias y Neghme. Editorial Mediterráneo.
- **Avila H.A., Sigman D.S., Cohen L.M., Millikan R.C., Simpson L. 1991.** Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* Oct; 48(2):211-21
- **Ban E.M., van Ginkel F.W., Simecka J.W., Kiyono H., Robinson H.L., McGhee J.R. 1997.** Mucosal immunization with DNA encoding influenza hemagglutinin. *Vaccine* 15:811-13

- **Banchereau J., Bazan F., Blanchard D., Briere F., Galizzi L.P., van Kooten C., Liu Y.J., Rousset F., Saeland S. 1994.** The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12:881-922
- **Bendigs S., Salzer U., Lipford G.B., Wagner H., Heeg K. 1999.** CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 29:1209-18
- **Benne R., Van den Burg J., Brakenhoff J.P., Sloof P., Van Boom J.H., Tromp M.C. 1986.** Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell.* Sep 12; 46 (6): 819-26.
- **Bennett S.R.M, Carbone F.R., Karamalis F., Flavell R.A., Miller J., Heath W.R. 1998.** Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478-80
- **Bialy H. 1998.** CYTED-BT : An international biotechnology network that works. *Nature Biotechnology*, 16: 794.
- **Birnboim, H. C., Doly, J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmids DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- **Borda E., Pascual J., Cossio P., De la Vega M., Arana R. & Sterin-Borda L. 1984.** A circulating IgG in Chagas` disease which binds to β -adrenergic receptor of myocardium and modulates their activity. *Clin. Exp. Immunol.* 5: 679.
- **Borst P. 1986.** Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu Rev Biochem.*; 55:701-32.
- **Borst P. 1986.** Gene rearrangements controlling gene expression. *Biochem Int.* Apr; 12(4):567-91.
- **Boyle C.M., Morin M., Webster R.G., Robinson H.L. 1996.** Role of different lymphoid tissues in the initiation and maintenance of DNA-raised antibody responses to the influenza virus H1 glycoprotein. *J. Virol.* 70:9074-78

- Boyle J.S., Koniaras C., Lew A.M. 1997. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int. Immunol.* 9:1897-906
- Boyle J.S., Silva A., Brady J.L., Lew A.M. 1997. DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T-cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14626-31
- Brener Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 27, 347-383.
- Britto C., Cardoso M.A., Monteiro Vanni C.M., Hasslocher- Moreno A., Xavier S.S., Oelemann W., Santoro A., Pirmez C., Morel C.M., Wincker P. 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitol.* 110:241-247.
- Campbell D.A., Thornton D.A. & Boothroyd J.C. 1984. Apparent discontinuous transcription of *Trypanosoma brucei* variant surface antigen genes. *Nature* 311: 350-355.
- Campetella O., Sanchez D., Cazzulo J.J., Frasch A.C.C. 1992. A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. *Parasitol. Today* 8: 378-81.
- Cano M.I., Gruber A., Vazquez M., Cortes A., Levin M.J., Gonzalez A., Degraeve W., Rondinelli E., Zingales B., Ramirez J.L., et al. 1995. Molecular karyotype of clon CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol.* 71:273-278.
- Cardon L.R., Burge C., Clayton D.A., Karlin S. 1994. Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3799-803.
- Carr D.W., Scott J.D. 1992. Blotting and band-shifting: Techniques for studying protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* 17:246-249.

- Casares S., Inaba K., Brumeanu T.D., Steinman R.M., Bona C.A. 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* 186:1481-86
- Chagas C. 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* N. Gen., N. sp., o agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chan P.K., Aldrich M., Cook R., Busch H. 1989. Amino acid sequences of protein B23 phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* 261: 1868-1872.
- Chen S., Anderson K., Moore M.J. 2000 Evidence for a linear search in bimolecular 3' splice site AG selection. *Proc Natl Acad Sci USA* Jan 18;97(2):593-8
- Chen S.C., Jones D.H., Fynan E.F., Farrar G.H., Clegg J.C., Greenberg H.B., Herrmann J.E. 1998. Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J. Virol.* 72: 5757-61
- Condon C., Watkins S.C., Celluzzi C.M, Thompson K., Falo L.D. Jr. 1996. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* 2:1122-28
- Corr M., Lee D.J., Carson D.A., Tighe H. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* 184:1555-60
- Cotrim P., Paranhos G., Mortara R., Wanderley J., Rassi A., Camargo M., Da Silveira F. 1990. Expression in *E. coli* of a dominant immunogen of *T. cruzi* recognized by human chagasic sera. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 519-524.
- Cowdery J.S., Chace J.H., Yi A.K., Krieg A.M. 1996. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN- γ *in vivo* and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 156:4570-75

- **D'Imperio Lima M.R., Eisen H., Minoprio P., Joskowicz M., Coutinho A. 1986.** Persistence of polyclonal activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas`disease. *J. Immunol.* 137: 353.
- **Damian R. 1989.** Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 145: 101.
- **Davis H.L., Jasmin B.J. 1993.** Direct gene transfer into mouse diaphragm. *FEBS Lett.* 333:146-50
- **Davis H.L., Michel M.L., Mancini M., Schleef M., Whalen R.G. 1994.** Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 12:1503-9
- **Deck R.R., DeWitt C.M., Donnelly J.J., Liu M.A., Ulmer J.B. 1997.** Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* 15:71-78
- **Degrave W., Fragoso S.P., Britto C., van Heuverswyn H., Kidane G.Z., Cardoso M.A., Mueller R.U., Simpson L., Morel C.M. 1988.** Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* Jan 1; 27(1):63-70.
- **Deshler J.O., Rossi J.J. 1991.** Unexpected point mutations activate cryptic 3' splice sites by perturbing a natural secondary structure within a yeast intron. *Genes Dev.* 5, 1252-1263
- **Doe B., Selby M., Barnett S., Baenziger J., Walker C.M. 1996.** Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8578-83
- **Donelson J., Gardner M., El-Sayed N. 1999.** More surprises from kinetoplastida. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:2579-2581.
- **Dorfman D.M., Donelson J.E. 1984.** Characterization of the 1.35 kilobase DNA repeat unit containing the conserved 35 nucleotides at the 5'-termini of

- variable surface glycoprotein mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* Jun 25; 12 (12):4907-20.
- **Elizari M., Chiale P.A. 1993.** Cardiac arrhythmias in Chagas' heart disease. *J Cardiovasc. Electrophysiol.*, vol 4: 596-608.
 - **Elkon K., Bonfa E., Llobet R., Dnho W., Weissbach H., Brot N. 1988.** Properties of the ribosomal P2 protein autoantigen are similar to those of foreign proteins antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5186-5189.
 - **Elkon K., Parnassa A.P., Lee Foster C. 1985.** Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J. Exp. Med.* 162: 459-471.
 - **Falo L.D. Jr, Kovacsovics-Akowski M., Thompson K., Rock K.L. 1995.** Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat. Med.* 1:649-53
 - **Feagin J.E., Jasmer D.P., Stuart K. 1987.** Developmentally regulated addition of nucleotides within apocytochrome b transcripts in *Trypanosoma brucei*. *Cell.* May 8; 49 (3): 337-45.
 - **Feltquate D.M., Heaney S., Webster R.G., Robinson H.L. 1997.** Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* 158:2278-84
 - **Ferrari I., Levin M.J., Wallukat G., Elise R., Lebesgue D., Chiale P., Elizari M., Rosenbaum M., Hoebeke J. 1995.** Molecular Mimicry between the Immunodominant Ribosomal Protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a Functional Epitope on Human β 1-Adrenergic Receptor. *J. Exp. Med.* Vol. 182, July 59-65.
 - **Frasch A.C.C., Cazzulo J.J., Aslund L., Pettersson U. 1991.** Comparison of Genes Encoding *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Parasitol. Tod.* vol. 7, no 6.
 - **Freilij H., Altcheh J. 1998.** Respuesta terapéutica al nifurtimox en pacientes de edad pediátrica con enfermedad de Chagas crónico de la ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Revista de Patología Tropical*, v 27, N°1.

- **Freistadt M.S., Cross G.A., Robertson H.D. 1988.** Discontinuously synthesized mRNA from *Trypanosoma brucei* contains the highly methylated 5' cap structure, m⁷GpppA^{*}A^{*}C(2'-O)mU^{*}A. *J Biol Chem.* Oct 15; 263(29):15071-5
- **Fu T.M., Ulmer J.B., Caulfield M.J., Deck R.R., Friedman A., Wang S., Liu X., Donnelly J.J., Liu M.A. 1997.** Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol. Med.* 3:362-71
- **Fynan E.F., Webster R.G., Fuller D.H., Haynes J.R., Santoro J.C., Robinson H.L. 1993.** DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11478-82
- **Galvao L.M., Nunes R.M., Cançado J.R., Brener Z., Krettli A.U. 1993.** Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* Mar-Apr; 87(2):220-3.
- **Ghio S. 1996.** Antígenos de *Trypanosoma cruzi* obtenidos por rastreo inmunológico. Tesis de licenciatura. Dpto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA Buenos Aires, Argentina
- **Goin J., Borda E., Perez Leiros C., Storino R., Sterin-Borda L. 1994.** Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease pathological implications. *J. Auton. Nerv. Sys.* 47 45-52.
- **González A., Lerner T.J., Huecas M., Sosa-Pineda B., Nogueira N., Lizardi P.M. 1985.** Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic. Acids. Res.* 13: 5789-5803.
- **Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A. 2000.** DNA vaccines: immunology, application and optimisation. *Annu. Rev. Immunol.* 18:927-974
- **Halpern M.D., Kurlander R.J., Pisetsky D.S. 1996.** Bacterial DNA induces murine interferon- γ production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- α . *Cell Immunol.* 167:72-78

- Hanke J., Sánchez D.O., Henriksson J., Åslund L., Pettersson U., Frasch A.C.C., Hoheisel J.D. 1996. Mapping the *Trypanosoma cruzi* Genome: Analyses of Representative Cosmid Libraries. *BioTechniques* 21:686-693
- Harding C.V., Song R. 1994. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* 153:4925-33
- Henriksson J., Åslund L., Macina R.A., Franke de Cazzulo B.M., Cazzulo J.J., Frasch A.C., 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* Sep-Oct;42(2):213-23
- Henriksson J., Åslund L., Pettersson U. 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 12:108-114.
- Herrmann J.E., Chen S.C., Jones D.H., Tinsley-Bown A., Fynan E.F., Greenberg H.B., Farrar G.H. 1999. Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles. *Virology* 259:148-53
- Hoare C.A. 1972.. The Trypanosomes of Mammals, Blackwell Scientific Publications.
- Hoffman S.L., Sedegah M., Hedstrom R.C. 1994. Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein nucleic acid vaccine. *Vaccine* 12:1529-33
- Hontebeyrie-Joskowicz M., Said G., Milon G., Marchal G., Eisen H. 1987. L3T4+ cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas` disease. *Eur. J. Immunol.* 17:1027-1033.
- Huang J., Van der Ploeg L.H. 1991. Maturation of polycistronic pre-mRNA in *Trypanosoma brucei*: analysis of trans-splicing and poly(A) addition at nascent RNA transcript from the hsp70 locus. *Mol Cel. Biol.* 11:3180-3190.

- **Huang X.Y., Hirsh D. 1989.** A second trans-spliced RNA leader sequence in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Nov; 86(22): 8640-4.
- **Hudson L. 1985.** Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy. *Parasitol. Today* 1: 6.
- **Hummel H.S., Gillespie R.D, Swindle J. 2000.** Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. *J. Biol. Chem.* 2000 Nov 10; 275(45): 35522-31. *J. Parasitol.* Oct;66(5):830-4.
- **Ibañez C., Affranchino J., Macina R., Reyes M., Leguizamón S., Camargo M., Aslund L., Pettersson U., Frasch A. 1988.** Multiple *T. cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30: 27-34.
- **Iwasaki A., Torres C.A., Ohashi P.S., Robinson H.L., Barber B.H. 1997.** The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J. Immunol.* 159:11-14
- **Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. 1998.** Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* 161:3042-49
- **Jones D.H., Corris S., McDonald S., Clegg J.C., Farrar G.H. 1997.** Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. *Vaccine* 15:814-17
- **Kang Y., Calvo P.A., Daly T.M., Long C.A. 1998.** Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from *Plasmodium yoelii*, a rodent malaria parasite. *J. Immunol.* 161:4211-19

- **Kaplan D. 1995.** Antígenos, epítopes y autoepítopes en la infección por *Trypanosoma cruzi*: Autoinmunidad en la enfermedad de Chagas vs. Autoinmunidad sistémica. Tesis Doctoral Universidad de Buenos Aires.
- **Kaplan D., Ferrari I., López-Bergami P., Mahler E., Levitus G., Chiale P., Hoebeke J., Van Regenmortel M., Levin M. 1997.** Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 10301-10306.
- **Kaplan D., Ferrari I., López-Bergami P., Mahler E., Levitus G., Chiale P., Levin M.J. 1998.** Los anticuerpos antiproteínas ribosomales P estimulan el receptor beta-adrenérgico en la Enfermedad de Chagas pero no en el Lupus Eritematoso Sistémico. *Rev. Argent. Cardiol.* 66: 127-137.
- **Kennedy R., Watts A. 1999.** DNA vaccination strategies against infectious diseases. *J. Parasitology* 29: 1149-1163.
- **Kerner N., Liégeard P., Levin M., Hontebeyrie-Joskowicz M. 1991.** *Trypanosoma cruzi*: Antibodies to a Map-Like Protein in Chronic Chagas' Disease Cross-React with Mammalian Cytoskeleton. *Exp. Parasitol.*, 73.
- **Kierszenbaum F. 1999.** Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.* Apr;12(2):210-23. Review.
- **Kierzenbaum F. 1986.** Autoimmunity in Chagas' disease. *J. Parasitol.* 72: 201-211.
- **Klavinskis L.S., Gao L., Barnfield C., Lehner T., Parker S. 1997.** Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine* 15:818-20
- **Klinman D.M. 1998.** Therapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 8:181-84
- **Klinman D.M., Conover J., Bloom E.T., Weiss W. 1998.** Immunogenicity and efficacy of DNA vaccination in aged mice. *J. Gerontol.* 53:B281-86

- **Klinman D.M., Sechler J.M., Conover J., Gu M., Rosenberg A.S. 1998.** Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J. Immunol.* 160:2388-92
- **Klinman D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., Conover J., Krieg A.M. 1996.** CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2879-83
- **Koberle F. 1968.** Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6: 63-116.
- **Kozak M. 1989.** The scanning model for translation: an update. *J. Cell. Biol.* 108:229
- **Krieg A.M. 1995.** CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J. Clin. Immunol.* 15:284-92
- **Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M. 1995.** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature* 374:546-49
- **Kuklin N., Daheshia M., Karem K., Manickan E., Rouse B.T. 1997.** Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J. Virol.* 71:3138-45
- **Lafaille J., Lins J., Krieger M., Sauton-Padrón T., De Souza W., Goldemberg S. 1989.** Structure and expression of two *T. cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 35: 127-136.
- **Lambrecht F.L. 1965.** Biological variations in trypanosomes and their relations to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 7: 346-352.
- **Laranja F.S., Dias E., Nobrega G., Miranda A. 1956.** Chagas' disease. A clinical epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 14: 1035-1060.

- **Lenardo M.J., Dorfman D.M., Donelson J.E. 1985.** The spliced leader sequence of *Trypanosoma brucei* has a potential role as a cap donor structure. *Mol. Cell. Biol. Sep*; 5(9):2487-90.
- **Leon W., Frasch A.C., Hoeijmakers J.H., Fase-Fowler F., Borst P., Brunel F., Davison J. 1980.** Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta. Apr 30*; 607(2):221-31.
- **Levin M.J., da Silveira F., Frasch A.C.C., Camargo M.E., Lafon S., Degraeve W.M., Rangel-Aldao R. 1991.** Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol. Immunol.* 89, 11-20.
- **Levin M.J., Levitus G., Kerner N., Lafon S., Schijman A., Levy-Yeyati P., Finkielstein C., Chiale P., Schejtmán D., Hontebeyrie-Joskowicz M. 1990.** Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. *Mem. Inst. Osw. Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 85 (4)*: 539-543, oct/dec.
- **Levin M.J., Mesri E., Benarous R., Levitus G., Schijman A., Levy Yeyati P., Chiale P.A., Ruiz A.M., Kahn A., Rosenbaum M.B., Torres H.N., Segura E. 1989.** Identification of mayor *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 530-538.
- **Levin, M.J., Kaplan, D., Ferrari, I., Arteman, P., Vazquez, M., Panebra, A. 1993b.** Humoral autoimmune response in Chagas disease: *Trypanosoma cruzi* ribosomal antigens as immunizing agents. *FEMS Microbol Medical Immunol.* 7, 205-210.
- **Levin, M.J., Vazquez, M., Kaplan, D., Schijman, A.G. 1993a.** The *Trypanosoma cruzi* Ribosomal P Protein Family: Classification and Antigenicity. *Parasitology Today*, vol. 9, no 10.
- **Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R. 3rd, Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page**

- F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* Feb;27(1):37-58.
- Levitus G. 1991. Autoinmunidad humoral en la enfermedad de Chagas crónica: anticuerpos contra las proteínas ribosomales P. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.
 - Levitus G., Hontebeyrie-Joskowicz M., Van Regenmortel M.H.V., Levin M.J. 1991. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 413-417.
 - Levy-Yeyati P., Bonnefoy S., Mirkin G., Debrabant A., Lafon S., Panebra A., Gonzalez-Cappa E., Dedet J., Hontebeyrie-Joskowicz M., Levin M. 1991. The 70-kDa heat-shock protein is a major antigenic determinant in human *T. cruzi*/L. *braziliensis braziliensis* mixed infection. *Immunol. Letters*, 31: 27-34
 - Ley V., Robbins E., Nussenzweig V., Andrews N. 1990. The exit of *T. cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* 171: 401-413.
 - Livingston J.B, Lu S., Robinson H., Anderson D.J. 1998. Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Infect. Immun.* 66:322-29
 - López Bergami P., Cabeza Meckert P., Kaplan D., Levitus G., Elías F., Quintana F., Van Regenmortel M., Laguens R., Levin M.J. 1997. Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18: 75-85.
 - Maldonado-Lopez R., De Smedt T., Michel P., Godfroid J., Pajak B., Heirman C., Thielemans K., Leo O., Urbain J., Moser M. 1999. CD8a⁺ and CD8a⁻ sub-classes of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189:587-92
 - Mesri E.A., Levitus G., Hontebeyrie-Joskowicz M., Dighiero G., Van Regenmortel M.H., Levin M.J. 1990. Major *Trypanosoma cruzi* determinant

- in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1219-1224.
- Michels P.A.M., Opperdoes F.R. 1991. The evolutionary origin of glycosomes. *Parasitol Today* 7: 105-109.
 - Miller S.I., Wirth D.F. 1988. Trans-splicing in *Leishmania enriettii* and identification of ribonucleoprotein complexes containing the spliced leader and U2 equivalent RNAs. *Mol. Cell. Biol.* Jun;8(6):2597-603.
 - Minoprio P., Burlen O., Pereira P., Guilbert B., Hontebeyrie-Joskowicz M., Coutinho A. 1988. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28: 553-561.
 - Minota S., Jarjour W.N., Suzuki N., Nojima Y., Roubey R.A.S., Toshihide M., Yamada A., Hosoya T., Takaku F., Winfield J.B. 1991. Autoantibodies to nucleolin in systemic lupus erythematosus and other diseases. *J. Immunol.* 146: 2249-2252.
 - Moller W. 1991. The ribosome and translation factors. *Biochimie*, 73, 1093-1100.
 - Moncayo A., Luquetti A.O. 1990. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 489-495.
 - Moser D.R., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* Jul; 27(7):1477-82.
 - Muhich M.L., Boothroyd J.C. 1988. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* Sep; 8(9):3837-46.
 - North M.J., Mottram J.C., Coombs G.H. 1990. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol. Today* 6:270-275.
 - O'Garra A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-83

- **Opperdoes F.R., Borst P. 1977.** Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.*, 80; 360-364.
- **Paranhos G.S., Cotrim P.C., Mortara R.A., Rassi A., Corral R., Freilij H.L., Grinstein S., Wanderley J., Camargo M.E., Franco da Silveira J. 1990.** *Trypanosoma cruzi*: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera. *Exp. Parasitol.* 71: 284-293.
- **Peralta J.M., Filardi L., Lourdes M., Torres S. 1980.** *T. cruzi* antibodies in mice infected with different strains of *T. cruzi*. *J. Parasitol.* 66: 342-344.
- **Perry K.L., Watkins K.P., Agabian N. 1987.** Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Dec; 84(23):8190-4.
- **Persing D., Smith T., Tenover F., White T. 1993.** Diagnostic molecular microbiology. *ASM press, USA.*
- **Pertmer T.M., Roberts T.R., Haynes J.R. 1996.** Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.* 70:6119- 25
- **Petry K., Eisen H. 1989.** Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today*, 5:111-116.
- **Petry K., Van Vooris W. 1991.** Antigens of *T. cruzi* that mimics mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142: 151-156.
- **Porgador A., Irvine K.R., Iwasaki A., Barber B.H., Restifo N.P., Germain R.N. 1998.** Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8⁺ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* 188:1075-82

- **Pulendran B., Smith J.L., Caspary G., Brasel K., Pettit D., Maraskovsky E., Maliszewski C.R. 1999.** Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1036-41
- **Raz E., Carson D.A., Parker S.E., Parr T.B., Abai A.M., Aichinger G., Gromkowski S.H., Singh M., Lew D., Yankauckas M.A., Baird S.M., Rhodes G.H. 1994.** Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9519-23
- **Razin A., Friedman J. 1981.** DNA methylation and its possible biological roles. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 25:33-52
- **Requena J.M., Jimenez-Ruiz A., Soto M., R. Assiego, Santarén J.F., Lopez M.C., Patarroyo M. E., and Alonso C. 1992.** Regulation of hsp 70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53: 201-212.
- **Rich B.E., Steitz, J. A. 1987.** Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol. Cell. Biol.* Nov, 7(11), 4065-4074.
- **Ridge J.P., Di Rosa F., Matzinger P. 1998.** A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-78
- **Rissoan M.C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefyt R., Liu Y.J. 1999.** Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183-86
- **Robinson H.L., Boyle C.A., Feltquate D.M., Morin M.J., Santoro J.C., Webster R.G. 1997.** DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin and nucleoprotein-expressing DNAs. *J. Infect. Dis.* 176:S50-55 (Suppl)
- **Roman M., Martin-Orozco E., Goodman J.S., Nguyen M.D., Sato Y., Ronaghy A., Kornbluth R.S., Richman D.D., Carson D.A., Raz E. 1997.**

- Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1- promoting adjuvants. *Nat. Med.* 3:849- 54
- **Rosenbaum M.B. 1964.** Chagasic myocardiopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 7: 99-225.
 - **Roy K., Mao H.Q., Huang S.K., Leong K.W. 1999.** Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.* 5:387-91
 - **Sadigursky M., Acosta A.M., Santos Buch C.A. 1982.** Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *T. cruzi* clone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 934-941.
 - **Said H., Joskowicz A., Barreira A., Eisen H. 1985.** Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. *Ann. Neural.* 18 676-683.
 - **Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory press.
 - **Santos Buch C.A., Acosta A. M., Zweerink H.J., Sadigursky M. 1985.** Primary muscle disease: definition of a 25 Kd polypeptide myopathic specific Chagas antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 37: 334-350.
 - **Sasaki S., Fukushima J., Hamajima K., Ishii N., Tsuji T., Xin K.Q., Mohri H., Okuda K. 1998 c.** Adjuvant effect of Ubenimex on a DNA vaccine for HIV-1. *Clin. Exp. Immunol.* 111:30-35
 - **Sasaki S., Hamajima K., Fukushima J., Ihata A., Ishii N., Gorai I., Hirahara F., Mohri H., Okuda K. 1998a.** Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine. *Infect. Immun.* 66:823-26
 - **Sasaki S., Sumino K., Hamajima K., Fukushima J., Ishii N., Kawamoto S, Mohri H., Kensil C.R., Okuda K. 1998b.** Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes. *J. Virol.* 72:4931-39

- Sato Y., Roman M., Tighe J., Lee D., Corr M., Nguyen M.D., Silverman G.J., Lotz M., Carson D.A., Raz E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273:352-54
- Schejtman D., Levitus G., Chiale P., Levin M., Elizari M., Rosembaun M. 1990. Determinantes antigénicos diferenciales de *T. cruzi* en pacientes chagásicos crónicos con y sin cardiomiopatía. Abstract, 27th Argentinian Cardiology Congress.
- Schijman A.G. 1992. Familia de proteínas ribosomales P en *T. cruzi*. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.
- Schijman A.G., Levitus G., Levin M.J. 1992. Characterization of the C-terminal region of a *T. cruzi* 38-kDa ribosomal P0 protein that does not react with lupus anti-P autoantibodies. *Immunol. Letters*. 33: 15-20.
- Schoenberger S.P., Toes R.E.M., van der Voort E.I.H., Offringa R., Melief C.J.M. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-83
- Schofield C.J., Dias J.C. 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol.*;42:1-27.
- Seder R.A., Paul W.E. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu. Rev. Immunol.*12:635-73
- Segura E.L. 1987. Xenodiagnosis. In *Chagas' disease vectors*. Vol II. Anatomic and physiological aspects (Brenner, R.; Stoka, A., eds) pp 41-45. CRC Press.
- Shi Z., Curiel D.T., Tang D.C. 1999. DNA based non-invasive vaccination onto the skin. *Vaccine* 17:2136-41.
- Simmonds M., Shearer M., Kennedy R. 1997. DNA vaccines: From principle to practice. *Parasitol. Today* 13: 328-331.
- Simpson L. 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.*; 41:363-82.

- **Simpson L., Neckelmann N., de la Cruz V.F., Simpson A.M., Feagin J.E., Jasmer D.P., Stuart J.E. 1987.** Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* May 5; 262(13):6182-96.
- **Sloof P., van den Burg J., Voogd A., Benne R. 1987.** The nucleotide sequence of a 3.2 kb segment of mitochondrial maxicircle DNA from *Crithidia fasciculata* containing the gene for cytochrome oxidase subunit III, the N-terminal part of the apocytochrome b gene and a possible frameshift gene; further evidence for the use of unusual initiator triplets in trypanosome mitochondria. *Nucleic Acids Res.* Jan 12;15(1):51-65.
- **Sloof P., van den Burg J., Voogd A., Benne R., Agostinelli M., Borst P., Gutell R., Noller H. 1985.** Further characterization of the extremely small mitochondrial ribosomal RNAs from trypanosomes: a detailed comparison of the 9S and 12S RNAs from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei* with rRNAs from other organisms. *Nucleic Acids Res.* Jun 11;13(11):4171-90.
- **Smith A.L., de St Groth B.F. 1999.** Antigen pulsed CD8a dendritic cells generate an immune response after subcutaneous injection without homing to the draining lymph node. *J. Exp. Med.* 189:593-98
- **Solnick D. 1985** Alternative splicing caused by RNA secondary structure. *Cell* 43, 667-676
- **Stacey K.J., Sweet M.J., Hume D.A. 1996.** Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.* 157:2116- 22
- **Staerz U.D., Karasuyama H., Garner A.M. 1987.** Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* 329:449-51
- **Sterin-Borda L., Pérez Leiros C., Wald M., Cremaschi G., Borda E. 1988.** Antibodies to beta-1 and beta-2 adrenoceptors in Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.* 74, 349.
- **Stone J.M. 1997.** Phage-based expression cloning to identify interacting proteins. *Current Protocols in Molecular Biology.* sup 39 20.3.1-20.3.9

- **Stone J.M., Collinge M.A., Smith R.D., Horn M.A., Walker J.C. 1994.** Interaction of a protein phosphatase with an *Araucaria* serine-threonine receptor kinase. *Science* 266:793-795.
- **Stuart K. 1991.** RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Curr. Opin. Genet. Dev.* Oct; 1(3):412-6.
- **Sturm N.R., Degraeve W., Morel C., Simpson L. 1989.** Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* Mar 15; 33(3):205-14.
- **Sturm N.R., Simpson L. 1990.** Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell.* Jun 1; 61(5): 879-84.
- **Suss G., Shortman K. 1996.** A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1789-96
- **Szarfman A., Terranova V., Renard S., Foidart J., Lima F., Scheinman J., Martin G. 1982.** Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J. Exp. Med.* 155, 1161-1171.
- **Tang D.C., De Vit M., Johnston S.A. 1992.** Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-54
- **Tarleton R.L., Zhang L. 1999.** Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today.* Mar; 15(3):94-9. Review.
- **Tchórzewski Marek. 2002.** Molecules in focus: The acidic ribosomal P proteins *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 911-915
- **Torres C.A., Iwasaki A., Barber B.H., Robinson H.L. 1997.** Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J. Immunol.* 158:4529-32
- **Uchiumi T., Wahba A.J., Traut R.R. 1987** Topography and stoichiometry of acidic proteins in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5580-5584.

- **Udono H., Srivastava P.K. 1993.** Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* 178:1391-96
- **Ulises de Carvalho T., De Souza W. 1989.** Early events related with the behaviour of *T. cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell. Struct. Funct.* 14: 383-392.
- **Ulmer J.B., Deck R.R., Dewitt C.M., Donnelly J.I., Liu M.A. 1996.** Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 89:59-67.
- **Ulmer J.B., Donnelly J.J., Liu M.A. 1996.** DNA vaccines promising: a new approach to inducing protective immunity. *ASM News*, 62: 476-479
- **Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dwarki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., De Witt D.M., Friedman A., Hawe L.A., Leander K.R., Martinez D., Perry H.C., Shiver J.W., Montgomery D.C., Liu M.A. 1993.** Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745-49
- **Van der Ploeg L.H. 1986.** Discontinuous transcription and splicing in trypanosomes. *Cell*. Nov 21; 47(4):479-80.
- **Van Voorhis W.C., Eisen H. 1989.** F1-160: a surface antigen of *T. cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169: 641-652.
- **Vanhamme L., Pays E. 1995.** Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiology Reviews*. 59:223-240.
- **Vasella E., Braun E., Roditi I. 1994.** Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in procyclic expression site: a dual roll for polypirimidine tracts in trypanosomes? *Nucl Acids Res.* 22:1359-1364.
- **Vázquez M., Schijman A., Panebra A., Levin M. 1992.** Nucleotide sequence of a cDNA encoding another *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P2 type protein (TcP2β). *Nucleic Acids Res.* 20:2893

- Wang B., Dang K., Agadjanyan M.G., Srikantan V., Li F., Ugen K.E., Boyer J., Merva M., Williams W.V., Weiner D.B. 1997. Mucosal immunization with a DNA vaccine induces immune responses against HIV-1 at a mucosal site. *Vaccine* 15:821-25.
- Watts A.M., Kennedy R.C. 1999. DNA vaccination strategies against infectious diseases. *Int. J. Parasitol.* 29:149-163
- WHO (World Health Organization) 1991. Control of Chagas disease: Report a WHO Expert Committee, Geneva. *WHO Technical Report Series* 811:1-42.
- WHO (World Health Organization) 1997. Chagas disease. Interruption of transmission. *Weekly Epidemiol. Rec.* 72: 1-5.
- WHO (World Health Organization) 2001. <http://www.who.com>
- Wincker P., Britto C., Borges-Pereira J., Cardoso M.A., Oelemann W. and Morel C.M. 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 771-777.
- Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247:1465-68
- Wraith D.C., Vessey A.E., Askonas B.A. 1987. Purified influenza virus nucleoprotein protects mice from lethal infection. *J. Gen. Virol.* 68:433-40
- Wrightsman R., Krassner S., Watson J. 1982. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect Immun.* May; 36(2):637-44.
- Yamamoto S., Yamamoto T., Shimada S., Kuramoto E., Yano O., Kataoka T., Tokunaga T. 1992. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol. Immunol.* 36:983-97

- **Yang N.S., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., McCabe D. 1990.** In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9568-72
- **Zinker S., Warner J.R. 1976.** The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 251: 1799-1807.
- **Grippio V. 2001.** Empleo de la metodología de inmunización con ADN en el estudio de la inmunopatogénesis de la enfermedad de Chagas crónica. Tesis de licenciatura. FCEyN, Universidad de Buenos Aires.
- **Elías R., Ferrari I., Wallukat G., et al. 1996.** Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J. Immunol.*; 157:4203-11.