

## Tesis de Posgrado

# Clonado y caracterización de genes que codifican antígenos de trypanosoma cruzi

Ibañez, Carlos

1989

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

**Cita tipo APA:**

Ibañez, Carlos. (1989). Clonado y caracterización de genes que codifican antígenos de trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2180\\_Ibanez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2180_Ibanez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Ibañez, Carlos. "Clonado y caracterización de genes que codifican antígenos de trypanosoma cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2180\\_Ibanez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2180_Ibanez.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**CLONADO Y CARACTERIZACION DE GENES QUE  
CODIFICAN ANTIGENOS DE *Trypanosoma cruzi***

CARLOS IBAÑEZ

2180  
Ej: 2.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOLOGICAS

DIRECTOR : DR. CARLOS FRASCH

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS FUNDACION CAMPONAR  
BUENOS AIRES, 1989

till Annalena,  
naturligtvis

## Indice general

	página
<b>Indice de figuras y tablas</b>	vi
<b>Agradecimientos</b>	viii
<b>Abreviaturas</b>	x
<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	2
Generalidades de los tripanosomas	2
Ubicación taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
En el huésped invertebrado	4
En el huésped vertebrado	5
Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Heterogeneidad de las poblaciones de <i>T. cruzi</i>	7
<b>La enfermedad de Chagas</b>	8
Generalidades	8
Formas clínicas. Enfermedad de Chagas aguda y crónica	9
Quimioterapia	11
<b>Inmunología de la enfermedad de Chagas</b>	11
Inmunidad humoral y celular	11
Autoinmunidad	15
<b>Antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	17
Composición antigénica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Funciones y propiedades asociadas a antígenos de <i>T. cruzi</i>	23
Antígenos involucrados en protección	23
Antígenos involucrados en diferenciación	25
Antígenos involucrados en la evasión de la respuesta inmune	26
Antígenos involucrados en la interacción y penetración de la célula huésped	28
Clonado de genes que codifican antígenos de <i>T. cruzi</i>	29
<b>Diagnóstico de la enfermedad de Chagas</b>	31
<b>Perspectivas de vacunación en la enfermedad de Chagas</b>	34

<b>Objetivos y alcances de la presente investigación</b>	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
Parásitos	38
Cepas	38
Cultivo de parásitos	38
Obtención de tripomastigotes de sangre	39
Sueros	39
Sueros de infección	39
Sueros anti-proteínas de fusión y anti-péptidos sintéticos	40
Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos. Electroforesis, transferencia e hibridación	41
ADN nuclear	41
ARN	41
Secuenciación de ADN	41
Clonado de ADN en $\lambda$ gt11	42
"Screening" inmunológico	42
Selección de anticuerpos	43
Electroforesis de proteínas, transferencia y reacción con sueros	44
Detección de anticuerpos contra productos clonados en sueros de infección	45
Inmunofluorescencia	45
<b>RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>Clonado de genes que codifican antígenos de <i>T. cruzi</i></b>	<b>47</b>
Identificación de 12 grupos de clones recombinantes	47
"Screening" diferencial con distintos sueros de infección	49
<b>Caracterización de los genes aislados y sus productos</b>	<b>51</b>
Identificación de las proteínas nativas homólogas a los productos de los clones aislados	51
Identificación de los ARN mensajeros homólogos a los fragmentos clonados	53
Organización genómica	55
Estructura primaria	58
<b>Producción y utilización de proteínas de fusión y péptidos sintéticos</b>	<b>68</b>
Los productos de los clones aislados son altamente inmunogénicos	69

Las unidades repetitivas son antigénicamente activas durante la infección con <i>T. cruzi</i>	72
<b>Relevancia antigénica de los productos clonados: detección de anticuerpos en sueros de infección</b>	74
Reactividad de sueros de animales infectados con distintas cepas	74
Reactividad de sueros de pacientes crónicos	76
Reactividad de sueros de pacientes agudos	78
<b>Expresión y localización de los antígenos clonados</b>	81
Expresión de los antígenos clonados en tripomastigotes de sangre	81
Detección de los antígenos clonados en la superficie de parásitos vivos	84
La proteína 7 es liberada en sangre por tripomastigotes	85
<b>DISCUSION</b>	90
Clonado y caracterización de genes que codifican antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
Antígenos con epitopes repetitivos en <i>T. cruzi</i>	93
Antígenos liberados en sangre por tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	97
Antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i> en infecciones crónicas y agudas	98
Utilización de antígenos clonados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	101
<b>Conclusiones</b>	104
<b>APENDICE</b>	106
Secuencias de genes que codifican antígenos de <i>T. cruzi</i>	107
<b>REFERENCIAS</b>	113

## Indice de Figuras y Tablas

	página
<b>Fig. 1.</b> Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
<b>Fig. 2.</b> Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas	9
<b>Fig. 3.</b> Identificación de grupos de clones recombinantes con anticuerpos seleccionados	48
<b>Fig. 4.</b> Detección de proteínas nativas de <i>T. cruzi</i> con anticuerpos seleccionados	52
<b>Fig. 5.</b> Detección de especies de ARN homólogos a los insertos de los clones recombinantes	54
<b>Fig. 6.</b> Detección de genes homólogos a los insertos de los clones recombinantes	57
<b>Fig. 7.</b> Localización de las secuencias obtenidas y de las regiones repetitivas	59
<b>Fig. 8.</b> Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las unidades repetitivas	60
<b>Fig. 9.</b> Predicciones sobre la estructura secundaria de los productos clonados	63
<b>Fig. 10.</b> Comparación de la secuencia de la repetición del clon 36 con la de la proteína asociada a microtúbulos de <i>T. brucei</i>	67
<b>Fig. 11.</b> Reactividad de sueros anti-proteínas de fusión con los productos clonados y con péptidos sintéticos	70
<b>Fig. 12.</b> Reactividad de sueros anti-péptidos con los productos clonados y con péptidos sintéticos	71
<b>Fig. 13.</b> Detección de anticuerpos contra las unidades repetitivas en sueros de infección	73
<b>Fig. 14.</b> Detección de anticuerpos contra los productos clonados en sueros de pacientes y de animales infectados	80
<b>Fig. 15.</b> Expresión de los antígenos clonados en parásitos de sangre y de cultivo	83
<b>Fig. 16.</b> Detección de antígenos en sobrenadantes de cultivos de células infectadas con <i>T. cruzi</i>	86
<b>Fig. 17.</b> Detección del antígeno 7 en sobrenadantes de tripomastigotes y en el plasma de ratones infectados	88
<b>Tabla I.</b> Identificación de doce grupos de clones recombinantes diferentes	49
<b>Tabla II.</b> "Screening" diferencial con sueros de infección	50

<b>Tabla III.</b> Identificación de proteínas nativas y ARN mensajeros homólogos a los clones recombinantes	56
<b>Tabla IV.</b> Reactividad de sueros de animales infectados con distintas cepas de <i>T. cruzi</i> con los productos clonados	75
<b>Tabla V.</b> Reactividad de sueros de pacientes crónicos de enfermedad de Chagas con los productos clonados	77
<b>Tabla VI.</b> Reactividad de sueros de pacientes agudos de enfermedad de Chagas con los productos clonados	79
<b>Tabla VII.</b> Reactividad comparada de sueros de animales infectados y de pacientes crónicos y agudos	81
<b>Tabla VIII.</b> Inmunofluorescencias de parásitos vivos de <i>T. cruzi</i>	84



## **Agradecimientos**

Quisiera expresar mi más sincera gratitud a mi director de tesis, Dr. Carlos Frasch, por su conducción y apoyo desde mis primeros pasos en biología molecular. El me ha ofrecido su confianza y estímulo en todo momento, y yo me he beneficiado con su conocimiento y experiencia, y con las enormes oportunidades que me ha brindado.

Quisiera también expresar un especial agradecimiento a mi amigo y compañero José Luis Affranchino. Juntos compartimos desde el comienzo esta aventura. Su apoyo y compañerismo han sido un soporte invaluable en todo momento.

También quiero agradecer la ayuda y el estímulo de mis compañeros de laboratorio, Roberto Macina y Beatriz Reyes, y de todos mis amigos en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas. Un "gracias" muy especial para Susana Lequizamón por las inmunofluorescencias y por el suministro de tripomastigotes de cultivo, para Silvia Araujo por su indispensable ayuda en el manejo del "material pesado": ratones, vinchucas y tripomastigotes, y para Rubén Quesada por el suministro de ratones infectados.

Quisiera agradecer también el apoyo y la ayuda de mis compañeros y amigos del Medical Genetics Department de la Universidad de Uppsala, Suecia, especialmente al Prof. Ulf Pettersson por su importante apoyo científico y a Lena Åslund por su amistad a toda prueba y generosidad sin límites.

También va mi agradecimiento al Dr. Daniel Sánchez por el suministro de los sueros de conejos infectados, al Dr. Basombrío por los sueros de ratones infectados, a los Dres. A. Solari, A. Marcipar, M. E. Camargo y A. O. Luquetti por los sueros de pacientes chagásicos, y al Dr. J. J. Cazzulo por el suministro de epimastigotes de cultivo.

Un agradecimiento especial para Annalena Joki, su empuje y energía han sido mi motor en todo momento.

Finalmente, quisiera expresar mi gratitud a mi familia y amigos por su incondicional apoyo y ayuda.

El presente trabajo recibió apoyo financiero del UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, de la Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y de la Secretaría de Ciencia y Técnica, Argentina.

## **Abreviaturas**

aa'	aminoácidos
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BSA	seroalbúmina bovina
Ig	inmunoglobulina
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
KLH	"keyhole limpet hemocyanin"
kpb	kilopares de bases
NK	"natural killer"
P.I.	post-infección
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
pfu	unidades formadoras de placas
pI	punto isoeléctrico
SDS	sodio dodecil sulfato
SSC	buffer citrato salino
TBS	buffer tris salino
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## **INTRODUCCION**

## **Biología de *Trypanosoma cruzi***

### **Generalidades de los tripanosomas**

Los tripanosomas son protozoos parásitos que causan serias enfermedades en el hombre y en animales domésticos en Africa y América Latina. Son flagelados digenéticos que presentan durante su ciclo de vida alternancia entre un huésped invertebrado y uno vertebrado. En este último se localizan preferentemente en el torrente sanguíneo y, según la especie del parásito, también en forma intracelular, principalmente en músculo cardíaco, sistema digestivo y células del sistema nervioso autónomo.

Los tripanosomas, como los demás géneros del orden kinetoplástida, poseen una región especializada dentro de la mitocondria que los caracteriza: el kinetoplasto. En esta región se localiza el ADN mitocondrial o kinetoplástico: compleja red de ADN formada por moléculas de mini y maxicírculos concatenados entre sí.

Dos especies de tripanosomas han concentrado, por su importancia sanitaria, la mayoría de las investigaciones realizadas sobre estos parásitos. *Trypanosoma brucei* produce la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño en el hombre y en animales silvestres y domésticos. Es transmitido por el díptero *Glossina morsitans* (mosca tsé-tsé) y afecta áreas importantes de Africa. *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Su insecto vector es el redúvido *Triatoma infestans* (vinchuca). Más de 20 millones de personas son serológicamente positivas para *Trypanosoma cruzi* en América Latina. La incidencia de la infección ha sido estimada en alrededor de 800000 casos nuevos por año.

Además del grave problema sanitario que representan, los tripanosomas poseen numerosas peculiaridades cuya investigación ha conducido al descubrimiento de nuevas estructuras y mecanismos. Entre ellos se encuentran la variación antigénica en tripanosomas africanos, la transcripción discontinua y la edición del ARN mensajero. Esto ha hecho de los tripanosomas un objeto de interés no solo para los investigadores relacionados con terapia y profilaxis sino también para los bioquímicos y biólogos moleculares.

## Ubicación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*

Los protozoos son organismos eucariotas unicelulares. En la clasificación moderna (Leedale, 1974) son considerados un subreino del reino Protista. Los tripanosomas son protozoos cuya ubicación taxonómica, según una revisión del Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoología (The Comitee on Systematics, 1980), es la siguiente:

Phylum Sarcomastigophora: un sólo tipo de núcleo; flagelo, pseudopodio o ambos tipos de organelas.

Subphylum Mastigophora: uno o más flagelos; reproducción asexual por fisión binaria; reproducción sexual en algunos grupos.

Clase Zoomastigophora: cloroplastos ausentes; uno o más flagelos.

Orden Kinetoplastida: uno o dos flagelos que emergen de una depresión; una sola mitocondria que se extiende por toda la célula como un único tubo o una red de tubos; generalmente una organela autoreplicante, el kinetoplasto; aparato de Golgi típicamente en la región de la depresión flagelar; parásitos y de vida libre.

Suborden Trypanosomatina: un sólo flagelo libre o con membrana ondulante; kinetoplasto pequeño y compacto; parásitos.

Familia Trypanosomatidae: incluye varios géneros monogénéticos (parásitos de invertebrados): *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* y géneros digenéticos (parásitos que alternan con huésped vertebrado e invertebrado): *Leishmania*, *Trypanosoma*.

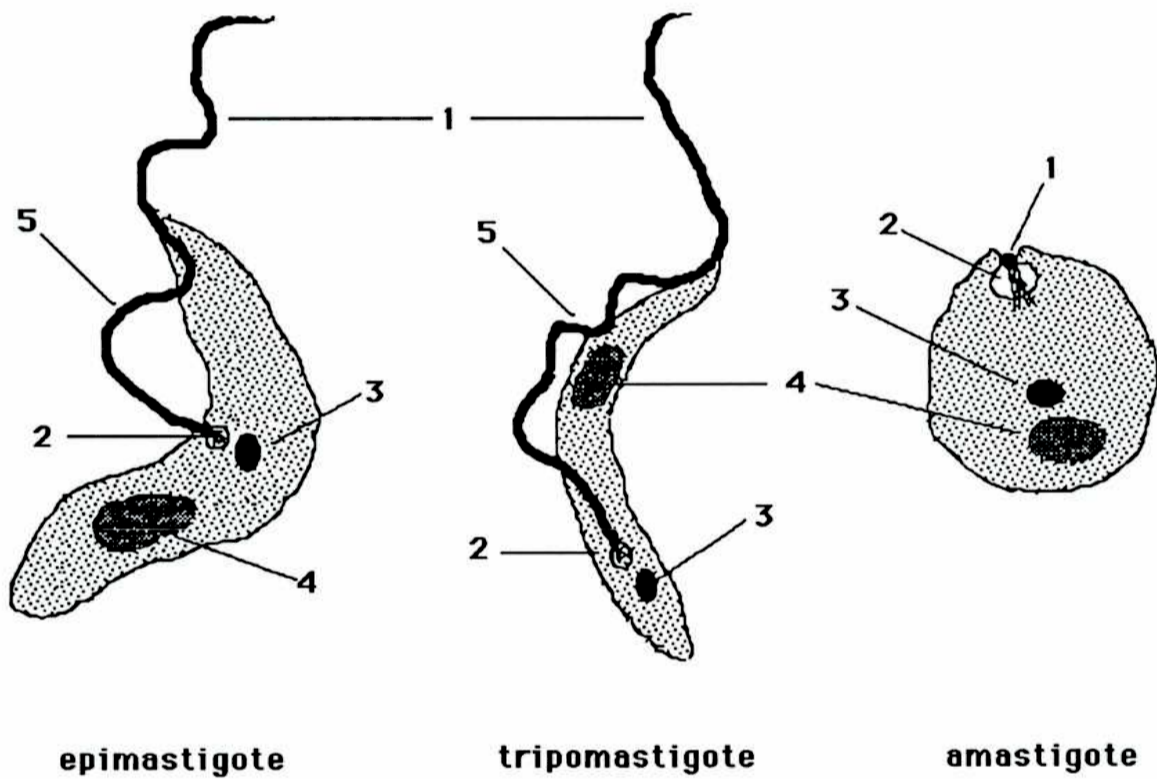
Los miembros del género *Trypanosoma* han sido divididos en dos grandes grupos según el tipo de desarrollo en el insecto vector (Hoare, 1964). El grupo Salivaria incluye los tripanosomas que completan su desarrollo en las glándulas salivales del vector. Su transmisión se da a través de la picadura del insecto. Ej.: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*. El grupo Estercoraria, en cambio, comprende

tripanosomas que completan su desarrollo en el tubo digestivo del vector y cuya transmisión es a través de las heces del insecto. Ej.: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma lewisi*.

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

En el huésped invertebrado

El vector (normalmente triatómíneos de familia *Reduviidae*) es un insecto hematófago que se infecta por ingestión de tripanosomas presentes en sangre periférica del huésped vertebrado. Las formas sanguíneas ingeridas (tripomastigotes, fig. 1) pasan a lo largo del tubo digestivo del insecto a través de una serie de transformaciones morfológicas irreversibles. Cada etapa sucede en una porción particular del tubo. Así, en el estómago, la mayoría de los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes (fig. 1). En el intestino, la



**Figura 1.** Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*. 1, flagelo; 2, depresión flagelar; 3, kinetoplasto; 4, núcleo; 5, membrana ondulante.

población flagelada consiste de epimastigotes en activa división, los cuales mantienen un estado permanente de infección en el insecto. En el recto, algunos epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos infectantes que se eliminan con las heces durante o después de la ingesta de sangre del insecto (Brener, 1973).

Brack, revisando el ciclo, introdujo una serie de modificaciones señalando que las formas sanguíneas de *T. cruzi* se transforman en el estómago del insecto en formas redondeadas provistas de un flagelo, los esferomastigotes (Brack, 1968). Según este autor, dos ciclos paralelos ocurren en el vector: en uno, los esferomastigotes se transforman directamente en tripomastigotes metacíclicos y en el otro, se diferencian en epimastigotes cortos (dotados con la capacidad de multiplicarse y diferenciarse en esferomastigotes) y en epimastigotes largos (con gran movilidad pero sin capacidad de multiplicarse ni diferenciarse).

No han sido detectados estadíos intracelulares del parásito en el vector, así como tampoco han sido descritos efectos perjudiciales para el insecto. Tampoco se han observado formas resistentes del parásito que sobrevivan a la muerte del huésped invertebrado por más de nueve o diez días (Brener, 1973). Además de sus huéspedes naturales se han obtenido infecciones experimentales con *T. cruzi* en otros artrópodos, entre ellos, algunos dípteros, hemípteros, lepidópteros y ácaros. La mayoría de ellos son obviamente huéspedes anormales e incapaces de mantener el ciclo completo del parásito (Brener, 1973). El origen geográfico del vector y las variaciones entre las distintas cepas del parásito también influyen sobre el ciclo en el insecto. Normalmente una determinada cepa de parásitos infecta más eficientemente a las especies locales que a insectos de otras regiones.

#### En el huésped vertebrado

Los tripanosomas metacíclicos eliminados con las heces del insecto penetran en el huésped vertebrado a través de microescoriaciones de la piel o de mucosas como la conjuntiva. Invaden luego las células por un proceso de endocitosis iniciando así el ciclo intracelular. *T. cruzi* puede penetrar un amplio rango de células del



huésped. A menudo las más parasitadas son las fibras musculares y las células de la glia (Brener, 1973).

Después de la penetración celular, los tripomastigotes se diferencian en formas redondeadas carentes de flagelo, los amastigotes (fig. 1), que se multiplican por fisión binaria cada 12 horas aproximadamente. En células en cultivo de tejidos, el número de parásitos al final de un ciclo, que normalmente dura cuatro a cinco días, puede variar de 50 a 300, dependiendo del tamaño de la célula.

La transformación en tripomastigotes comienza cuando la célula termina de llenarse de amastigotes. Las células parecen soportar la parasitemia sin daño aparente, al menos en las etapas tempranas, pero mueren luego de la ruptura y liberación de los parásitos. Los tripomastigotes que emergen de los tejidos parasitados se vuelcan al torrente sanguíneo por el que circulan durante un período variable antes de penetrar nuevas células y reasumir el ciclo (Brener, 1973).

La infección y el desarrollo del ciclo en el huésped vertebrado están claramente influenciados por la edad, sexo y constitución genética del mismo, así como también por la cepa del parásito. La presencia de epimastigotes o formas similares en el huésped vertebrado es controvertida y requiere mayor investigación. *Trypanosoma cruzi* tiene un amplio rango de huésped. Ha sido detectado no solo en varios mamíferos de diferentes órdenes sino también en animales domésticos natural o experimentalmente infectados. *T. cruzi* puede infectar ratones, ratas, conejos, hamsters, perros y monos. Ha podido probarse, sin embargo, que tanto anfibios como pájaros son refractarios al parásito.

#### Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es cultivable en una gran variedad de medios bifásicos y monofásicos (Taylor, 1968). La forma del parásito mantenida en cultivo es prácticamente idéntica a la epimastigote presente en el insecto vector. En los medios de cultivo, los tripomastigotes aislados de la sangre de mamíferos se diferencian en epimastigotes que se multiplican a 25-28°C. A su vez, éstos pueden eventualmente transformarse en tripomastigotes metacíclicos al alcanzar la fase estacionaria del cultivo (Castellani, 1967).

Tripomastigotes similares a la forma sanguínea pueden obtenerse del sobrenadante de células infectadas en cultivo de tejidos. Además, en el mismo sistema, también pueden recuperarse amastigotes del interior de las células infectadas antes de la lisis y liberación de los tripomastigotes (Zingales, 1985).

### Heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi*

Existen un gran número de evidencias que indican que esta especie comprende a un gran "pool" de poblaciones heterogéneas de organismos. Las cepas de *T. cruzi* a las que hace referencia la literatura provienen generalmente de aislamientos de origen conocido y muestran a menudo características que las diferencian. Los avances recientes en este tema de investigación han sido estimulados por algunos aspectos intrigantes de la enfermedad en humanos como, por ejemplo, la extrema variedad de formas clínicas (que van de severas cardiopatías y/o dilatación de segmentos del tubo digestivo a la carencia de síntomas aparentes), las variaciones geográficas y las impredecibles consecuencias de la enfermedad.

Un gran número de características biológicas han sido estudiadas en distintas cepas de *T. cruzi*. Se han descrito diferencias en la morfología de las formas sanguíneas y en las curvas de parasitemia; en la infectividad a distintos tipos de células; en la distribución de las formas intracelulares en los distintos tejidos, en la velocidad de multiplicación y en la concentración de parásitos por célula; en la susceptibilidad de las formas sanguíneas a sueros inmunes; en la virulencia y en la sensibilidad a drogas. Del punto de vista bioquímico, se han encontrado diferencias en la composición antigénica; en la composición y distribución de carbohidratos de superficie; en los patrones de isoenzimas; en los patrones de fragmentos de restricción del ADN kinetoplástico; en el cariotipo y la localización cromosómica y en muchas otras características (Brenner, 1985; Prata, 1985; Engman, 1987).

Como consecuencia de estos estudios, distintas variedades de *T. cruzi* han sido descritas, lo cual no debe resultar sorprendente tratándose de un parásito con una extensa distribución geográfica y una gran diversidad de hábitats, huéspedes y vectores. El estudio de la variación intraespecífica en *T. cruzi* tiene importantes implicaciones

para el desarrollo de sistemas de diagnóstico y de tratamientos quimioterápicos e inmunológicos contra la enfermedad, ya que no todas las variedades del parásito podrían ser susceptibles a una dada droga o anticuerpo (Brener, 1985).

## **La enfermedad de Chagas**

### **Generalidades**

En 1909, Carlos Chagas descubre un nuevo flagelado en el intestino de un insecto hematófago (*Pastrongylus megistus*) muy común en las cabañas del estado de Minas Geraes en Brasil. Chagas denominó a este nuevo organismo *Trypanosoma cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz (Chagas, 1909). Posteriormente demostró la presencia de este organismo en la sangre de un niño y de un gato, y describió en detalle las manifestaciones clínicas de la enfermedad que denominó "tripanosomiasis americana" y que con posterioridad se la conociera como enfermedad de Chagas.

Por muchos años esta nueva enfermedad fue considerada exótica y restringida casi exclusivamente al Brasil. Con el advenimiento de nuevas técnicas de inmunodiagnóstico y mejores estudios epidemiológicos se encontró que su distribución e importancia eran mucho mayores. Actualmente es una de las enfermedades parasitarias más importantes en América Latina y abarca desde México hasta la provincia de Río Negro en Argentina (fig. 2). La mayoría de estos países tienen zonas de alta incidencia, sin embargo es en Brasil, Venezuela y Argentina donde se registra el mayor número de los casos. En este último, aproximadamente un 10% de la población se encuentra infectada, alcanzando al 70% o más en algunas localidades de la provincia de Santiago del Estero.

La transmisión de *T. cruzi* por sus vectores naturales es aún el mecanismo más importante de infección humana en las zonas endémicas. Sin embargo, también puede ocurrir por transfusiones de sangre ya que la supervivencia del parásito puede llegar hasta 20 días después de la extracción. También se han descrito casos de transmisión congénita con frecuencias del 2% al 5% (Pinto Días, 1984).



**Figura 2.** Distribución geográfica de la incidencia de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas representa un grave problema sanitario para el cual no se dispone de tratamientos quimioterápicos o inmunológicos definitivos. Afecta especialmente las zonas rurales donde las malas condiciones de vida (viviendas precarias, desinformación, etc) favorecen el desarrollo del insecto transmisor. El control de la enfermedad requiere el desarrollo eficiente de campañas que incluyan el mejoramiento y desinfección de viviendas, educación popular, diagnóstico precoz y desarrollo experimental de compuestos activos o vacunantes contra *Trypanosoma cruzi*.

#### Formas clínicas. Enfermedad de Chagas aguda y crónica

La enfermedad puede manifestarse en una variedad de formas clínicas y patológicas, cada una con características particulares. La parasitemia es intensa en la fase aguda durante la cual los parásitos pueden ser fácilmente detectados en circulación y en tejidos. Se es-

tima que sólo un 5% de los individuos infectados presentan una sintomatología clínica que permita la detección de la enfermedad durante su etapa aguda. En el resto, la infección progresa durante este período sin manifestaciones clínicas. Los primeros síntomas, dado el caso, aparecen 7 a 10 días después de la infección siendo los más comunes fiebre, irritabilidad, cefalgias y mialgias. Las manifestaciones clínicas más severas ocurren principalmente en niños entre 0 y 2 años de edad e involucran generalmente hipertrofia del corazón, perturbaciones neurológicas y mortalidad. La mortalidad en la enfermedad de Chagas aguda siempre se correlaciona con grupos de corta edad. En los casos fatales se observan generalmente severos daños cardíacos y/o meningoencefalitis chagásica, principalmente en el primer mes de la enfermedad (Pinto Días, 1984).

La evolución de la etapa aguda dura entre 40 a 60 días, después de lo cual los signos y síntomas retroceden a la normalidad y la parasitemia disminuye hasta niveles prácticamente indetectables. La baja parasitemia parece ser el resultado de la aparición de una fuerte respuesta inmune y de un balance estable entre el huésped y el parásito. En esta etapa (latente) la infección puede permanecer sin manifestaciones por muchos años o décadas. Sin embargo, algunos pacientes pueden eventualmente desarrollar una forma crónica progresiva que se caracteriza por la aparición de miocarditis y/o hipertrofia y dilatación del tubo digestivo que resulta en megaesófago y/o megacolon. En la Argentina los pacientes crónicos sintomáticos comprenden aproximadamente un 25% de los individuos infectados, siendo la miocarditis chagásica la patología más frecuente.

La patogénesis de las lesiones que ocurren tanto en la fase aguda como en la crónica no ha sido bien definida. Inicialmente, los eventos traumáticos asociados a la proliferación intracelular del parásito causan la lisis de las células infectadas. Más tarde, la respuesta inmune del huésped contra el parásito y/o antígenos propios puede jugar un papel importante en el desarrollo de las lesiones en tejidos. Existen varias evidencias que relacionan a los fenómenos de autoinmunidad e hipersensibilidad mediada por células con la producción de lesiones en tejidos. Sin embargo es posible que otros mecanismos, como la formación de inmunocomplejos, puedan ser también de importancia (Galvão-Castro, 1984).

## Quimioterapia

El tratamiento específico de la enfermedad de Chagas en humanos ha probado ser de utilidad en los casos agudos que ocurren en áreas endémicas, en los casos agudos inducidos por transfusión sanguínea, en los casos congénitos y en las infecciones accidentales en el laboratorio. Las infecciones crónicas recientes pueden, probablemente, también ser curadas. El tratamiento con las drogas disponibles de los pacientes en la forma indeterminada o latente de la enfermedad está aún en discusión (Brener, 1984).

Las únicas drogas usadas actualmente son dos compuestos nitroheterocíclicos (derivados de un nitrofurano en un caso y de un nitroimidazol en el otro) que se conocen como "nifurtimox" y "benznidazol" respectivamente. Ambos compuestos están lejos de ser la medicina ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, cuyos requisitos deben ser la curación de casos agudos y crónicos, la efectividad por vía oral en una dosis única y pequeña, la ausencia de efectos colaterales y la no-generación de resistencia en el parásito (Brener, 1984).

Las dos drogas mencionadas inducen efectos colaterales tales como reacciones de hipersensibilidad, neuritis periférica, pérdida de peso y trastornos gastrointestinales. La eficacia de las drogas es baja y sólo un muy pequeño porcentaje de los pacientes son curados. El tratamiento se recomienda, sin embargo, en los casos agudos, en algunos de los cuales ha sido posible eliminar la parasitemia totalmente. En los pacientes crónicos, por el contrario, el tratamiento ha mostrado ser ineficaz, aunque existen algunas controversias al respecto (Brener, 1984).

## Inmunología de la enfermedad de Chagas

### Inmunidad humoral y celular

*Trypanosoma cruzi* induce en el huésped mamífero una fuerte respuesta inmune humoral y celular. Esta respuesta está dirigida específicamente contra el agente causal, siendo cuantitativamente de

poca importancia la estimulación generalizada del aparato inmune, como ocurre en otras enfermedades parasitarias. Tanto la respuesta humoral como la celular intervienen en el equilibrio huésped-parásito.

La respuesta humoral específica contra el parásito aparece siempre pocos días después de la infección aún en individuos asintomáticos y se mantiene durante toda la vida, por lo cual, su presencia se emplea corrientemente para el diagnóstico. El estudio del perfil de anticuerpos demuestra que el tipo M de inmunoglobulinas es el que aparece precozmente en el curso de la infección disminuyendo a niveles casi no detectables en el crónico. La aparición de inmunoglobulinas del tipo G se produce hacia la segunda y tercera semana, perdurando en niveles detectables durante todo el curso de la infección (Storino, 1985). La inmunidad mediada por células en los individuos infectados ha sido detectada *in vivo* con pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada e *in vitro* con pruebas de transformación blástica e inhibición de la migración de leucocitos (Storino, 1985).

La mayor parte de los conocimientos actuales sobre el papel de la respuesta inmune en la infección con *T. cruzi* fueron obtenidos en estudios de animales infectados experimentalmente. Con las debidas limitaciones, los resultados de estos experimentos pueden ser extrapolados a lo que ocurriría con las personas infectadas. Los experimentos de transferencia de linfocitos (B ó T) y de sueros de animales infectados a animales no sensibilizados mostraron que sólo con determinadas combinaciones de cepas de ratones y parásitos podía obtenerse un aumento en la resistencia a la infección. Es probable que la inmunidad parcial observada sea el resultado de la interacción de varios mecanismos. Todos estos mecanismos podrían tener diferente peso según la cepa de ratón y parásito empleada, lo cual daría por resultado que el papel defensivo del suero y/o de las células sólo se visualice con determinadas combinaciones huésped-parásito (Storino, 1985).

Existen controversias sobre el papel del interferón y de las células "natural killer" (NK). Algunas evidencias indican que los niveles de interferón sérico y la actividad de células NK, regulada por los niveles de interferón, se incrementan muy rápidamente luego de la infección experimental con *T. cruzi*. Tanto epi como tripomastigotes

pueden ser destruidos por células NK generadas en el ratón durante la infección experimental. Sin embargo, otros autores encontraron que el bloqueo de la actividad NK con anticuerpos anti-interferón no produjo diferencias en la resistencia a la infección (Storino, 1985).

Un área en la que sí parece haber acuerdo es en el papel del sistema de los fagocitos mononucleares. Estas células son capaces de destruir a los parásitos internalizados al ser activadas por linfocinas producidas por linfocitos T sensibilizados por antígenos del parásito. Este mecanismo actuaría en el balance huésped-parásito aún en las primeras etapas de la infección, ya que el estudio temprano del chagoma de inoculación revela la destrucción de parásitos por macrófagos en el sitio de entrada (Storino, 1985).

La inmunidad humoral, dependiente de linfocitos B, también actúa en la resistencia a la infección. La participación de anticuerpos en la resistencia contra *Trypanosoma cruzi* ha sido claramente demostrada por protección por transferencia pasiva de suero inmune o de fracciones de inmunoglobulinas, por citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente y por el aumento de la infección de *T. cruzi* en ratas inmunosuprimidas por inyección neonatal de anticuerpos anti  $\mu$  (Krettli, 1982b).

Algunos investigadores han reportado la existencia en la enfermedad de Chagas de dos tipos de anticuerpos con diferentes actividades (Krettli, 1982b). Según estos autores, el suero de ratones inmunizados con diferentes antígenos de *T. cruzi* (formas de cultivo sometidas a ruptura por ciclos de congelamiento, formas sanguíneas fijadas con glutaraldehído, glicoproteínas de superficie, etc.) presentan solamente anticuerpos detectables por técnicas serológicas convencionales como, por ejemplo, inmunofluorescencia. Estos anticuerpos detectan epi o tripomastigotes fijados pero no formas sanguíneas vivas y son muy poco protectores contra infecciones de *T. cruzi*. Por el contrario, ratones crónicamente infectados presentan, además, anticuerpos contra formas sanguíneas vivas del parásito, que pueden ser detectados por ensayos de lisis mediada por complemento (por lo que se los denomina "líticos") y de citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente, además de las técnicas convencionales (Krettli, 1982b, Krettli, 1984). Estos anticuerpos no se detectan en



sueros de ratones inmunizados con parásitos muertos o fracciones antigénicas por lo que se asume que estarían dirigidos contra componentes de la superficie del parásito o contra antígenos liberados por el tripanosoma. Los mismos autores han reportado también que, en un cierto porcentaje de los pacientes tratados, los anticuerpos líticos desaparecen mientras que los detectables por las técnicas convencionales están todavía presentes (Krettli, 1984).

La razón por la que sólo los anticuerpos líticos son capaces de detectar tripomastigotes vivos no está clara aún, pero podría estar relacionada con sus diferentes afinidades por las células blanco. En relación con la actividad lítica, se ha encontrado que los fragmentos de IgG, Fab y Fab', son tan efectivos como la molécula intacta en transformar a los tripomastigotes de sangre en activadores de la vía alternativa del complemento (Kipnis, 1985). Este fenómeno sugiere que la IgG específica se une a componentes de la membrana del parásito que normalmente inhiben la activación del complemento, induciendo, de esta forma, la lisis por la vía alternativa. El estudio de fracciones del suero por cromatografía de afinidad mostró que la actividad lítica estaba correlacionada con picos de IgG2, mientras que los tests de inmunofluorescencia con parásitos fijados fueron positivos con todas las fracciones (Sánchez, 1982).

Los anticuerpos líticos estarían asociados a la resistencia del huésped vertebrado. Estos autores sólo han podido detectarlos en infecciones activas de *T. cruzi*, lo que ayudaría a explicar por qué la mayoría de los antígenos que han sido usados al momento como vacunas en la enfermedad de Chagas no han mostrado ser efectivos en la protección contra la infección (Lima-Martins, 1985) (ver Perspectivas de vacunación en la enfermedad de Chagas). Los anticuerpos mediadores de la lisis por complemento han sido encontrados en todos los pacientes chagásicos estudiados (Krettli, 1982a), sin embargo, éste no parece ser un mecanismo efectivo para la destrucción del parásito en la fase aguda de la infección. Es posible que la activación del complemento intervenga en la destrucción de parásitos en la etapa crónica, cuando estos anticuerpos alcanzan títulos más altos (Storino, 1985).

Los anticuerpos involucrados en las reacciones de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos también serían importantes en la protección contra *T. cruzi*. Tanto epi como tripomastigotes son fagocitados por macrófagos humanos y de ratón. Los epimastigotes son rápidamente destruidos, pero los tripomastigotes escapan desde la vacuola macrofágica al citoplasma, donde se replican. La presencia de anticuerpos permite la fagocitosis de las formas sanguíneas vía receptor de Fc. Además, incrementa la destrucción del parásito por macrófagos activados por linfoquinas de origen T, indicando un efecto sinérgico entre anticuerpos e inmunidad mediada por células. La actividad citotóxica anticuerpo-dependiente de células no-fagocíticas (células "killer") es muy controvertida y en algunos de los casos reportados la actividad detectada se debía a contaminaciones en las preparaciones celulares usadas (Storino, 1985).

### Autoinmunidad

La participación de las reacciones de autoinmunidad en la patogénesis de la enfermedad de Chagas ha sido tomada con considerables reservas y escepticismo. Algunos autores han reportado que antígenos de *Trypanosoma cruzi* comparten epitopes con antígenos del huésped. Otros han descrito reacciones humorales y celulares en las que sugieren la existencia de reactividad cruzada entre *T. cruzi* y antígenos neurales o cardíacos. Sin embargo, tanto los protocolos utilizados como las conclusiones obtenidas han sido cuestionados (Kierszenbaum, 1985).

A menudo, la enfermedad de Chagas sólo se manifiesta varios años después de la infección inicial; su gravedad no muestra correlación directa con la parasitemia y alcanza su expresión más severa en un momento en el que el parásito es prácticamente indetectable. Clínicos y patólogos han sabido por mucho tiempo que la enfermedad asume su forma más extrema en pacientes que desarrollan la respuesta inmune más vigorosa y, por lo tanto, controlan más efectivamente la infección. En la fase crónica, el exámen histológico frecuentemente revelaba un proceso inflamatorio progresivo que conducía a fibrosis y destrucción del miocardio en total ausencia de parásitos. Todas estas observaciones han servido para que varios autores sugieran que, para una completa explicación de la

patogénesis de la enfermedad de Chagas, el parásito solo no es suficiente (Hudson, 1985). Por otro lado, otros autores han propuesto interpretaciones alternativas para las mismas observaciones. Se ha sugerido, por ejemplo, que la diseminación de las lesiones a tejidos no parasitados, podría resultar del reconocimiento, por la respuesta inmune, de células del huésped modificadas por la adsorción pasiva de antígenos del parásito (Araujo, 1982).

Varios autoanticuerpos han sido descritos en pacientes naturalmente infectados y en animales infectados experimentalmente. A pesar de que estos anticuerpos fueron generados por la infección de *T. cruzi*, pudieron ser específicamente removidos del suero por adsorción con tejido del huésped no infectado. Se han encontrado anticuerpos que reconocen epitopes en distintas formas de *T. cruzi* con reactividad cruzada con endotelio y vasos sanguíneos (EVI); laminina del tejido conectivo; retículo sarcoplásmico en músculo estriado y con algunas subpoblaciones de neuronas periféricas y centrales (Hudson, 1985). Algunos autores han cuestionado el hecho de que las formas de *T. cruzi* utilizadas en estos estudios provenían de medios de cultivo que contenían extractos de corazón o de cerebro ó habían sido aisladas de un cultivo de células de tumor de músculo (en el caso de los tripo y amastigotes). Ya que los tripanosomas pueden internalizar macromoléculas del medio, la reactividad observada contra el parásito pudo haber sido ocasionada por antígenos del huésped adsorbidos del medio de cultivo (Kierszenbaum, 1985).

Varias observaciones han sugerido la posible intervención de células autoreactivas en la producción de la cardiomiopatía chagásica. Para otros autores, sin embargo, la existencia de reactividad cruzada entre antígenos de *T. cruzi* y de corazón en un individuo infectado es sólo evidencia circunstancial, insuficiente para demostrar que la inmunidad anti-parásito es la responsable del daño cardíaco. Debe tenerse en cuenta, al respecto, que el sistema inmune está "programado" para pasar por alto los antígenos propios. Así, la sola demostración de la existencia de reactividad cruzada no puede sostenerse como prueba de que el epitope en cuestión producirá una respuesta inmune en el huésped o que, de hacerlo, su efecto sería necesariamente deletéreo.

Esta controversia ha tenido un gran impacto sobre la naturaleza y dirección de los esfuerzos futuros para controlar la enfermedad de Chagas. Así, si la autoinmunidad fuera provocada por antígenos del parásito, las perspectivas de vacunación se verían complicadas. Si, por el contrario, fuera una consecuencia de la alteración de antígenos en los tejidos (como resultado del daño ocasionado por el parásito), la inmunoprolifaxis podría ser efectiva. Finalmente, si no fuera posible demostrar la existencia de reacciones de autoinmunidad de ningún tipo, el desarrollo de una vacuna anti-*T. cruzi* sería un camino razonable a seguir.

## **Antígenos de *Trypanosoma cruzi***

### **Composición antigénica de *Trypanosoma cruzi***

La primera y más importante área de contacto entre el huésped y el parásito es la superficie de la célula del tripanosoma. El conocimiento de la estructura y la función de los componentes de la superficie del parásito es imprescindible para entender y manipular su relación con el huésped. Cada estadio del ciclo de vida de *T. cruzi* tiene diferente medio ambiente, morfología y estilo de vida, y es probable que estas diferencias se reflejen en variaciones funcionales y antigénicas en su superficie.

La composición antigénica de *T. cruzi* es compleja y aún no se tiene una idea clara de la organización de su superficie, a pesar del gran número de estudios realizados. Han sido descritos una gran cantidad de componentes de superficie de distinto peso molecular y con distinta especificidad de estadio. La gran heterogeneidad en las distintas cepas (y aún clones) del parásito también ha contribuido a complicar el panorama, haciendo difícil generalizar los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios. A menudo la sola modificación de la técnica empleada ha arrojado resultados diferentes. A pesar de las discrepancias y contradicciones, la información acumulada hasta el momento ha permitido reconocer algunos de los componentes de la superficie del parásito y determinar sus características estructurales y (aunque sólo en pocos casos) funcionales.

La presencia de carbohidratos en la superficie de *T. cruzi* ha sido probada en todos los estadios del parásito (Alves, 1974; Pereira, 1980). Han sido descritos y caracterizados numerosos receptores para lectinas (proteínas de origen vegetal con afinidad por azúcares) algunos de los cuales presentan especificidad de estadio (Pereira, 1980; Katzin, 1983). La mayoría de las proteínas de superficie detectadas en *T. cruzi* serían presumiblemente glicoproteínas, debido a su probada afinidad por diferentes lectinas (Andrews, 1984).

Entre las técnicas más usadas para analizar la composición (glico)proteica de la superficie del parásito se encuentra la iodación de parásitos enteros seguida de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE). La marcación de parásitos (por iodación o por marcación *in vivo*) ha sido usada también en combinación con la inmunoprecipitación con sueros inmunes y de infección. En estos casos, debe tenerse en cuenta que las bandas detectadas representan solo un número mínimo de proteínas de superficie. Algunas de ellas pueden no ser detectadas ya sea porque están presentes en poca cantidad, porque tienen poca capacidad inmunogénica o porque no pueden ser marcadas eficientemente.

Las glicoproteínas de superficie iodinadas han sido analizadas también mediante cromatografía de afinidad con lectinas. En uno de los primeros trabajos con el uso de estas técnicas, Snary y colaboradores (Snary, 1979) reportaron la identificación de una glicoproteína de superficie mayoritaria, común a todos los estadios del parásito, con un peso molecular aparente de 90 kDa. Más tarde, en estudios serológicos, estos mismos autores encontraron un considerable grado de homogeneidad en la composición antigénica de las distintas formas de *T. cruzi* (Snary, 1980). Sin embargo, trabajos posteriores demostraron que son varias las glicoproteínas importantes en la membrana de *T. cruzi* (Andrews, 1984; González, 1984; Dragon, 1985; Kirchoff, 1987) y que la organización antigénica difiere considerablemente en las distintas formas del parásito (Araujo, 1981; Lanar, 1983; Yoshida, 1983; Andrews, 1984; Dragon, 1985) encontrándose algunos componentes comunes y otros específicos de estadio (Nogueira, 1981; Andrews, 1984; Contreras, 1985; Dragon, 1985; Kirchoff, 1987).

Un patrón sencillo fue descrito también por Nogueira et al. y Lanar et al. Estos autores identificaron dos glicoproteínas mayoritarias en 6 cepas diferentes; una específica de las formas del insecto (72-75 kDa) y otra específica de las formas sanguíneas (90-92 kDa), siendo esta última sensible al tratamiento con tripsina (Nogueira, 1981, Lanar, 1983). Ambas glicoproteínas resultaron ser diferentes en la composición de aminoácidos y determinantes antigénicos (Nogueira, 1982). Mucho más complejo fue el patrón descrito por Zingales et al., quienes reportaron que ambas formas compartían dos antígenos de 80 y 95 kDa mientras que otras proteínas parecían ser específicas de estadio (Zingales, 1982).

La introducción de una segunda dimensión en la electroforesis de proteínas (en la que las especies se separan de acuerdo al punto isoeléctrico, pI) complicó aún más el panorama. Andrews y colaboradores aplicaron esta técnica después de inmunoprecipitación o cromatografía con lectinas (Andrews, 1984). Estos autores lograron caracterizar más de 10 glicoproteínas diferentes, varias de las cuales coincidían en peso molecular aparente pero diferían en pI. Esto indicaba que hablar del mismo peso molecular no siempre significa hablar de la misma proteína. A esto se le sumó la heterogeneidad de carga que presentaban varias especies, lo que hacía que aparecieran como una gran mancha en los geles, abarcando un rango más o menos considerable en la escala de pI. Entre las glicoproteínas descritas (cepa Y), varias resultaron comunes a ambas formas del parásito: 90 kDa (abundante en tripomastigotes), 80 kDa (abundante en epimastigotes) y 60 kDa. Una sola resultó ser específica del estadio del insecto (70 kDa) y varias aparecieron sólo en la forma sanguínea: 68 kDa, dos de 85 kDa, 100 kDa y 120 kDa; todas estas con afinidad por concanavalina A, lectina que une residuos de glucosa y manosa. En concordancia con estudios anteriores, otro componente específico de tripomastigotes de 85 kDa (Tc85) resultó tener afinidad por aglutinina de germen de trigo, que une residuos de N-acetil glucosamina (Katzin, 1983). Ninguna glicoproteína de epimastigotes tenía afinidad por esta lectina. Casi todas las proteínas descritas tenían sensibilidad al tratamiento con tripsina.

Con la misma técnica, Dragon et al. analizaron sueros de pacientes crónicos de distintas procedencias en su capacidad de in-

munoprecipitar componentes del parásito (Dragon, 1985). De las proteínas detectadas en tripomastigotes (cepa Peru) sólo 5 reaccionaban con todos los sueros probados: 150 kDa, 110 kDa, 90 kDa y dos de 60 kDa. Varias proteínas fueron detectadas en epimastigotes pero ninguna en el rango de 88-92 kDa. Luego de la inmunoprecipitación de parásitos vivos, sólo la proteína de 90 kDa fue detectada en tripomastigotes. Además, sueros de pacientes con leishmaniasis reconocieron las mismas bandas en ambos estadíos pero ninguna de 90 kDa. Estos resultados llevaron a estos autores a presentar a esta proteína como el antígeno específico de tripomastigotes importante para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, Kirchoff y colaboradores, utilizando epimastigotes de tres cepas diferentes, encontraron que 90 de los 140 sueros humanos crónicos analizados detectaban dos componentes principales de 72 kDa y 90 kDa, no reconocidos por sueros de pacientes con otras enfermedades (Kirchoff, 1987). No se pudo establecer la identidad de este componente de 90 kDa con el descrito por Dragon et al. ya que estos últimos nunca detectaron esta especie en epimastigotes.

Varios autores han reportado el hallazgo de antígenos específicos del estadio terminal en el insecto, tripomastigote metacíclico, aunque, en la mayoría de los casos, utilizando parásitos obtenidos de cultivos acelulares. Yoshida describió dos antígenos de 70 y 85 kDa, presentes en tres cepas diferentes, que resultaron ser específicos de tripomastigotes metacíclicos (Yoshida, 1983). Por otro lado, Contreras et al., estudiando la diferenciación de epimastigotes en cultivo a tripomastigotes, encontraron que doce horas antes de la diferenciación morfológica aparecían dos antígenos nuevos, no presentes en epimastigotes (Contreras, 1985). Estas proteínas resultaron ser de 78 y 86 kDa y eran específicas de tripomastigotes metacíclicos.

El desarrollo de las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales abrió la posibilidad de individualizar determinantes antigénicos en las proteínas de superficie del parásito y permitió precisar su especificidad en los distintos tipos celulares. Muchas son las ventajas que ofrece el uso de anticuerpos monoclonales, entre ellas, el hecho de que puedan obtenerse anticuerpos en cantidad contra componentes celulares minoritarios, los cuales tal vez no po-

drían ser identificados con sueros policlonales. Snary y colaboradores describieron la producción de un anticuerpo monoclonal contra una glicoproteína de 72 kDa (gp72) utilizando células de ratones inmunizados con epimastigotes fijados con glutaraldehído (Snary, 1981). Esta glicoproteína estaba únicamente presente en epimastigotes y representaba el 0.04% de la proteína total. Utilizando el mismo anticuerpo, Kirchoff et al. examinaron varias cepas diferentes del parásito y encontraron que el epítope reconocido no era universalmente expresado por todos los epimastigotes de *T. cruzi* (Kirchoff, 1984a). Más tarde, los mismos autores demostrarían que en esos aislamientos, el epítope se encontraba en forma críptica, por lo que no era accesible al anticuerpo monoclonal (Kirchoff, 1984b). Varios autores han señalado la posible identidad de esta proteína (gp72) con la descrita por Nogueira et al. (Nogueira, 1981), Lanar et al. (Lanar, 1983) y Andrews et al. (Andrews, 1984) de 70-75 kDa de peso molecular aparente y específica de epimastigotes.

Otros intentos fueron llevados a cabo utilizando fracciones del parásito. Orozco et al. reportaron la preparación de anticuerpos monoclonales contra una fracción del parásito (que denominaban "componente 5") caracterizada en epimastigotes por inmunoelectroforesis (Orozco, 1984). Los anticuerpos producidos inmunoprecipitaban antígenos de 72, 51, 43 y 24 kDa y reaccionaban también con tripomastigotes metacíclicos pero no con formas sanguíneas. La proteína de 72 kDa podría ser la misma que la descrita por Snary et al. mencionada anteriormente (Snary, 1981).

Beard y colaboradores describieron la obtención de anticuerpos monoclonales contra componentes de la superficie de tripomastigotes iminobiotinilados (Beard, 1985). De esta forma, las proteínas de superficie pudieron ser purificadas de la mayoría de los componentes citosólicos a través de la interacción iminobiotina-avidina. Las proteínas reconocidas por estos anticuerpos fueron localizadas en "Western blots". En esta técnica, geles de proteínas totales del parásito son transferidos a filtros de nitrocelulosa que se hacen reaccionar con los sueros o los anticuerpos que se desean analizar. Tres componentes mayoritarios de 90, 85 y 75 kDa fueron detectados específicamente en tripomastigotes. Wrightsman y colaboradores utilizaron "Western blots" con dos anticuerpos monoclonales



producidos en ratones infectados con la cepa Peru (Wrightsmann, 1986). Uno de los anticuerpos detectaba una proteína de 68 kDa presente en todos los estadios del parásito y en las 5 cepas estudiadas. El otro, sin embargo, reaccionaba con proteínas de 90 y 105 kDa específicas de tripomastigotes aunque sólo en dos de las cepas.

Otras formas del parásito fueron empleadas para la producción de anticuerpos monoclonales. Teixeira y Yoshida describieron la obtención de 12 anticuerpos utilizando tripomastigotes metacíclicos muertos por calentamiento (Teixeira, 1986). Ninguno reaccionaba con epimastigotes ni con formas sanguíneas. Ocho de los 12 anticuerpos producidos inmunoprecipitaban una proteína de 90 kDa. El resto detectaba especies de 75 y 82 kDa. Los anticuerpos producidos presentaban reactividad cruzada con otras cepas del parásito si bien no en todas ellas pudieron ser detectados los mismos antígenos.

Más recientemente, otros autores describieron la obtención de 13 anticuerpos monoclonales contra componentes de la superficie del parásito (Alcina, 1988). Algunos resultaron ser estadio-específicos, aunque la mayoría de los anticuerpos reaccionaba con una proteína de 55 kDa. Esta reacción podía ser específicamente bloqueada con tubulina, cuyo peso molecular aparente es también de 55 kDa.

A pesar de las distintas cepas y técnicas empleadas y de las discrepancias en pesos moleculares, la mayoría de los autores coinciden en la descripción de dos grupos principales de proteínas antigénicas en *T. cruzi* : uno en el rango de 70-75 kDa y otro en el de 85-92 kDa. Otro grupo, aunque minoritario, contiene especies de 100 a 160 kDa. No existe acuerdo, sin embargo, en las especificidades en los distintos tipos celulares. Varios autores han descrito especies de 70-75 kDa específicas de epimastigotes y otras de 85-90 kDa específicas de tripomastigotes. Sin embargo, en otros laboratorios, varias glicoproteínas de 80-90 kDa han sido detectadas también en epimastigotes. Probablemente, las discrepancias se deban a diferencias en las cepas (Araujo, 1981; Kirchoff, 1984a), en las técnicas de marcación (Kirchoff, 1987) o en las condiciones de cultivo empleadas (González, 1984).

## Funciones y propiedades asociadas a antígenos de *T. cruzi*

La superficie del parásito tiene un papel importante en numerosas etapas del ciclo de vida del tripanosoma. Participa en la interacción con la célula huésped, en la recepción de señales y en diversos mecanismos de defensa que decidirán la supervivencia de la célula. Es la primera instancia de comunicación con el huésped y, por este motivo, es de esperar que en ella se localicen distintas moléculas responsables de estas funciones.

Además de las propiedades antigénicas descritas anteriormente, otras funciones han sido asignadas a algunas moléculas de la superficie de *T. cruzi*, en su mayoría relacionadas al ciclo biológico del parásito. Así, por ejemplo, han sido descritas glicoproteínas asociadas a la penetración celular (Zingales, 1985) y a la evasión de la respuesta inmune (Rimoldi, 1988) y otras con función de receptor de moléculas del huésped (Ouasssi, 1986a). Del mismo modo, aunque desde el punto de vista del huésped, han sido descritas moléculas relacionadas a la vulnerabilidad del tripanosoma; proteínas que, reconocidas por el sistema inmune, permiten la destrucción del parásito. (Zweerink, 1984; Martins, 1985; Yoshida, 1986) Estos trabajos están obviamente orientados a la localización de moléculas vacunantes, que medien algún tipo de protección contra la infección.

### Antígenos involucrados en protección

Distintos grados de protección parcial contra la infección con *Trypanosoma cruzi* pueden inducirse en animales experimentales a juzgar por la reducción de la mortalidad, el retraso en la aparición de parásitos circulantes y la disminución de los niveles de parasitemia. Los protocolos de inmunización utilizados han incluido el uso de parásitos vivos atenuados (Basombrío, 1982), parásitos inactivados (Mc Hardy, 1978), material fraccionado del parásito (Ruiz, 1986) y fracciones de glicoproteínas (Scott, 1979) .

Un número de laboratorios ha intentado identificar antígenos asociados a la protección contra la infección con *T. cruzi* correlacionando la resisitencia al parásito con la presencia de anticuerpos que reconozcan antígenos específicos. Zweerink y colaboradores obtuvieron protección parcial en ratones luego de repetidas inmuniza-

ciones con tripomastigotes irradiados (Zweerink, 1984). No lograron ninguna protección al inmunizar con epimastigotes. La inmunización con tripomastigotes indujo, además, anticuerpos que en su mayoría reaccionaban con un polipéptido de 100 kDa de peso molecular aparente y, aunque más débilmente, con otros dos o tres de más de 200 kDa. El suero de los ratones inmunizados con epimastigotes detectó una proteína de 57 kDa pero ninguna de 100 kDa o mayor.

Otros autores han estudiado la correlación entre la actividad lítica *in vitro* de sueros de pacientes y animales infectados con la presencia de anticuerpos con especificidad por algún antígeno del parásito. Yoshida obtuvo protección parcial en ratones utilizando tripomastigotes metacíclicos muertos por calentamiento o tratados con merthiolate (Yoshida, 1986). El grado de resistencia contra el parásito pudo ser correlacionado con la actividad lítica del suero de los ratones inmunizados. Este suero inmunoprecipitaba proteínas de 77, 82 y 88 kDa de peso molecular aparente que también eran reconocidas por sueros de ratones crónicamente infectados. Esta fue la primera vez que pudo obtenerse actividad lítica en sueros de ratones inmunizados con parásitos muertos o inactivados, y se contrapone a los estudios que indicaban que sólo podían obtenerse anticuerpos líticos durante la infección activa del parásito (ver Inmunidad humoral y celular).

Martins y colaboradores analizaron las proteínas inmunoprecipitadas por distintos sueros de pacientes crónicos (Martins, 1985). Los sueros que, en ensayos de lisis mediada por complemento, mostraban alta actividad lítica, reaccionaban con proteínas de 105, 120, 145 y 160 kDa las cuales no eran reconocidas por los sueros sin actividad lítica. Luego del tratamiento con benznidazol (ver Quimioterapia), algunos pacientes mostraban una reducción considerable en la actividad lítica del suero que se correlacionaba con la desaparición de anticuerpos con especificidad por los polipéptidos de 105 a 160 kDa. Además, el suero de ratones infectados, positivo en lisis mediada por complemento, reconocía los mismos antígenos; mientras que el suero de ratones inmunizados con tripomastigotes fijados con glutaraldehído no detectaba la banda de 160 kDa. Todos los sueros de pacientes analizados precipitaban las mismas proteínas de epimastigotes (93 y 75 kDa) sin mostrar correlación alguna con la

actividad lítica *in vitro*. Estos autores sugieren que el polipéptido de 160 kDa podría ser uno de los antígenos "blanco" que median la destrucción del parásito por complemento y que por lo tanto podría estar involucrado en la resistencia a la infección.

### Antígenos involucrados en diferenciación

*Trypanosoma cruzi* sufre un número de diferenciaciones a lo largo de su ciclo de vida. En el intestino del insecto vector, proliferan epimastigotes, mientras que en el recto, éstos se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, la forma infectante (ver Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*). Varias lectinas capaces de unir al parásito han sido aisladas de diferentes regiones del tracto intestinal del insecto (Pereira, 1980). Se ha propuesto que la interacción de estas lectinas con glicoproteínas de la superficie del parásito regula la morfogénesis de *T. cruzi* en el intestino del insecto vector.

Sher y Snary reportaron la inhibición de la diferenciación *in vitro* de epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos utilizando un anticuerpo monoclonal (Sher, 1982). Este anticuerpo tiene afinidad por la porción de carbohidratos de la glicoproteína de superficie de 72 kDa (gp72), mayoritaria en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos. La incubación con el anticuerpo, sin embargo, no afectó la viabilidad del parásito. Estos autores sugieren que, en el intestino del insecto, existirían lectinas con la misma especificidad que el anticuerpo utilizado. Estas lectinas inhibirían la diferenciación en tripomastigotes metacíclicos, regulando así la acumulación y multiplicación de epimastigotes en esa zona del tubo digestivo.

La transformación *in vitro* de epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos fue también estudiada en condiciones químicamente definidas. Bonaldo y colaboradores reportaron que, en estas condiciones, los epimastigotes en diferenciación se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo antes de la transformación a tripomastigotes metacíclicos (Bonaldo, 1988). Sólo la forma epimastigote y algunas formas intermedias mostraban adhesión, mientras que en el sobrenadante, se encontraban parásitos ya diferenciados. Esta situación se parece a la que naturalmente ocurre en el intestino del insecto vector, en el que, aparentemente, la adhesión de los epimastigotes a la pared del tubo digestivo es un paso necesario para la

diferenciación. Las formas adherentes se caracterizaban por la expresión de un grupo de cuatro polipéptidos en el rango de 45 a 50 kDa. Estas proteínas no aparecían antes de las 6 hs. de cultivo en el medio de diferenciación y desaparecían luego de 72 a 96 hs. En ese momento, la población de parásitos estaba compuesta por un 92% de tripomastigotes metacíclicos, en los cuales ya aparecían las proteínas de 75-90 kDa características de este estadio (Contreras, 1985). En experimentos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra las formas adherentes, se detectaron los mismos cuatro polipéptidos de 45-50 kDa, lo que sugiere que podrían estar localizados en la superficie del parásito. Se desconoce, sin embargo, si se trata de proteínas glicosiladas. Según estos autores, estas proteínas estarían involucradas en la adhesión de los epimastigotes, lo cual es, aparentemente, un requisito para la diferenciación a la forma infectante.

#### Antígenos involucrados en la evasión de la respuesta inmune

Los parásitos protozoarios han desarrollado una variedad de mecanismos para evadir la respuesta inmunológica del huésped. Dos mecanismos de inmunidad natural que operan en huéspedes no sensibilizados son el efecto citolítico de la vía alternativa del complemento y el reconocimiento, anticuerpo-independiente, por células fagocíticas. Notablemente, los estadios presentes en el huésped vertebrado son generalmente resistentes a la destrucción directa por suero y también evaden la ingestión y destrucción por las células fagocíticas. Por el contrario, los estadios (no infectantes) del insecto vector son normalmente susceptibles a la lisis directa por suero y a la fagocitosis y destrucción por monocitos y macrófagos. En particular, se ha probado que los epimastigotes de *T. cruzi* son lisados por suero normal a través de la vía alternativa del complemento mientras que los tripomastigotes son resistentes a la lisis en ausencia de anticuerpos específicos (Nogueira, 1975). Aparentemente, la diferenciación de epimastigotes en tripomastigotes estaría acompañada por modificaciones en la superficie del parásito que lo hacen resistente a la lisis por suero normal.

Varios autores mostraron que el tratamiento de tripomastigotes con tripsina y otras proteasas los convierte en activadores de la vía alternativa y, en consecuencia, sensibles a la lisis por suero (Kipnis,

1981). Estos tratamientos resultan también en un aumento de la fagocitosis por macrófagos sugiriendo la presencia de componentes responsables del efecto antifagocítico (Kipnis, 1981; Nogueira, 1981).

Se ha demostrado que la lisis por complemento (anticuerpo-dependiente) de tripomastigotes ocurre también a través de la vía alternativa (Budzko, 1975). Además, Kipnis y colaboradores demostraron que los fragmentos de IgG, F(ab')<sub>2</sub>, también son capaces de desencadenar la lisis por la vía alternativa, lo que descartaría la participación de dominios Fc en la activación del proceso (Kipnis, 1985). Estos autores sugieren que los anticuerpos interaccionarían con componentes de la superficie que normalmente previenen la activación de la vía alternativa, bloqueando su acción.

Joiner et al. reportaron que gp72, la glicoproteína de 72 kDa mayoritaria en las formas del insecto, sería el sitio aceptor para el componente C<sub>3</sub> del complemento en epimastigotes (Joiner, 1985). A pesar de su presencia en la superficie de tripomastigotes metacíclicos, la proteína no une C<sub>3</sub> en forma eficiente en este estadio, en el que, además, los niveles de C<sub>3</sub> unido a superficie son de 5 a 8 veces menores que en epimastigotes. Los mismos autores demostraron también que los tripomastigotes con C<sub>3</sub> en superficie no unen eficientemente el factor B, que conduce a la formación del complejo C<sub>3b</sub>-B<sub>b</sub> o "convertasa" que actúa en la amplificación del proceso. Por el contrario, sí unen el factor H, que conduce a la inactivación del complejo que, de esta forma, ya no puede participar en sucesivas amplificaciones (Joiner, 1986). Más recientemente, el mismo laboratorio reportó el hallazgo de proteínas específicamente secretadas por tripomastigotes que interfieren en la unión del factor B y que disminuyen la vida media del complejo "convertasa" (Rimoldi, 1988). Estos autores encontraron que los tripomastigotes secretan solo un número limitado de componentes, en el rango de 86 a 155 kDa, aunque no identificaron a la especie responsable de la actividad mencionada. Esta actividad, según los autores, podría explicar la resistencia que manifiestan los tripomastigotes a la lisis por complemento.

Fischer et al. reportaron también la purificación de un componente de 58/68 kDa liberado específicamente por tripomastigotes, que aparentemente contribuye a la evasión de la lisis por la vía alter-

nativa del complemento (Fischer, 1988). Según estos autores, esta misma proteína actuaría también como receptor de colágeno en la superficie del tripanosoma. El efecto inhibitorio depende aparentemente de la unión de esta proteína al factor B del complemento.

### Antígenos involucrados en la interacción y penetración de la célula huésped

La forma tripomastigote, a diferencia de la epimastigote, es capaz de invadir células del huésped y resistir al ataque de lisosomas. Ambas características están relacionadas a la capacidad de la forma infectiva de reconocer el medio que la rodea. Estas propiedades están mediadas, probablemente, por la membrana plasmática del parásito y es razonable suponer que algunos de sus componentes estén directamente involucrados en el contacto con la célula huésped.

Varios laboratorios han logrado la inhibición parcial de la invasión de *T. cruzi* en células en cultivo usando sueros de pacientes y de animales infectados. El tratamiento con tripsina ha demostrado también interferir en la penetración celular. El efecto de la preincubación del parásito con lectinas también fue investigado y los resultados obtenidos tienden a favorecer la hipótesis de que las lectinas pueden estimular la internalización del parásito actuando como puentes entre ligandos específicos presentes en la superficie de las células. Por otro lado, varios laboratorios han intentado inhibir la infección de células *in vitro* usando carbohidratos libres. De todos los compuestos probados, N-acetil-D-glucosamina aparece como el mejor inhibidor. También fue sugerida la participación de neuraminidasas del parásito en la adhesión y penetración en células del huésped. Esta actividad resultó ser 7 a 15 veces mayor en tripomastigotes que en los demás estadíos (Pereira, 1983). A pesar de algunas controversias, parecería que un mecanismo específico del tipo ligando-receptor estaría involucrado en la interacción de *T. cruzi* con la célula huésped (Colli, 1984).

Zingales y colaboradores obtuvieron 80% de inhibición de la penetración en células de cultivo luego del tratamiento de tripomastigotes con tunicamicina, antibiótico que bloquea específicamente la N-glicosilación de los residuos de asparragina (Zingales, 1985). Los experimentos de inmunoprecipitación mostraron que los

antígenos de 175, 120, 90 y 85 kDa desaparecían en los parásitos tratados con la droga. En su lugar, se detectaban bandas de 155, 105 y 75 kDa lo que indicaba que los sueros todavía reconocían epitopes localizados en las porciones proteicas de las moléculas. Estos resultados sugieren la participación de estas glicoproteínas en los mecanismos de interacción con la célula huésped. El mismo laboratorio reportó también que IgG purificada de un suero preparado contra Tc85 — glicoproteína de 85 kDa con afinidad por aglutinina de germen de trigo (Andrews, 1984) — inhibía la penetración en células de cultivo en un 70% (Colli, 1984). Estos autores sugieren que esta proteína participaría en la internalización en la célula huésped pero no descartan que otras proteínas (N-glicosiladas) también participen en el proceso.

Ouaissi y colaboradores estudiaron la interacción de la fibronectina plasmática con *Trypanosoma cruzi* (Ouaissi, 1984; Ouaissi, 1985). La fibronectina es una glicoproteína multifuncional de alto peso molecular presente en sangre, tejido conectivo y en la superficie celular. Está compuesta de dominios altamente estructurados que contienen sitios de unión para las macromoléculas que interaccionan con ella. Estos autores demostraron que la fibronectina se une específicamente a tripomastigotes y que estaría involucrada en la adhesión del parásito a la superficie de la célula huésped. En otra serie de trabajos, los mismos autores localizaron una proteína de superficie específica de tripomastigotes de 85 kDa con características de receptor de fibronectina (Ouaissi, 1986a). Además, la proteína purificada inhibió la infección de fibroblastos con tripomastigotes lo que sugiere que ésta se uniría a la fibronectina de la superficie celular impidiendo la adhesión del parásito. El sitio de unión parecería coincidir con el dominio definido por la secuencia Arg-Gly-Asp-Ser, caracterizada anteriormente como la región de la fibronectina que interacciona con células de mamíferos (Ouaissi, 1986b). Los autores concluyen que los dímeros de fibronectina actuarían como puente entre las superficies de las células del huésped y del parásito, a través de esta secuencia hidrofílica de cuatro aminoácidos (Ouaissi, 1988).

#### Clonado de genes que codifican antígenos de *Trypanosoma cruzi*

Las técnicas de clonado molecular han permitido, en un sin número de sistemas, aislar, caracterizar y manipular componentes



moleculares en forma específica, abriendo la posibilidad de estudiar la regulación de su expresión y de producir en cantidad moléculas individuales que, de otro modo, serían imposible de obtener. En organismos con un complejo ciclo de vida como *T. cruzi*, estas técnicas posibilitan acceder a los distintos componentes que intervienen en la interacción con el huésped y con el vector. En particular, el clonado de genes que codifican por antígenos del parásito, posibilitaría la disección de la respuesta inmune y la localización y caracterización de las distintas moléculas que participan en el complejo equilibrio huésped-parásito.

Han sido pocos los genes de antígenos de *T. cruzi* descritos hasta el momento. Peterson et al. reportaron, por primera vez, el clonado de un gen que codifica por un antígeno de superficie de 85 kDa específico de tripomastigotes (Peterson, 1986). Para ello, utilizaron un banco genómico construido en el vector  $\lambda$ gt11. Este vector permite la expresión de productos de fusión entre una proteína bacteriana ( $\beta$  galactosidasa) y la porción codificada por el fragmento clonado. Varios clones fueron localizados utilizando un suero de conejo inmunizado con proteínas de superficie iminobiotiniladas. Entre ellos, uno que codificaba determinantes antigénicos presentes en una proteína de 85 kDa específica de tripomastigotes. Los autores sugieren que podría tratarse de la Tc85 descrita por Andrews et al. (Andrews, 1984). La especificidad fue confirmada al localizar un ARN mensajero de 3.8 Kb homólogo al clon únicamente en tripomastigotes. El análisis de la secuencia del inserto reveló una estructura repetitiva formada por 5 unidades de 27 pb cada una. El hallazgo de segmentos repetidos en un antígeno de *T. cruzi* resultó de sumo interés, sobre todo al tener en cuenta la situación en *Plasmodium*, en el que ya se han descrito varios antígenos con estructura repetitiva (Kemp, 1987). El posterior análisis de este gen reveló que pertenece a una familia multigénica, de la cual sólo tres de sus miembros contienen la secuencia repetitiva. Sólo uno de ellos parece ser expresado y aparentemente tendría localización telomérica (Manning, 1988). Los mismos autores encontraron que la unidad repetida de 9 aminoácidos es reconocida por el suero de ratones infectados con *T. cruzi*.

Más recientemente, el mismo laboratorio reportó el clonado de un fragmento de ADN complementario de *T. cruzi* que codifica deter-

minantes antigénicos presentes en una proteína de superficie de 90 kDa, específica de tripomastigotes (Beard, 1988). Aparentemente, este gen también pertenecería a una familia multigénica, en este caso, de aproximadamente 20 miembros. La proteína sólo pudo ser detectada en algunas cepas del parásito y, además, sólo algunos de los sueros de pacientes chagásicos estudiados reconocieron al producto clonado.

Dragon y colaboradores aislaron un gen expresado por ambas formas del parásito que presentaba un 60% de homología con genes de proteínas de respuesta al calor ("heat shock proteins") de levaduras y de *Drosophila* (Dragon, 1987). Los autores utilizaron experimentos de hibridación-selección-traducción con grupos de clones de un banco de ADN complementario de epimastigotes. Los productos fueron inmunoprecipitados con sueros de pacientes chagásicos y analizados en electroforesis. Se seleccionó un grupo de clones cuyos productos se encontraban en el rango de 70 a 90 kDa del que finalmente se aisló el gen antes mencionado. Este gen codificaba por una proteína de 85 kDa distinta de la descrita por los otros autores ya que no pudo ser reconocida por sueros de conejos contra proteínas de superficie de tripomastigotes. Un ARN mensajero de 2.7 Kb, homólogo al gen, fue localizado en ambos estadíos del parásito. A pesar de la homología con proteínas de "heat shock", el producto de este gen era expresado constitutivamente. Los autores especulan sobre las implicancias del hallazgo de anticuerpos contra proteínas de "heat shock" en sueros de pacientes crónicos, en particular con referencia a la postulada participación de reacciones autoinmunes en la patología de la enfermedad de Chagas (ver Autoinmunidad).

## **Diagnóstico de la enfermedad de Chagas**

La baja proporción de casos con manifestaciones clínicas en etapas tempranas y la naturaleza imprevisible de la patología en infecciones crónicas determinan la importancia del desarrollo de métodos de diagnóstico que permitan la detección precisa de la infección y que eventualmente sirvan para pronosticar sus consecuencias. Varios

métodos de laboratorio han sido desarrollados para la detección de infecciones de *T. cruzi* en humanos (Storino, 1985).

El hallazgo e identificación del parásito en sangre periférica se recomienda normalmente como el diagnóstico de elección en la etapa aguda de la enfermedad. Existen numerosos métodos, directos e indirectos, de distintos grados de complejidad. Entre los directos, pueden mencionarse el exámen fresco entre porta y cubre, el de gota gruesa, el método de silicones y otros métodos basados en la concentración de parásitos por centrifugación diferencial. El grado de sensibilidad de estos métodos es muy variable y depende del nivel de parasitemia del paciente y del cuidado y dedicación de la observación. Puede alcanzarse, como máximo, hasta un 95% para los casos agudos con el método de concentración de Strout (Strout, 1962).

Entre los métodos indirectos están la inoculación de animales de laboratorio, el hemocultivo y el xenodiagnóstico. Este último ha probado tener una gran sensibilidad en los casos agudos (casi 100%) observándose solo un 50% para los crónicos. El método tiene desventajas de orden práctico pues se requiere de una costosa infraestructura para la crianza de los insectos y de varias horas-hombre para el estudio de los preparados (Storino, 1985).

El inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa en la detección de anticuerpos específicos anti *T. cruzi* generados en el curso de la infección. Se indica especialmente para la etapa crónica o latente de la enfermedad. Entre las técnicas más usadas se encuentran la reacción de fijación de complemento, las reacciones de hemaglutinación, la reacción de aglutinación directa, la reacción de inmunofluorescencia y las reacciones inmunoenzimáticas o ELISA. La sensibilidad de estas técnicas para los casos agudos oscila entre el 30% y el 100% y depende del tiempo transcurrido desde la infección. La mayor sensibilidad se obtiene hacia el segundo y cuarto mes. Las reacciones de inmunofluorescencia y ELISA han probado ser las más sensibles de las técnicas mencionadas (entre 70% y 90% para los casos crónicos). Se acepta que, para que el diagnóstico de laboratorio con estos métodos tenga valor, deben utilizarse por lo menos dos de las reacciones serológicas antes mencionadas (Storino, 1985).

Los métodos de inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizados corrientemente hacen uso de poblaciones de antígenos heterogéneas y no estandarizadas (extractos acuosos, suspensiones, etc.) (Krettli, 1982a). Esto obliga generalmente a optar entre sensibilidad y especificidad, lo que a menudo ocasiona la aparición de falsos positivos y reacciones cruzadas con otras enfermedades como toxoplasmosis y leishmaniasis (Kirchoff, 1987). Por el mismo motivo, estos métodos no permiten la detección de anticuerpos con diferentes especificidades, lo que hace que, hasta el momento, no se cuente con métodos que permitan "pronosticar" la evolución de los pacientes y/o prescribir algún tratamiento de los actualmente disponibles.

Varios laboratorios se han dedicado a la búsqueda de antígenos específicos de *T. cruzi* que sean únicamente reconocidos por sueros de pacientes chagásicos. En la mayoría de los casos, las distintas observaciones resultaron contradictorias y difíciles de generalizar. Si bien distintos autores han identificado varias moléculas reconocidas por diferentes sueros inmunes, no hay, hasta el momento, acuerdo en los pesos moleculares, ni en las especificidades de estadio, ni en las variedades de cepas del parásito en las que estarían presentes (Kirchoff, 1987; Dragon, 1985) (ver Composición antigénica de *T. cruzi*). Además, la implementación práctica del diagnóstico con las técnicas empleadas en estos trabajos es incierta y difícil de adaptar a ensayos de rutina. Al respecto, el uso de anticuerpos monoclonales puede ser una alternativa; si bien en un intento inicial en el que se usó esta metodología, los falsos positivos sólo pudieron ser eliminados a costa de una gran pérdida de sensibilidad (Lemesre, 1986).

En este contexto, la aplicación de las técnicas de clonado molecular en la búsqueda de antígenos específicos de *Trypanosoma cruzi* abre un nuevo panorama para el desarrollo de métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

## Perspectivas de vacunación en la enfermedad de Chagas

La profilaxis de la enfermedad de Chagas se lleva a cabo, normalmente, mediante el control del vector. En el estado de São Paulo, Brasil, el insecto ha sido casi completamente erradicado mediante el uso de insecticidas. Por otro lado, no se disponen de drogas para el tratamiento masivo de la enfermedad y el mejoramiento de viviendas para el control del vector es una empresa que depende más de decisiones políticas que técnicas. ¿Cuál es entonces el papel de una vacuna en este contexto?

Existen varias razones por las cuales la inmunización contra *T. cruzi* se considera como una alternativa para el control de la enfermedad. En particular, la mayoría de los países endémicos no se muestran inclinados a tomar la decisión política de lanzar costosos programas de control basados en el uso de insecticidas. Tal vez, influenciados por la experiencia en malaria, en donde el control basado en la quimioterapia y en los insecticidas se ha encontrado con muchas dificultades.

Hasta el momento, sin embargo, todos los intentos de vacunación realizados en animales con diferentes preparaciones de antígenos de *T. cruzi* (parásitos vivos atenuados o no proliferativos; parásitos muertos fijados; glicoproteínas de superficie purificadas; homogenatos celulares o fracciones subcelulares) no han resultado exitosos y, en el mejor de los casos, sólo se pudo obtener protección parcial frente a la infección experimental (Brener, 1986).

En humanos, las lesiones en corazón y tubo digestivo aparecen a menudo tardíamente en el curso de la enfermedad (10 a 20 años después de la infección) y no se ha encontrado evidencia de que exista una correlación entre las lesiones y la gravedad de los estadios tempranos de la enfermedad. Por este motivo, sólo serían aceptables para desarrollar aquellas vacunas que brinden protección total en animales. ¿Por qué los ensayos de vacunación contra *T. cruzi* intentados hasta el momento sólo han dado como resultado, cuando mucho, protección parcial?

Según Brener, los resultados de las investigaciones realizadas sobre anticuerpos "líticos" (ver Inmunidad humoral y celular), podrían ayudar a responder a esta pregunta (Brener, 1986). Sólo estos anticuerpos pueden detectar formas sanguíneas vivas en ensayos de inmunofluorescencia y son los únicos que pueden mediar la destrucción de tripomastigotes de sangre por citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente; por lisis mediada por complemento o por fagocitosis. Según este autor, las implicaciones de estos descubrimientos en la inmunoprotección de la enfermedad de Chagas son muy importantes. Ya que los anticuerpos detectables por serología convencional inducidos por diferentes antígenos no reconocen formas sanguíneas vivas, es probable que éstos sean malos mediadores de mecanismos inmunes que dependan de la presencia de anticuerpos sobre la superficie de la célula blanco.

La evidencia experimental acumulada por estos autores sugiere la existencia de antígenos de *T. cruzi* responsables de la resistencia del huésped. Debería ser posible someter a prueba la hipótesis de que sólo los antígenos inductores de anticuerpos líticos son capaces de generar una protección estable contra *T. cruzi*. Por otro lado, no hay garantía de que esto ocurra ya que el tripanosoma ha desarrollado, a su vez, varios mecanismos de evasión ("capping", "fabulation", etc.) por los cuales el parásito puede escapar de la respuesta inmune (Schmunis, 1980; Krettli, 1980). Además, no se puede descartar la posibilidad de que los anticuerpos líticos sean simplemente marcadores de eventos subyacentes más complejos. Las implicaciones prácticas, en el caso de que estos antígenos induzcan un fuerte efecto protector, son difíciles de predecir. En principio, sólo deberían considerarse aquellos antígenos que generen total protección en el tiempo y que no ocasionen ningún tipo de agresión autoinmune (Brener, 1986).

## **Objetivos y alcances de la presente investigación**

La complejidad de la composición antigénica de *Trypanosoma cruzi* hace que sea necesario un mayor esfuerzo no sólo para el mejor entendimiento de la biología del parásito sino, también, para la localización de moléculas que puedan ser aplicadas a problemas prácticos como diagnóstico y vacunación.

En el presente trabajo de tesis se encaró el estudio de la composición antigénica de *Trypanosoma cruzi* preguntando qué moléculas del parásito son detectadas por sueros de pacientes chagásicos. El enfoque metodológico consistió en la localización de genes del parásito cuyos productos sean reconocidos por sueros de pacientes. Seguidamente, se analizaron los distintos genes aislados y sus respectivos productos en relación al ciclo de vida del tripanosoma y a la respuesta inmune del huésped.

Se estudiaron las características estructurales, la organización y la localización subcelular de los productos clonados. Se estudió el patrón de su expresión en distintos estadios del ciclo de vida del parásito y durante el curso de la infección experimental en animales. Se aislaron y purificaron los productos de los clones como proteínas de fusión y se obtuvieron péptidos sintéticos de regiones antigénicamente relevantes. Estos fueron utilizados en la producción de anti-sueros específicos en conejos y en la detección de sueros de pacientes chagásicos.

Por último, se investigó la relevancia antigénica de las moléculas localizadas analizando sueros de animales infectados experimentalmente con distintas cepas del parásito y sueros de pacientes crónicos y agudos de distintas procedencias, con el objeto de identificar moléculas que puedan ser utilizadas en diagnóstico y en experimentos de protección.

## **MATERIALES Y METODOS**



## Parásitos

### Cepas

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

RA: aislada en la provincia de La Pampa, Argentina, en 1978, de un paciente con infección aguda (González Cappa, 1981).

Tulahuén (Tul): aislada de un triatomíneo en Chile (Pizzi, 1956).

Miranda (clon 76): aislada de un paciente con infección crónica (Engel, 1982).

AWP: aislada en la provincia de Santiago de Estero, Argentina, en 1970, de un niño con infección aguda.

UP: aislada en 1970 de un paciente infectado accidentalmente en el laboratorio.

CA1: aislada en la provincia de San Luis, Argentina, en 1974, de un paciente con miocarditis chagásica crónica (González Cappa, 1980).

Y: aislada en Brasil de un paciente con infección aguda.

Tcc: variante atenuada derivada de la cepa Tulahuén (Basombrío, 1982).

Las cepas RA, Tul, Y, AWP y UP son todas letales en ratón y producen, según la dosis, un máximo de parasitemia entre los días 7 y 10 post-infección. La cepa CA1 no es letal en ratón y produce la máxima parasitemia entre los días 25 y 30 post-infección. La cepa Tcc produce infección atenuada y limitada, sin parasitemia detectable. Como control, también se utilizaron parásitos de cultivo de la especie no-patogénica *Crithidia fasciculata*.

### Cultivo de parásitos

Los epimastigotes se crecieron a 28°C en medio líquido de Warren con el agregado de suero fetal bovino al 4% (Warren, 1960). Los parásitos se cosecharon en la fase logarítmica tardía del cultivo y se lavaron 3 veces con CINA 0.15 M.

Los tripomastigotes fueron obtenidos de cultivos de células Vero infectados (Zingales, 1985). Los parásitos se cosecharon a los 5 días post-infección y fueron lavados con medio de cultivo.

Los sobrenadantes del cultivo de células Vero infectadas con tripomastigotes fueron obtenidos a los 5 días post-infección. Se centrifugaron tres veces a 10000 rpm para asegurar la ausencia de parásitos y se guardaron a -70°C. En algunos casos, los tripomastigotes fueron incubados durante 5 y 15 hs. a 37°C en medio libre de células. Estos sobrenadantes fueron tratados de la misma forma que los anteriores.

### Obtención de tripomastigotes de sangre

Los tripomastigotes de sangre fueron obtenidos de ratones infectados en el punto de máxima parasitemia. La sangre heparinizada fue centrifugada 5 min. a 1000 rpm. Se dejó una hora a 37°C luego de lo cual, los parásitos fueron cosechados del sobrenadante (plasma). El procedimiento se repitió agregando medio de cultivo al pellet de células sanguíneas. Ambas fracciones se juntaron y los parásitos se lavaron 2 a 3 veces con medio de cultivo con 2% de suero fetal bovino. El plasma libre de parásitos se recentrifugó varias veces a 10000 rpm y se guardó en alícuotas a -70°C.

## Sueros

### Sueros de infección

Los sueros humanos de casos crónicos fueron obtenidos de pacientes diagnosticados en Buenos Aires, Argentina (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> y controles), en la provincia del Chaco, Argentina (H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>27</sub>, H<sub>33</sub> y controles), en los estados de Goiás y Bahía, Brasil (Luquetti, 1986) (AL<sub>1-8</sub> y CR<sub>1-5</sub>), en el estado de São Paulo, Brasil (MC<sub>184</sub>, MC<sub>186</sub> y controles) y en Honduras (Hond<sub>1</sub>, Hond<sub>2</sub> y Hond<sub>3</sub>). Los sueros de casos agudos (A<sub>1-28</sub>) fueron obtenidos de pacientes diagnosticados en los estados de Minas Gerais y Bahía, Brasil (Luquetti, 1986). En estos pacientes, los síntomas agudos de la enfermedad comenzaron 15 a 80 días antes de la recolección de la sangre. Los sueros de casos de

leishmaniasis visceral (Kala-Azar) (L<sub>04</sub>, L<sub>07</sub>, LB<sub>1</sub> y LB<sub>2</sub>) fueron obtenidos de pacientes diagnosticados en Brasil.

Los sueros de conejos fueron obtenidos de animales infectados intraperitonealmente con  $2 \times 10^6$  tripomastigotes de sangre vivos. Los sueros de ratones infectados con la cepa Tul se obtuvieron luego de una o dos dosis intraperitoneales de  $10^3$  a  $10^4$  tripomastigotes de sangre, mientras que para los de los ratones infectados con CA1 y RA la dosis fue de  $10^6$  tripomastigotes. Los sueros anti-Tcc fueron obtenidos de animales infectados con  $10^6$  epimastigotes de cultivo de los cuales el 8% eran tripomastigotes.

### Sueros anti-proteínas de fusión y anti-péptidos sintéticos

Las proteínas de fusión fueron purificadas por electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida de extractos de cultivos de *Escherichia coli* Y1088 infectados con los distintos virus recombinantes. Los sueros de conejo anti-proteínas de fusión fueron obtenidos luego de dos inoculaciones subcutáneas de las proteínas purificadas del gel por electroelución (en dosis de aproximadamente 100 µg) y homogeneizadas en adyuvante completo de Freund.

Los péptidos fueron sintetizados en un equipo de Bioapplied Systems™ en el Departamento de Inmunología (Biomedical Center) de la Universidad de Uppsala, Suecia. Fueron diseñados en base a las secuencias consenso de las unidades repetitivas de cada clon, tomando, según su longitud, 2 o 3 unidades por péptido. Las secuencias de los péptidos sintetizados son las siguientes: clon 2, PSPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDK (24 aa'); clon 10, RSVLNERLRSLNERL (16 aa'); clon 13, KSAEPKSAEPKSAEP (15 aa') y clon 30, EKQKAAEATKVAEAEKQRAAEATKVAEA (28 aa'). La pureza (>99%) y composición fueron controladas en análisis de espectrografía de masas y HPLC. Los péptidos fueron acoplados a una molécula "carrier" (KLH) por el método del glutaraldehído. Péptido y KLH (en relación molar 200:1) fueron solubilizados en 1 ml de PBS, luego se agregó gota a gota 1 ml de glutaraldehído 0.25% y se incubó a 4°C con agitación suave 12 a 16 hs. Por último, se dializó toda la noche contra PBS. Los sueros de conejo anti-péptido fueron obtenidos luego de dos inoculaciones subcutáneas de los péptidos acoplados a KLH (en dosis de

aproximadamente 500 µg) y homogeneizados en adyuvante completo de Freund.

## **Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.** **Electroforesis, transferencia e hibridación.**

### **ADN nuclear**

ADN total de epimastigotes fue purificado de extractos deproteinizados del parásito. El ADN kinetoplástico fue separado del ADN nuclear por centrifugación (Borst, 1980). El ADN nuclear fue digerido con endonucleasas de restricción, fraccionado por electroforesis en geles de agarosa 0.8% (2µg por calle aproximadamente) (Maniatis, 1982) y transferido a filtros de nitrocelulosa (Southern, 1975). Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago λ digerido con HindIII. Los filtros se hibridaron con los insertos de los respectivos clones marcados radiactivamente por "nick translation" (Rigby, 1977). Los lavados finales se hicieron en 0.1 X SSC y SDS 0.1% a 65°C, después de lo cual fueron revelados por autorradiografía.

### **ARN**

ARN celular total de epimastigotes y tripomastigotes (cepa RA) se purificó por el método de urea-CILi (Auffray, 1980). ARN poli(A)<sup>+</sup> fue purificado del ARN total por cromatografía en oligo(dT) celulosa (Maniatis, 1982). El ARN fue tratado con glioxal, fraccionado por electroforesis en geles de agarosa 1.2% (5µg por calle aproximadamente) y transferido a filtros de nitrocelulosa (Thomas, 1980). Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago λ digerido con HindIII y tratado con glioxal. Los filtros se hibridaron en las mismas condiciones que las descritas para el ADN nuclear.

## **Secuenciación de ADN**

Las secuencias de ADN fueron determinadas por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Para

ello, los insertos de  $\lambda$ gt11 fueron subclonados en el sitio EcoRI del plásmido pUC19. En algunos casos, para completar y ordenar las secuencias obtenidas de cada clon, particularmente en las regiones con repeticiones, se subclonaron fragmentos de digestiones parciales con endonucleasas de restricción y de digestiones con Bal 31 y Exo III (Maniatis, 1982). Porciones seleccionadas de algunos insertos fueron secuenciadas por el método de degradación química (Maxam, 1977).

### **Clonado de ADN en $\lambda$ gt11**

$\lambda$ gt11 es un vector procariótico derivado del fago  $\lambda$  de *Escherichia coli* que permite la expresión del fragmento clonado a través del promotor bacteriano *lac* inducible por IPTG (Young, 1983). El producto codificado por el inserto se expresa como proteína de fusión con la enzima bacteriana  $\beta$  galactosidasa. Este sistema ha permitido la localización de numerosos genes mediante anticuerpos específicos contra el producto del gen que se desea clonar.

ADN nuclear de epimastigotes de la cepa Miranda (clon 76) fue fragmentado mecánicamente mediante repetidos pasajes por jeringa hasta que los fragmentos estuvieron en el rango de 1 a 10 Kpb. Este material fue tratado con metilasa EcoRI, los extremos fueron reparados con T<sub>4</sub> ADN polimerasa y fue ligado a "linkers" EcoRI con T<sub>4</sub> ADN ligasa. A continuación, fue digerido con un exceso de EcoRI y los fragmentos en el rango de 2 a 8 Kpb fueron purificados por cromatografía en Sephacryl S-1000. El ADN así purificado fue ligado a ADN del vector  $\lambda$ gt11 tratado con EcoRI y fosfatasa alcalina bacteriana y empaquetado *in vitro*. Parte del virus empaquetado fue utilizado directamente para el "screening" inmunológico y otra parte fue amplificada infectando células de *Escherichia coli* Y1088.

### **"Screening" inmunológico**

El suero de un paciente crónico de enfermedad de Chagas (H<sub>2</sub>) fue utilizado para el "screening" inmunológico del banco genómico construido en  $\lambda$ gt11. Los anticuerpos inespecíficos fueron removidos

incubando el suero con lisados de *Escherichia coli* Y1090. Parte del virus empaquetado (ver Clonado de ADN en  $\lambda$ gt11) fue utilizado directamente para infectar células de *E. coli* Y1090. Se crecieron 300000 placas de lisis (de las cuales el 90% era recombinante, a juzgar por la reacción colorimétrica con X-gal) en 3 cajas de 30 cm de diámetro a 42°C durante 3 hs. La inducción se realizó a 37°C con filtros de nitrocelulosa embebidos en IPTG 10 mM. Se levantaron filtros por duplicado, el primero se incubó durante 3 hs. y el segundo durante toda la noche. Los filtros fueron lavados en TBS y bloqueados en TBS + BSA 3%. A continuación se incubaron con el suero H<sub>2</sub> diluído 1/100 en TBS + BSA 3% durante 2 hs. a temperatura ambiente. Luego fueron lavados 4 veces en TBS e incubados con proteína A marcada radiactivamente con <sup>125</sup>I en TBS + BSA 3% ( $1 \times 10^6$  cpm/ml) durante una hora bajo campana a temperatura ambiente. Por último, se lavaron 5 veces en TBS, el tercer lavado contenía también Nonidet P-40 0.1%. Los filtros se expusieron toda la noche a -70°C con pantallas intensificadoras. Solo fueron seleccionadas para sucesivos "screenings" las placas de lisis detectadas por duplicado en ambos filtros. El procedimiento se repitió 3 a 4 veces hasta que todas las placas en cada caja de petri fueron positivas.

## **Selección de anticuerpos**

Anticuerpos específicos contra los productos de cada clon fueron seleccionados de sueros de infección diluídos 1/50 con TBS + BSA 3% (Saint, 1986). Se creció un césped de *E. coli* Y1090 infectado a confluencia con el clon recombinante en  $\lambda$ gt11 durante 2-3 hs. a 42°C. Luego se colocó un filtro de nitrocelulosa embebido en IPTG 10 mM y se incubó a 37°C durante 3 horas de un lado y durante toda la noche del otro. Los filtros fueron entonces procesados como en el "screening" inmunológico hasta la incubación con el suero. A continuación, se lavaron 5 veces en TBS, la tercera vez se incluyó Nonidet P-40 0.05%. Los anticuerpos se eluyeron durante 6 min. en una solución de glicina 0.1 M y ClNa 0.15 M, pH 2.6. Seguidamente, el pH se ajustó con Tris/ClH pH 8.00 1 M y se agregó BSA al 3%. Los anticuerpos se guardaron alicuotados a -20°C.

## **Electroforesis de proteínas, transferencia y reacción con sueros**

Se prepararon extractos de proteínas totales de epimastigotes y tripomastigotes de la cepa RA resuspendiendo pellets de parásitos en una solución de DTT 1.5%, SDS 1%, Tris/ClH pH 6.8 80 mM, glicerol 10% y azul de bromofenol 2% (1 g de peso húmedo en 2 ml). Este extracto fue calentado a 100°C durante 4 min. y centrifugado 2 min. a 13000 g. El sobrenadante fue fraccionado por electroforesis en geles de poliacrilamida 10% con SDS 0.1% (15µg de proteínas por calle aproximadamente) (Laemli, 1970). Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla que contenía ovoalbúmina (45 kDa), BSA (66 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), β galactosidasa (116 kDa) y miosina (205 kDa).

Los geles fueron electrotransferidos a filtros de nitrocelulosa (Burnette, 1981), los cuales se hicieron reaccionar con sueros y anticuerpos siguiendo el procedimiento descrito para el "screening" inmunológico, a excepción de la actividad final de la proteína A <sup>125</sup>I que fue de 5 x 10<sup>5</sup> cpm/ml.

Las muestras de sobrenadantes de cultivo de parásitos (cepa RA) fueron concentradas 20 veces por liofilización y tratadas de la misma forma que los extractos de proteínas totales. En este caso, 100 µl del sobrenadante concentrado fueron sembrados en cada calle del gel.

Las muestras de plasma de ratones infectados (cepa RA) fueron concentradas 5 veces por liofilización. 40 a 50 µl del plasma concentrado fueron fraccionados por electroforesis en geles de poliacrilamida 7.5% con SDS 0.1% y transferidos a filtros de nitrocelulosa como se describió anteriormente. En este caso, luego de la incubación con suero, los filtros se hicieron reaccionar con un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado a biotina, que se reveló utilizando la reacción colorimétrica del sistema biotina-avidina-peroxidasa (Vectastain™).

## **Detección de anticuerpos contra productos clonados en sueros de infección**

Sobre un césped de *E. coli* Y1090 fueron sembradas gotas de 0.5 µl del stock de virus de cada clon ( $10^{11}$  pfu/ml). Se incubó a 42°C hasta la aparición de placas de lisis después de lo cual se colocaron filtros de nitrocelulosa embebidos en IPTG 10 mM y se continuó a 37°C durante 3 a 4 horas. Los filtros se hicieron reaccionar con los diferentes sueros como se describió para el "screening" inmunológico.

## **Inmunofluorescencia**

Las inmunofluorescencias se realizaron con epimastigotes vivos de cultivo líquido y tripomastigotes vivos de cultivos de células Vero (en ambos casos de la cepa RA). Se utilizaron anticuerpos seleccionados de un suero humano chagásico (H<sub>2</sub>) y sueros de conejos inmunizados con distintas proteínas de fusión. Como controles negativos fueron utilizados sueros normales humanos y de conejo. Como controles positivos se usaron un suero de conejo infectado (cepa AWP) y el suero humano H<sub>2</sub>. El segundo anticuerpo fue anti-inmunoglobulinas humanas o de conejo conjugado con fluoresceína.



## **RESULTADOS**

## **Clonado de genes que codifican antígenos de *T. cruzi***

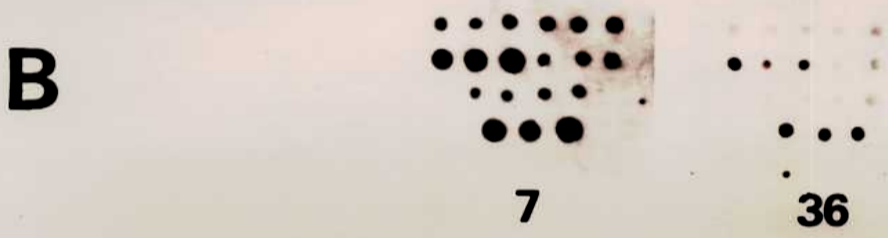
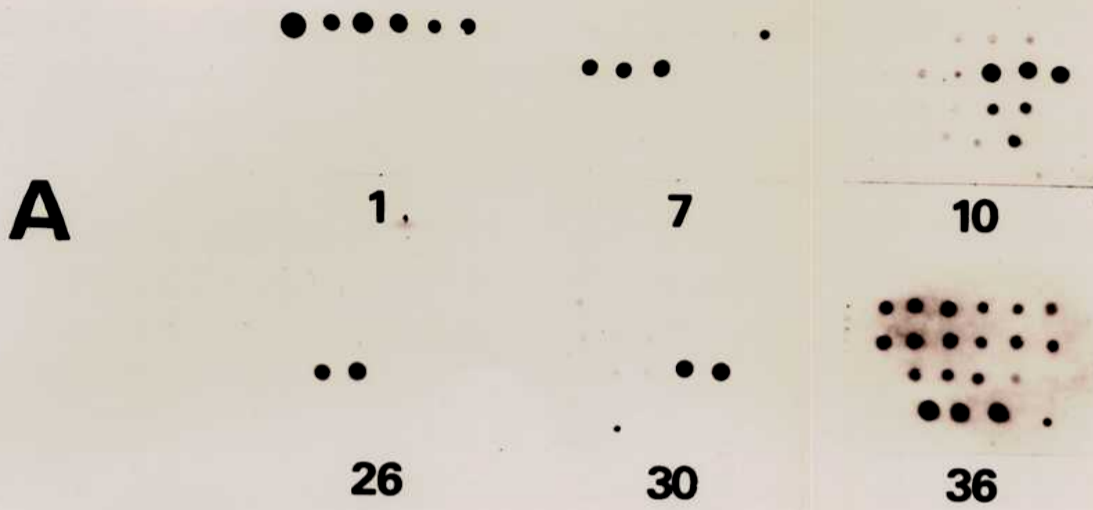
### **Identificación de 12 grupos de clones recombinantes diferentes**

Se construyó un banco genómico de *Trypanosoma cruzi* en el sitio EcoRI del vector  $\lambda$ gt11 utilizando ADN nuclear del parásito fragmentado por ruptura mecánica. Para el "screening" inmunológico, el suero de un paciente chagásico (H<sub>2</sub>) fue elegido de entre otros sueros por ser el que más intensamente reaccionaba con extractos de parásitos lisados (no mostrado). El "screening" de 300000 clones recombinantes diferentes dió como resultado 53 clones positivos detectados en ambos filtros por duplicado. 25 de estos clones fueron purificados en sucesivos "screenings" hasta obtener placas de lisis positivas aisladas. Se obtuvo ADN de los 25 fagos positivos y se analizaron digestiones con EcoRI por electroforesis en geles de agarosa. El tamaño de los insertos de los clones varía entre 0.55 y 5.5 kpb aunque el 70% contienen fragmentos de 1.5 a 3.0 Kpb (tabla I).

Doce grupos diferentes de clones homólogos fueron identificados mediante experimentos de hibridación cruzada (no mostrados). Para esto, los insertos de los clones recombinantes marcados con <sup>32</sup>P fueron alternativamente hibridados con filtros a los que se había transferido digestiones con EcoRI del ADN de los 25 fagos positivos. Seis de los doce grupos contienen dos o más clones homólogos (tabla I). La homología entre los clones del mismo grupo fue confirmada por reacción con anticuerpos. En todos los casos, los anticuerpos del suero H<sub>2</sub> seleccionados con cada clon reaccionan con los productos de los clones del mismo grupo pero nunca con los de otros grupos (fig. 3A).

Se obtuvo un resultado diferente con los clones 7 y 36 al seleccionar anticuerpos de dos sueros de conejos infectados con la cepa AWP (AWP<sub>12</sub>, fig. 3B y AWP<sub>25</sub>, no mostrado). El clon 36 seleccionó anticuerpos que reaccionaban en forma cruzada con los productos de los clones 7, 9 y 41, con la misma intensidad que con los clones de su mismo grupo. Recíprocamente, el clon 7 seleccionó anticuerpos que reaccionaban con los productos de los clones 36, 40 y 50, además de los de su mismo grupo. Estos resultados no se debían al hecho de haber usado dos especies diferentes (humano y conejo) ya que al

**Figura 3.** Identificación de grupos de clones recombinantes con anticuerpos seleccionados. Filtros de nitrocelulosa que contenían a los productos de los clones recombinantes distribuidos como se indica al pie de la figura, se hicieron reaccionar con anticuerpos seleccionados del suero humano H<sub>2</sub> (A), o del suero de un conejo infectado con la cepa AWP de *T. cruzi* (B), con los productos de los clones recombinantes indicados al pie de cada fotografía.



1	3	42	43	44	53
7	9	41	10	45	47
26	15	30	46		
36	40	50			

seleccionar anticuerpos de un suero de conejo infectado con la cepa CA1 (que detecta igualmente a los clones 7 y 36), éstos sólo reaccionaron con los productos de los clones del mismo grupo sin reacciones cruzadas (no mostrado).

clon	tamaño del inserto (kpb)	clones homólogos
1	1.3	3, 42, 43, 44, 53
2	2.4	-
7	2.5	9, 41
10	2.8	45,47
13	2.2	-
19	4.0	-
22	5.0	-
26	2.3	15
30	0.65	46
36	0.7	40, 50
49	2.2	-
54	1.5	-

**Tabla 1.** Identificación de doce grupos de clones recombinantes diferentes. Se indica el tamaño del inserto de cada clon en kilopares de bases (kpb) y los clones que pertenecen al mismo grupo de homología.

### "Screening" diferencial con distintos sueros de infección

Con el propósito de determinar si los productos clonados eran representativos del total de moléculas del parásito antigénicamente activas durante la infección, otros sueros, de distintas procedencias, fueron utilizados para el "screening" inmunológico del banco genómico en  $\lambda$ gt11. Se utilizó la mezcla (1:1) de dos sueros de pacientes chagásicos crónicos diagnosticados en Brasil (MC<sub>184</sub> y MC<sub>186</sub>), la mezcla de dos sueros de pacientes diagnosticados en Honduras (Hond<sub>2</sub> y Hond<sub>3</sub>) y la de dos sueros de conejos infectados con parásitos de las cepas Y (Y<sub>27</sub>) y AWP (AWP<sub>24</sub>). Se levantaron filtros por triplicado de 3 cajas, cada una de las cuales contenía aproximadamente 150000 clones recombinantes diferentes. En cada caso, dos de los filtros se

hicieron reaccionar con una de las mezclas de sueros antes mencionadas. El tercero, en todos los casos, se hizo reaccionar con el suero humano H<sub>2</sub>.

Fueron contabilizadas las señales detectadas (por duplicado) con las mezclas de sueros y también las detectadas por H<sub>2</sub>. De la resta de las autorradiografías se obtuvieron las señales detectadas por cada suero específicamente (tabla II). El suero H<sub>2</sub> reaccionó con el 90% del total de clones localizados y con el 70% de los clones detectados por los nuevos sueros. Estos resultados indican que los clones aislados con este suero son representativos de la mayoría de las moléculas antigénicamente activas durante la infección de *Trypanosoma cruzi*.

sueros	señales detectadas por			señales totales
	sueros (totales)	H <sub>2</sub> (totales)	sueros (específicas)	
MC <sub>184</sub> + MC <sub>186</sub>	3	7	1	8
Hond <sub>2</sub> + Hond <sub>3</sub>	14	34	4	38
AWP <sub>24</sub> + Y <sub>27</sub>	5	13	2	15

**Tabla II.** "Screening" diferencial con sueros de infección. Sucesivos "screenings" inmunológicos del banco genómico en  $\lambda$ gt11 fueron realizados con distintos sueros de infección. Se utilizó la mezcla (1:1) de dos sueros de pacientes chagásicos crónicos diagnosticados en Brasil (MC<sub>184</sub> y MC<sub>186</sub>), la mezcla de dos sueros de pacientes diagnosticados en Honduras (Hond<sub>2</sub> y Hond<sub>3</sub>) y la de dos sueros de conejos infectados con parásitos de las cepas Y (Y<sub>27</sub>) y AWP (AWP<sub>24</sub>). En cada caso, un filtro duplicado fue incubado con el suero humano H<sub>2</sub>. Se muestran el número de señales detectadas con los nuevos sueros, el número de señales detectadas con H<sub>2</sub>, el número de señales detectadas por los nuevos sueros específicamente y el número total de señales.

## **Caracterización de los genes aislados y sus productos**

### **Identificación de las proteínas nativas homólogas a los productos de los clones aislados**

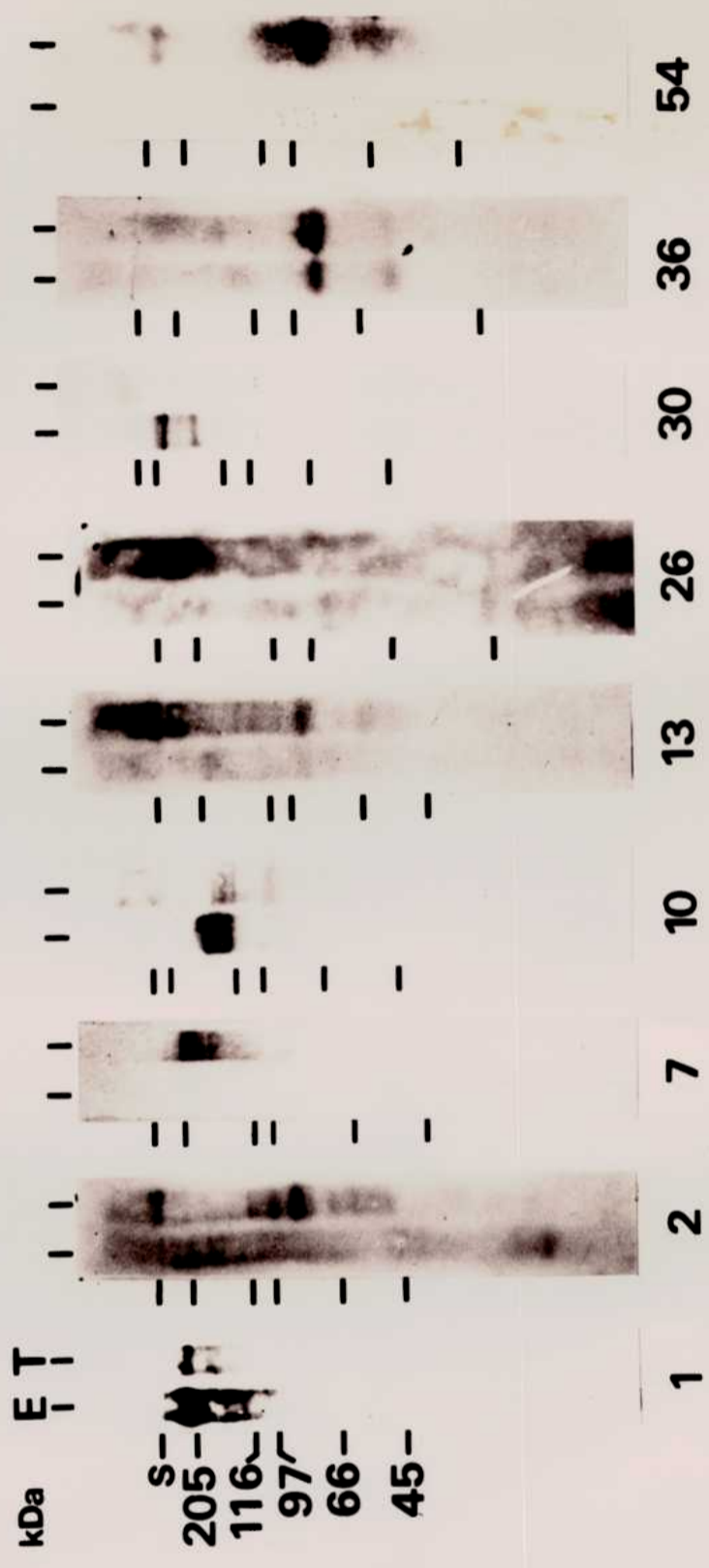
Se identificaron las proteínas nativas del parásito que comparten determinantes antigénicos con los productos de los clones aislados. Para ello, extractos de proteínas totales de epimastigotes y tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi* se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida que fueron luego transferidos a filtros de nitrocelulosa. Estos se hicieron reaccionar con anticuerpos del suero H<sub>2</sub> seleccionados por afinidad con el producto de cada clon recombinante (fig. 4). Como controles negativos, se hicieron reaccionar extractos de proteínas de *Crithidia fasciculata* con cada uno de los anticuerpos seleccionados, así como también extractos de proteínas de *T. cruzi* con anticuerpos seleccionados con el producto del vector  $\lambda$ gt11 no recombinante. Los clones 19, 22 y 49 no fueron analizados ya que sus productos no son reconocidos por casi ninguno de los sueros utilizados (ver Relevancia antigénica de los productos clonados).

Los anticuerpos seleccionados con el producto del clon 1 detectan una proteína mayor de 205 kDa en los extractos de ambos estadios del parásito, aunque parece ser varias veces más abundante en epimastigotes. Los anticuerpos seleccionados con el producto del clon 2 reconocen una proteína de 85 kDa únicamente en el estadio tripomastigote. Cinco proteínas (de 165 a 205 kDa) homólogas al producto del clon 7 se detectan en tripomastigotes pero no en epimastigotes. La detección de más de una banda en los extractos de proteínas con este y otros clones puede deberse a que los mismos epitopes se encuentren en proteínas diferentes, a la presencia de productos de genes homólogos con inserciones o deleciones o a la presencia de productos intermediarios de la síntesis (precursores) y/o de la degradación.

Los anticuerpos seleccionados con el producto del clon 10 detectan tres proteínas (125, 140 y 150 kDa) presentes en mucha mayor proporción en epimastigotes que en tripomastigotes. Los anticuerpos seleccionados con los clones 13 y 26 reconocen proteínas de 85 y 205 kDa respectivamente, sólo en el estadio tripomastigote del parásito.

**Figura 4.** Detección de proteínas nativas de *T. cruzi* con anticuerpos seleccionados. Extractos de proteínas totales de epimastigotes (E) y tripomastigotes (T) de la cepa RA de *T. cruzi* fueron fraccionados en geles de poliacrilamida al 10% y transferidos a filtros de nitrocelulosa, los cuales se hicieron reaccionar con anticuerpos seleccionados del suero humano H2 con los productos de los clones recombinantes indicados. En el caso del clon 1, fue utilizado un gel al 7.5%, ya que la banda detectada no ingresaba en los geles al 10%. Los marcadores de peso molecular son los descriptos en Materiales y Métodos. **s** indica la separación entre el gel "stacking" y el gel separador.





Por el contrario, únicamente pudieron ser detectadas proteínas homólogas al producto del clon 30 en epimastigotes (160, 195 y 205 kDa). Ya que hasta el momento, la presencia de epimastigotes en el huésped vertebrado no ha podido ser demostrada, este resultado podría estar ocasionado por bajos niveles de expresión de estas proteínas en tripomastigotes o por alguna particularidad de la regulación de su expresión durante el ciclo en el huésped vertebrado que no ocurre en los tripomastigotes de cultivo utilizados.

Por último, los anticuerpos seleccionados con el producto del clon 36 detectaron principalmente una proteína de 85 kDa en ambos estadios del parásito, mientras que con el clon 54 pudieron seleccionarse anticuerpos que reconocen una proteína de 90 kDa únicamente en tripomastigotes. Ninguna banda pudo ser detectada en los extractos de *Crithidia fasciculata* ni cuando se utilizaron anticuerpos seleccionados con  $\lambda$ gt11 no recombinante (no mostrado).

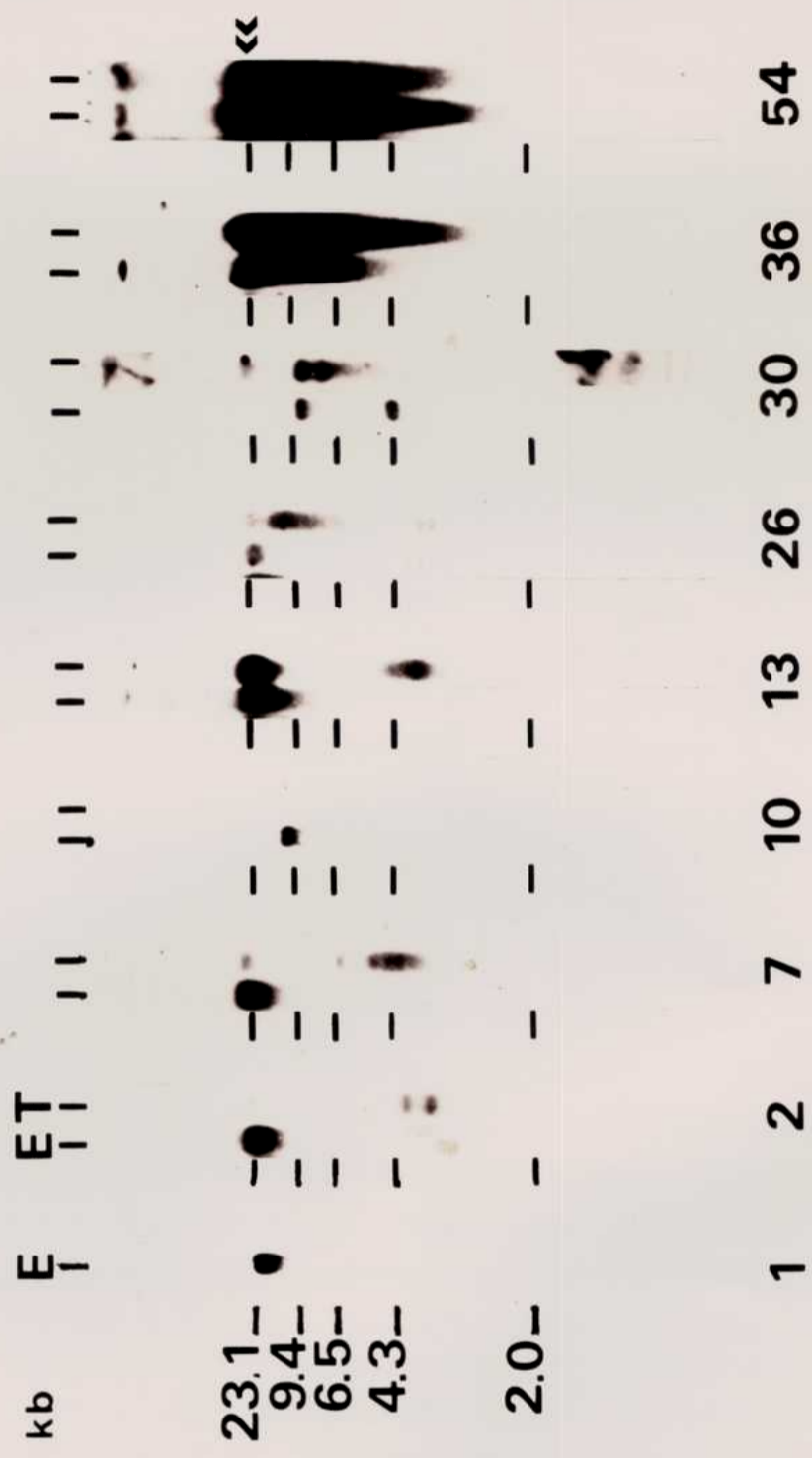
#### Identificación de los ARN mensajeros homólogos a los fragmentos clonados

Para confirmar la especificidad de estadio de los productos clonados, se analizaron los ARN mensajeros correspondientes (cepa RA) por hibridación con los insertos de ADN marcados radiactivamente (fig. 5).

El clon 1 detecta un ARN de aproximadamente 15 Kb en epimastigotes. El ARN de tripomastigotes no fue analizado. El inserto del clon 2 detecta dos especies de ARN de 3.5 y 4.8 Kb únicamente en tripomastigotes, en concordancia con lo observado con la proteína. Cuatro especies de ARN (de 4 a 5.8 Kb) son detectadas con el clon 7 en el estadio tripomastigote pero no en epimastigotes, lo que también confirma la especificidad observada anteriormente.

El ARN homólogo al inserto del clon 10 sólo pudo ser detectado en epimastigotes (10 Kb). Este resultado puede estar ocasionado por muy bajos niveles de expresión de esta especie de ARN en el estadio tripomastigote, como sugiere lo observado con la proteína (fig. 4). Los clones 13 y 26 permiten la detección de especies de ARN de 3.8 y 10 Kb respectivamente, sólo en tripomastigotes. A diferencia de lo observado en las proteínas, pudieron identificarse dos especies de ARN

**Figura 5.** Detección de especies de ARN homólogos a los insertos de los clones recombinantes. ARN total de epimastigotes (E) y tripomastigotes (T) de la cepa RA de *T. cruzi* fue fraccionado en geles de agarosa al 1.2% y transferidos a filtros de nitrocelulosa, los cuales fueron hibridizados con los insertos de clones recombinantes indicados. Las flechas a la derecha de la figura (< <) indican ADN contaminante. Los marcadores de peso molecular son los descriptos en Materiales y Métodos.



homólogas al clon 30 tanto en epi como en tripomastigotes. Ambos estadíos comparten un ARN de 8.4 Kb y, curiosamente, difieren en el tamaño de la especie menor (6.8 Kb en tripomastigotes y 4.3 Kb en epimastigotes). Este resultado indica que probablemente el producto del gen 30 sea expresado en ambos estadíos. La aparente ausencia de la proteína en tripomastigotes puede tener varias explicaciones, como se vió anteriormente.

Finalmente, no pudieron ser detectadas las especies de ARN homólogas a los clones 36 y 54. Ambos clones parecen contener secuencias presentes en varias especies de ARN diferentes lo que impide la identificación de bandas discretas (fig. 5). Se obtuvo el mismo resultado cuando se utilizó ARN poli(A)<sup>+</sup> en lugar de ARN total (no mostrado). Los resultados de la identificación de proteínas nativas y de ARN mensajeros se resumen en la tabla III.

### Organización genómica

Se analizó la organización de los genes del parásito homólogos a los clones aislados por digestión con endonucleasas de restricción. ADN nuclear de epimastigotes de la cepa CA1 de *T. cruzi* fue digerido con BamHI, EcoRI (fig. 6A), HindIII, PstI, HpaI y HaeIII (no mostrados) e hibridado con los insertos clonados marcados con <sup>32</sup>P. La mayoría de los clones, a excepción del 7 y 13, detectan fragmentos únicos de intensidad similar con todas las enzimas probadas. El inserto del clon 7 hibrida con varios fragmentos (fig. 6B). Varias bandas de alto peso molecular se detectan en las digestiones con las enzimas BamHI, EcoRI y HindIII. Grupos similares de cuatro fragmentos se observan en las digestiones de Pst I, HpaI y HaeIII. El patrón general con estas tres enzimas es el mismo aunque desplazado en la escala de peso molecular. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el clon 7 probablemente proviene de una familia de genes de por lo menos 4 o 5 copias.

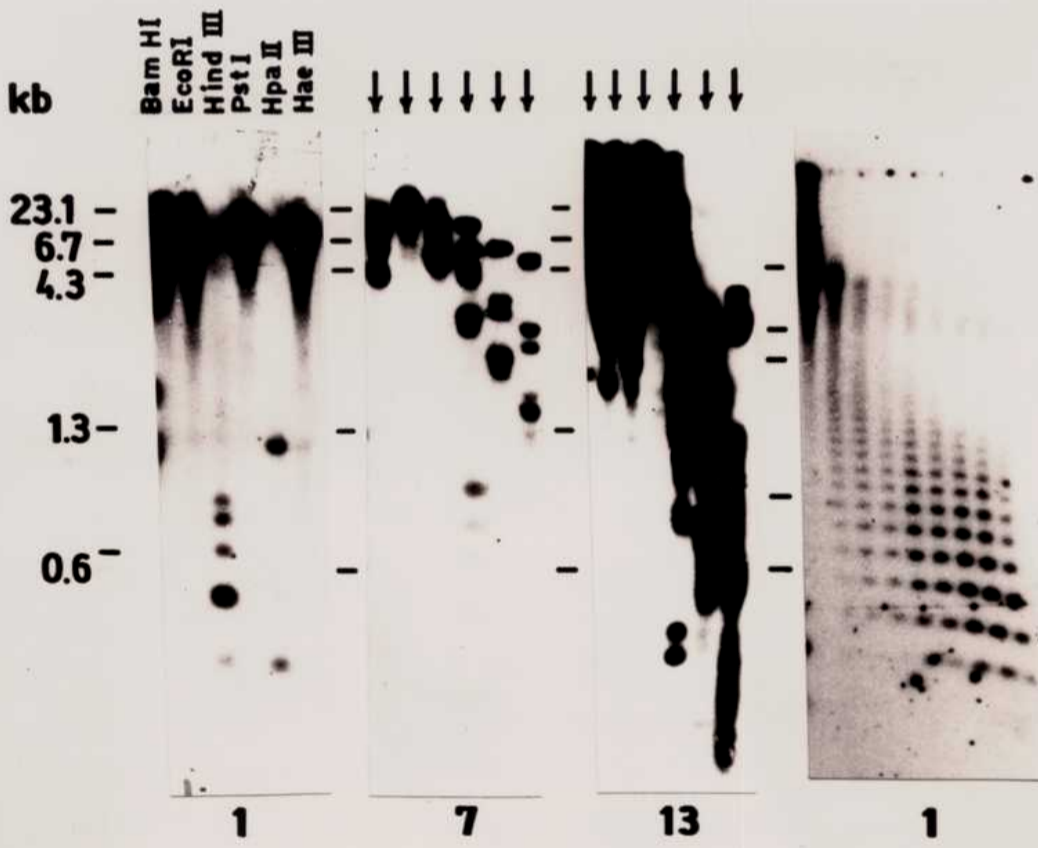
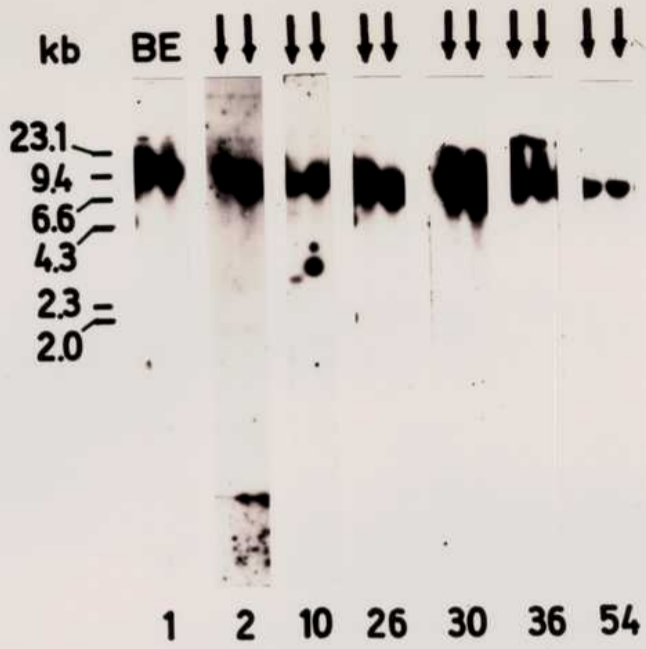
La hibridación con el inserto 13 revela un gran número de bandas (fig. 6B) aún en condiciones de alta estringencia. Ya que con este clon sólo se detecta una única especie de ARN (fig. 5), es posible que el inserto del clon 13 contenga secuencias repetitivas distribuídas por todo el genoma de *T. cruzi*.

clon	proteína nativa (kDa)	E o T	ARN mensajero (kb)	E o T
1	>205	E/T	15	E
2	85	T	3.5/4.1	T
7	165/175/190/200/205	T	4/4.3/4.8/5.8	T
10	125/140/150	E/T	10	E
13	85	T	3.8	T
26	>205	T	10	T
30	160/195/205	E	4.3(E)/6.8(T)/8.4(E/T)	E/T
36	85	E/T	N.D.	N.D.
54	90	T	N.D.	N.D.

**Tabla III.** Identificación de proteínas nativas y ARN mensajeros homólogos a los clones recombinantes. Se indican el peso molecular relativo de las proteínas en kilodaltons (kDa) y el peso molecular de las especies de ARN en kilobases (kb). La columna E o T indica si las proteínas fueron identificadas en epimastigotes, tripomastigotes o en ambos estadios. (E), (T) y (E/T) señalan especies de ARN que están presentes en sólo una de las formas del parásito. N.D. (no detectado) indica que la identificación de las especies de ARN no fue posible (ver texto).

**Figura 6.** Detección de genes homólogos a los insertos de los clones recombinantes. ADN nuclear de epimastigotes de la cepa CA1 de *T. cruzi* fue digerido con las diferentes enzimas de restricción indicadas y transferido a filtros de nitrocelulosa, los cuales fueron hibridizados con los insertos de los clones recombinantes 1, 2, 10, 26, 30, 36 y 54 (A) y 1, 7 y 13 (B). En el panel derecho (C), ADN de *T. cruzi* fue parcialmente digerido con Hind III e hibridizado con el inserto del clon 1. En el panel izquierdo, B y E indican Bam HI y Eco RI respectivamente. Los marcadores de peso molecular son los descritos en Materiales y Métodos.

A





Con ciertos clones, se detectaban únicamente bandas de pequeño peso molecular en algunas digestiones, como por ejemplo con HindIII y HpaII en el clon 1 (fig. 6B). Esto se debía a la presencia de secuencias repetidas, como lo muestran las digestiones parciales de ADN nuclear con la enzima HindIII en el caso del clon 1 (fig. 6C). La secuencia de ADN de los insertos confirmó estos resultados.

### Estructura primaria: la mayoría de los clones aislados contienen unidades de secuencias repetidas

Se obtuvieron secuencias completas o parciales de los insertos de los clones aislados (fig. 7 y Apéndice). Sorprendentemente, ocho de los nueve clones estudiados resultaron poseer una estructura interna repetitiva que, en la mayoría de los casos se localiza inmediatamente después de la región codificante de la  $\beta$  galactosidasa del vector  $\lambda$ gt11 (fig. 7). En los clones 7 y 15 (este último pertenece al grupo de homología del clon 26, ver fig. 3 y tabla I) las repeticiones aparecen a continuación de una zona de aproximadamente 140 y 800 pb de ADN no repetitivo respectivamente. Los insertos de los clones 1, 30 y 36 se encuentran compuestos únicamente por repeticiones.

La longitud de las unidades repetitivas varía entre los diferentes clones (fig. 8) aunque se mantiene constante en cada clon. Algunos clones contienen unidades cortas de 15 a 24 pb (clon 13 y clon 10 respectivamente) mientras que otros contienen largas repeticiones de 114 o 204 pb (clon 36 y clon 1 respectivamente). Las unidades de un mismo clon muestran entre sí alguna divergencia en la secuencia de bases. Las repeticiones de mayor longitud (clones 1 y 36) parecen estar más conservadas que las de menor longitud (clones 2, 10 y 13). Las bases variables se encuentran generalmente restringidas a ciertas posiciones (fig. 8).

El número de unidades repetidas presentes en los genes localizados parece ser elevado. Con el clon 1, fueron detectadas hasta 17 unidades de 204 pb cada una en digestiones parciales de ADN nuclear con HindIII (fig. 6C). 18 y 14 unidades de 36 pb cada una pudieron ser localizadas en los clones 2 y 7 respectivamente. En los insertos de los clones 10 y 13 se pudieron detectar 19 y 31 unidades respectivamente (fig. 8), y al menos 8 a 10 unidades más pueden ser identificadas por el patrón repetitivo en los geles de secuencia.



	secuencia de ADN	secuencia de aa'	repeticiones	
			n°	longitud(aa')
<b>clon 1</b> 204 pb	AGCATGAATGCCCGCCGACAGGAGCTGGCGCGGAGAGAA <u>A</u>			
	GCTTGCCGACCCGCGGTTCTTGACCAGAGCCGGAGGGCGG	SMNVAQELAREKKLADRAFLDQKPEGVPL		
	TGCCGCTGCGAGAGCTGCCGCTCGACGACGACGCGACTTTT	RELPLDDSDSFVAMEQERRRQOLEKDPRRN	6	68
	GTTGGATGGAGCAGGAGCGCAGACAGCAGCTCGAGAAGGA <u>C</u> CCCCGGCAGGAACCGGAGGGAGATTGCTGCCGCTTGAGGAG	AKELIAALEE <u>R</u>		
<b>clon 2</b> 36 pb	CCATCACA TTTGGACAGGCCGGCTCCAGGTGACAAA <u>C<sub>4</sub></u> <u>G<sub>4</sub></u> <u>T<sub>4</sub></u> <u>G</u> GTA C T GG <sub>2</sub>	P SPFGQAAAADK <u>P<sub>4</sub></u> <u>GTV</u> <u>R</u>	18	12
	GACAGCAGTGCACCACAGTACGCCCTCGACTCCCGCT <u>C<sub>2</sub></u> <u>A<sub>5</sub></u> <u>T<sub>6</sub></u>	DSSAHSITPSTPA <u>T<sub>2</sub></u> <u>G<sub>4</sub></u> <u>V<sub>6</sub></u>	14	12
<b>clon 10</b> 24 pb	AGGAGCGTGCCTCAACGAGAGGCTG <u>A<sub>7</sub></u> <u>C<sub>6</sub></u>	RSVLNERL <u>P<sub>6</sub></u>	19	8

**Figura 8.** Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las unidades repetitivas presentes en 8 de los clones. Se muestran las secuencias consenso y las posiciones variables. Los números al pie de las posiciones mutadas indican el número de repeticiones en las cuales la mutación se encuentra presente.

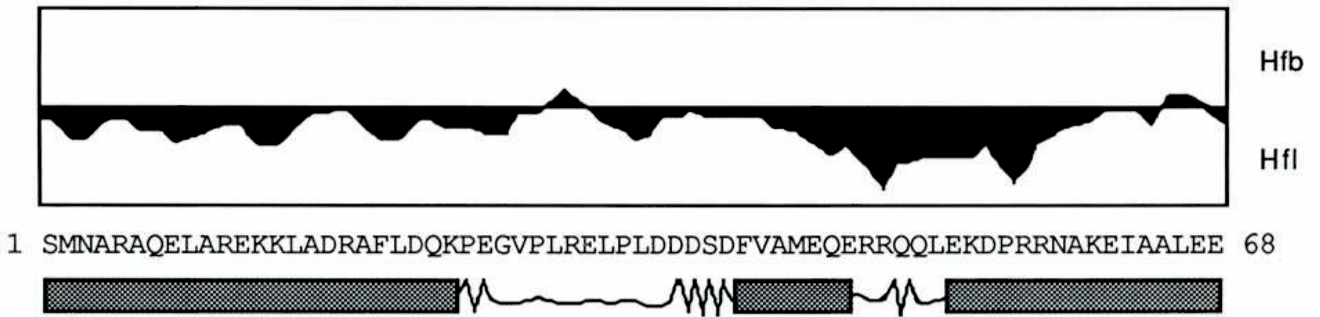
	secuencia de ADN	secuencia de aa'	repeticiones	
			n°	longitud(aa')
<b>clon 13</b> 15 pb	AAGTCA GCG GAGCC A <sub>4</sub> G <sub>3</sub> T <sub>11</sub>	KSAEP A <sub>3</sub> G <sub>3</sub>	31	5
<b>clon 15</b> 42 pb	TCATCCGCCAGCCTCTCATTCCTCCGGCCCTTCTGCTCAAGC G	SSASLSFSAASCSS	3	14
<b>clon 30</b> 42 pb	GAGAACGAGAGCCAGCTGAAGCCACGAAGGTTGCCCGAAGCG G <sub>5</sub> T <sub>3</sub> G <sub>3</sub> T <sub>3</sub>	EKQKAAEATKVAEA R <sub>5</sub> M <sub>3</sub>	13	14
<b>clon 36</b> 114 pb	GCCTTGCCCGCAGGAGAGCAAGAGGATGTGGGGCCCGGCCA T G <sub>2</sub> CGTTGATCCCGACCACTTCCGCTCGACGACTCAAGACGGGT A G <sub>3</sub> ACAGGCCCGTTGATCCCTCGGGCTACAAGCGC	ALPQEEQEDVGRHRVDPDFRSTTQDAYRP V E <sub>2</sub> VDPSAYKR	6	38

**Figura 8.** (continuación)

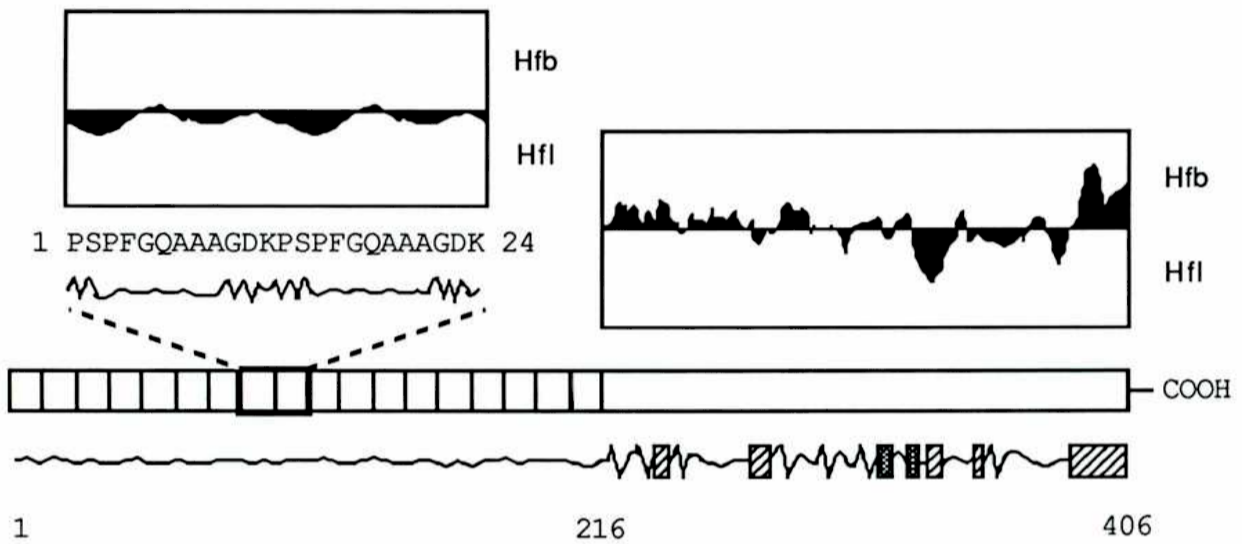
El clon 46 (que pertenece al grupo de homología del clon 30, ver fig. 3 y tabla I) está enteramente compuesto de repeticiones de 42 pb cada una. La longitud del inserto es de 2300 pb, lo que indica que por lo menos 57 unidades de 42 pb están presentes en este gen (no mostrado).

El marco de lectura fue determinado a partir del marco de la  $\beta$  galactosidasa, incluyendo en el templado para las reacciones de secuenciación las porciones flanqueantes al inserto correspondientes al genoma del vector  $\lambda$ gt11 (fig. 8). El clon 2 tiene 1218 pb de marco de lectura abierto (406 aa'). Contiene 18 unidades de 12 aa' cada una en la porción 5' del inserto, seguidas por una secuencia no repetitiva de 190 aa' hasta el codon de fin de traducción. El inserto del clon 7 comienza con una secuencia no repetitiva de 46 aa', seguida de 14 unidades de 12 aa' cada una. Tres codones de fin de traducción aparecen 43 aa' después de la región repetitiva lo que hace un total de 771 pb de marco de lectura abierto (257 aa'). En el caso del clon 15, la presencia de un único marco de lectura abierto determinó la secuencia correcta de aminoácidos de la zona repetitiva.

Las secuencias deducidas de aminoácidos fueron analizadas con el programa "Peptide Structure" del "Sequence Analysis Software Package" desarrollado por el Genetics Computer Group de la Universidad de Winsconsin (Devereux, 1984). El programa realiza predicciones sobre la estructura secundaria de una secuencia de aminoácidos. Utiliza el método original de Chou y Fasman (Chou, 1978) para predecir  $\alpha$ -hélices,  $\beta$ -láminas y pliegues ("turns"). El programa calcula además, el perfil de hidrofobicidad/hidrofilicidad de la cadena polipeptídica de acuerdo a Kyte y Doolittle (Kyte, 1982). La curva indica el promedio del índice específico de hidrofobicidad de un residuo en una ventana de 9 residuos. Cuando la curva se encuentra en la mitad superior del gráfico, indica que la región es hidrofóbica, cuando se encuentra en la mitad inferior, la región es hidrofílica. Los resultados obtenidos de la aplicación de este programa a las secuencias de los clones aislados se esquematizan en la figura 9. Las repeticiones de los clones 1, 13, 30 y 36 contienen dominios de  $\alpha$ -hélice, mientras que las de los clones 2, 7 y 10 no presentan aparentemente ninguna estructuración, a excepción de algunos pliegues de la cadena polipeptídica. Las regiones no repetitivas de los clones 2 y 7 presen-



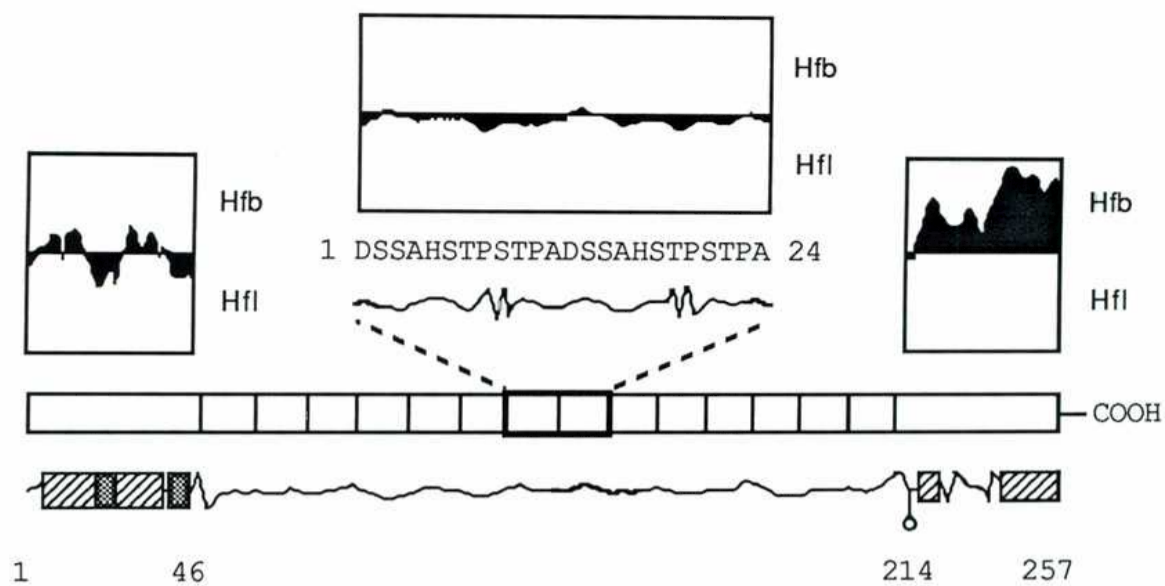
### Clon 1



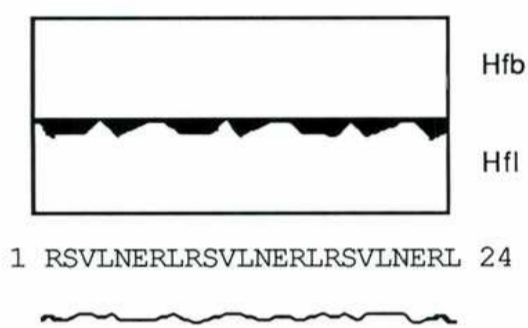
### Clon 2

**Figura 9.** Predicciones sobre la estructura secundaria de los productos clonados. Las secuencias de aminoácidos deducidas fueron analizadas con el programa "Peptide Structure" del GCG de la Universidad de Winsconsin (Devereux, 1984). Se muestran las secuencias de las repeticiones de los 8 clones. En los clones 2 y 7, se incluye un esquema de la organización del clon (ver fig. 7). Los números indican posiciones de aa'. El esquema debajo de cada secuencia representa la estructura secundaria estimada de acuerdo al método de Chou y Fasman (Chou, 1978). Se señalan las regiones de  $\alpha$ -hélices (■),  $\beta$ -láminas (▨), pliegues (W) y "coils" o zonas no estructuradas (—). Sobre cada secuencia se muestra el perfil de hidrofobicidad calculado según Kyte y Doolittle (Kyte, 1982). Hfb y Hfl indican hidrofobicidad e hidrofiliidad respectivamente. ○ = sitios potenciales de glicosilación.

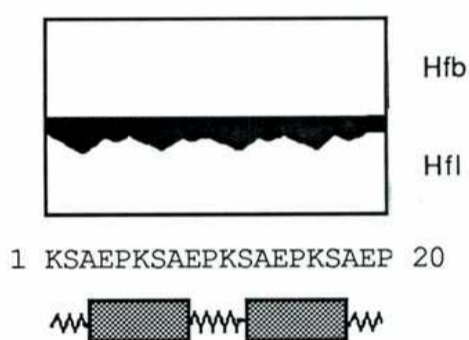




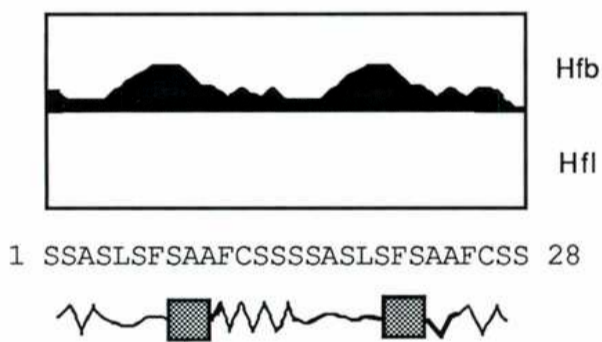
**Clon 7**



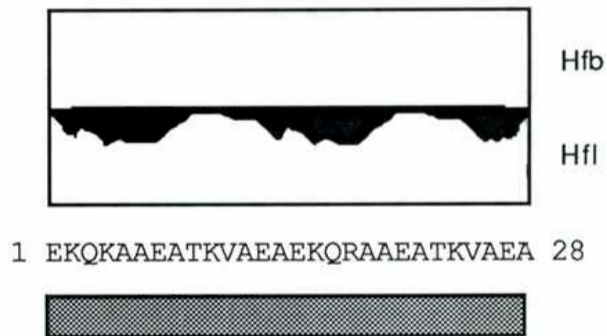
**Clon 10**



**Clon 13**

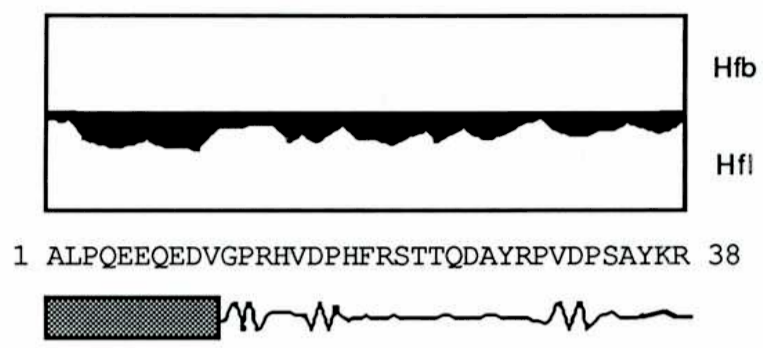


**Clon 15**



**Clon 30**

**Figura 9.** (continuación)



**Clon 36**

**Figura 9.** (continuación)



tan dominos de  $\beta$ -láminas alternados con algunas hélices y zonas sin estructura ("coils").

Las repeticiones parecen ser, en general, bastante hidrofílicas, especialmente las de los clones 1, 13, 30 y 36. En las porciones COOH-terminales de los clones 2 y 7 aparecen secuencias altamente hidrofóbicas de entre 15 y 20 aa' de longitud, lo que podría estar indicando la presencia de dominios de anclaje en membrana (fig. 9). Las repeticiones presentes en los clones 1, 30 y 36 contienen un 40-44% de aminoácidos con residuos cargados. Las unidades del clon 1 están compuestas por un 25% de residuos ácidos (Glu y Asp). Un sitio potencial de N-glicosilación (definido por la secuencia NGT) fue localizado en la posición 219 del clon 7, inmediatamente después de la región repetitiva (fig. 9).

El programa utilizado incluye también el cálculo de un perfil de antigenicidad de la molécula. El índice de antigenicidad es una medida de la probabilidad de que una región dada sea antigénica, y en su cálculo se tienen en cuenta distintos parámetros de la estructura secundaria. La mayor probabilidad se le asigna a las regiones hidrofílicas que contienen pliegues de la cadena polipeptídica. Las regiones repetitivas de los clones analizados obtuvieron, en la mayoría de los casos, altos valores de índice de antigenicidad (no mostrado). Curiosamente, en el clon 2, el índice promedio de las repeticiones resultó 10 veces mayor que el de la región 3' no repetitiva. Resultados similares se obtuvieron en el clon 7 al comparar las repeticiones con las regiones flanqueantes. Estas observaciones se correlacionan con la hidrofiliidad y alto contenido en pliegues que mostraron las repeticiones en las predicciones de la estructura secundaria.

Las secuencias de ADN y de aminoácidos de los distintos clones fueron comparadas entre sí, y con otras secuencias de genes y proteínas repetitivas descritas en *T. cruzi*, en *T. brucei* y en especies de plasmodios. Seis de las catorce repeticiones del clon 7 contienen la secuencia PVD, que también está presente en las unidades del clon 36 (fig. 8). Esta secuencia podría constituir el epítoto responsable de la reacción cruzada observada entre estos dos antígenos (fig. 3B). El clon 30 contiene la secuencia KAAE, la cual también se encuentra presente en una de las variantes de las unidades repetitivas del clon 13 (fig. 8).

En este caso, sin embargo, no se observó reacción cruzada entre estos dos antígenos con los sueros utilizados. Ninguna otra similitud pudo ser detectada entre las secuencias primarias del resto de los clones.

Recientemente, fue clonado el fragmento de un gen que codifica una proteína asociada a microtúbulos en *T. brucei* (Schneider, 1988). El análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento clonado reveló que contiene una estructura repetitiva, compuesta por unidades altamente conservadas de 114 pb de longitud. La secuencia primaria de estas repeticiones muestra un 63% de similitud al nivel de aminoácidos (considerando las posiciones idénticas y las conservadas; Gribskov, 1986) con la secuencia de las repeticiones presentes en el clon 36, que también es de 114 pb (38 aa') (fig. 10). Estos resultados sugieren que el clon 36 podría codificar un fragmento de una proteína asociada a microtúbulos en *T. cruzi*.

<b>clon 36</b>	ALPQEEQEDVGPRHVDPDHFRSTTQDAYRPVDPSPAYKR
	+•+    +    ••••    ••    ••++••+•+••••    •+
<b>p320</b>	KRTVGEDEVITDMRHVDESHFLTTHEAYKPIDPSEYRQ

**Figura 10.** Comparación de la secuencia de la repetición del clon 36 con la de la proteína asociada a microtúbulos de *T. brucei* (p320) (Schneider, 1988). Los puntos (•) señalan las posiciones idénticas, las cruces (+) indican posiciones conservadas (según Gribskov, 1986).

El resto de las secuencias obtenidas no parecen estar relacionadas a las descritas en otros antígenos de *T. cruzi* (Peterson, 1986; Dragon, 1987), ni de *T. brucei* (Roditi, 1987), ni a las de especies de plasmodios (Kemp, 1987).

## Producción y utilización de proteínas de fusión y péptidos sintéticos

El vector procariótico  $\lambda$ gt11 permite la expresión del fragmento de ADN clonado a partir del promotor bacteriano *lac* inducible por IPTG. El producto codificado por el inserto se expresa como proteína de fusión con la enzima bacteriana  $\beta$  galactosidasa, codificada en el genoma del vector. Este sistema permite la producción de hasta 50 mg de proteína de fusión por litro de cultivo y se estima que aproximadamente un 5-20% de la síntesis proteica total de la bacteria resulta en la producción de la proteína de fusión. Esta aparece en el medio luego de la lisis de las células por el mismo fago vector y puede ser purificada del resto de las proteínas bacterianas por cromatografía de afinidad con anticuerpos anti- $\beta$  galactosidasa o por electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida. El clonado y expresión en  $\lambda$ gt11 permite disponer de moléculas individuales aisladas del resto de todos los otros componentes de la célula en estudio, en cantidades que, de otro modo, serían sumamente difíciles de obtener.

La producción de péptidos sintéticos modelados de secuencias específicas permite obtener porciones relevantes de las proteínas en estudio en la cantidad y grado de pureza de un reactivo para análisis de producción comercial. Son de manipulación sencilla y fáciles de adaptar a las técnicas de detección convencionales.

En el presente estudio se obtuvieron proteínas de fusión y péptidos sintéticos de varios de los clones aislados. Las proteínas de fusión fueron purificadas por electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida de extractos de cultivos de *E. coli* infectados con los distintos virus recombinantes. Duplicados en pequeña escala de estos geles fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa, los cuales se hicieron reaccionar con anticuerpos contra los productos de los distintos clones (no mostrado). En este caso, fueron incluidos lisados de cultivos con y sin previa inducción con IPTG. La comparación de las señales obtenidas en uno y otro caso permitió la localización de las zonas del gel de las cuales fueron purificadas las proteínas de fusión (ver Materiales y Métodos, Sueros). Los péptidos sintéticos fueron diseñados en base a las secuencias consenso de las unidades repetiti-

vas de los clones 2, 10, 13 y 30. Previo a su utilización, se acoplaron a una molécula "carrier" (KLH) por el método del glutaraldehído (ver Materiales y Métodos, Sueros).

### Los productos de los clones aislados son altamente inmunogénicos

Tanto péptidos como proteínas de fusión fueron utilizados para la producción de anticuerpos en conejos. Los sueros fueron luego analizados en reacciones contra los productos de los distintos clones y contra los péptidos (figs. 11 y 12). Las proteínas de fusión de los clones 1, 2, 13, 30 y 36 mostraron ser altamente inmunogénicas (fig. 11, panel izquierdo). La señal obtenida con el producto del clon homólogo es varias veces más intensa que con los demás clones, pese a que todos ellos comparten la misma porción de  $\beta$  galactosidasa en la proteína de fusión. Ya que los insertos de los clones 1, 30 y 36 están compuestos enteramente por repeticiones (fig. 7), este resultado demuestra que las unidades repetitivas presentes en estos clones son eficientes inmunógenos.

Los sueros obtenidos con los productos de los clones 2, 10, 13 y 30 reconocieron a los respectivos péptidos específicamente (fig. 11, panel derecho). Este resultado indica que entre los anticuerpos generados por estas proteínas de fusión, se encuentran anticuerpos específicos contra determinantes antigénicos lineales presentes en las unidades repetitivas y confirma, además, la secuencia determinada para cada una de ellas. Por el contrario, el suero anti-proteína de fusión del clon 10 no detectó al producto del clon homólogo más que al resto de los otros clones pero sí reaccionó, aunque débilmente, con el péptido sintético correspondiente. Por otro lado, el suero obtenido con el producto del clon 13 reaccionó muy intensamente con el clon homólogo y llegó a detectar hasta 200 ng del péptido sintético.

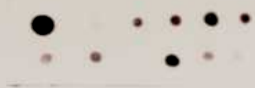
Se obtuvieron anticuerpos en conejo contra los cuatro péptidos sintetizados (fig. 12, panel izquierdo), lo que indica que también en estos clones las unidades repetitivas son, por sí mismas, inmunogénicas. Como en el caso anterior, todos probaron ser específicos, ya que reconocen al péptido homólogo pero no a los otros péptidos. Cabe mencionar que en todos los casos se observó también una fuerte respuesta contra la molécula "carrier" de KLH (no mostrado).

**Figura 11.** Reactividad de sueros anti-proteínas de fusión con los productos clonados y con péptidos sintéticos. Los sueros anti-proteínas de fusión de los clones indicados se hicieron reaccionar con filtros de nitrocelulosa que contenían los productos de los clones recombinantes distribuidos como se indica al pie de la figura, y con filtros que contenían cantidades crecientes (0.2 a 20  $\mu\text{g}$ ) de péptidos sintéticos de las unidades repetitivas de los clones 2, 10, 13 y 30.  $\lambda$  indica el producto del vector  $\lambda\text{gt}11$  no recombinante.

PROT. FUSION

PEPTIDOS

1



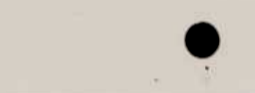
2



10



13



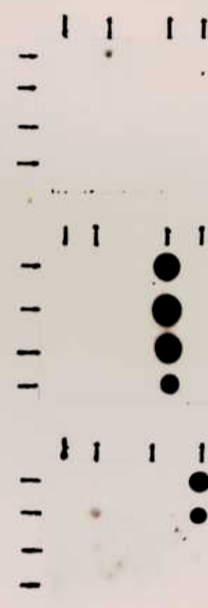
30



36



µg 2 10 1330  
20- ●  
5- ●  
1- ●  
0.2- ●

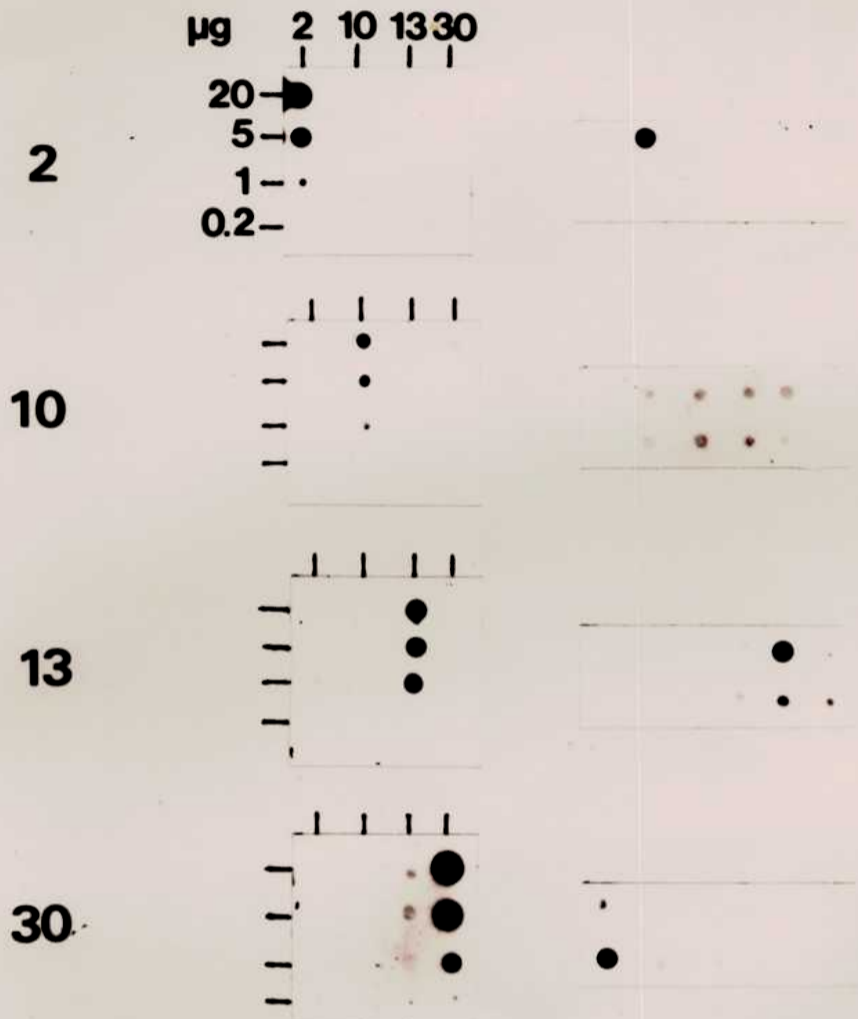


1	2	7	10	13	26
30	36	λ	λ	λ	

**Figura 12.** Reactividad de sueros anti-péptidos con los productos clonados y con péptidos sintéticos. Los sueros anti-péptidos de las unidades repetitivas de los clones 2, 10, 13 y 30 se hicieron reaccionar con filtros de nitrocelulosa que contenían las proteínas de fusión de los clones recombinantes distribuidas como se indica al pie de la figura, y con filtros que contenían cantidades crecientes (0.2 a 20  $\mu$ g) de los mismos péptidos.  $\lambda$  indica el producto del vector  $\lambda$ gt11 no recombinante.

**PEPTIDOS**

**PROT. FUSION**





Todos los sueros, a excepción del anti-péptido 10, reconocen los productos de los clones homólogos en forma específica (fig. 12, panel derecho). El suero obtenido con el péptido 10 reaccionó con el péptido homólogo pero no detectó a la proteína de fusión correspondiente. Estos resultados sugieren que el producto de este clon, a diferencia del de los otros clones, no es tan inmunogénico como para generar una respuesta por sobre el fondo que se obtiene con la porción de  $\beta$  galactosidasa (fig. 11, panel izquierdo), aunque lo suficiente como para producir anticuerpos específicos contra las unidades repetidas (fig. 11, panel derecho y fig. 12, panel izquierdo).

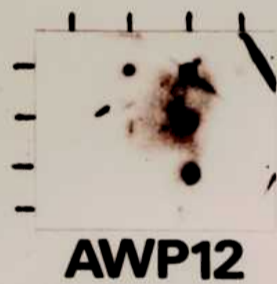
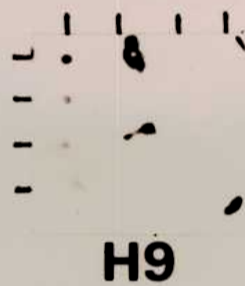
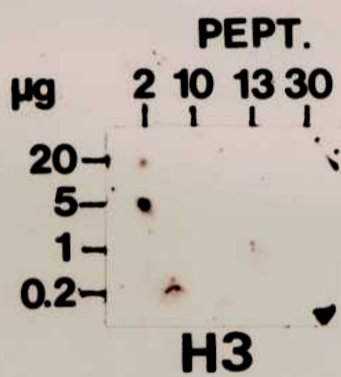
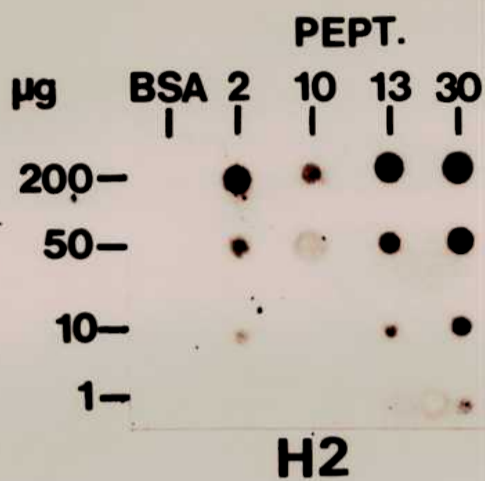
### Las unidades repetitivas son antigénicamente activas durante la infección con *T. cruzi*

Los insertos de los clones 1, 30 y 36 consisten exclusivamente de repeticiones. Ya que las proteínas de fusión producidas por estos clones son reconocidas por el suero H<sub>2</sub> (fig. 3A) y por varios otros sueros de pacientes chagásicos y de animales infectados (ver Relevancia antigénica de los productos clonados), se concluye que las unidades repetidas presentes en estos antígenos generan, por sí mismas, una respuesta inmune durante la infección.

Los péptidos sintéticos diseñados de los clones 2, 10, 13 y 30 fueron utilizados para investigar la presencia de anticuerpos contra las unidades repetitivas de estos antígenos en el suero H<sub>2</sub> utilizado para el "screening" (fig. 13, panel superior) y en otros sueros de pacientes crónicos y de conejos infectados (fig. 13, panel inferior). El suero H<sub>2</sub> reacciona intensamente con los péptidos 2, 13 y 30 y más débilmente con el péptido 10. Cantidades equivalentes de seroalbúmina bovina (BSA) no fueron detectadas (fig. 13, panel superior). Otros dos sueros de pacientes crónicos fueron analizados (H<sub>3</sub> y H<sub>9</sub>). En ambos casos, el péptido 2 es reconocido. Se investigaron también dos sueros de conejos infectados con las cepas AWP y CA1. Ambos reaccionan con los péptidos 10 y 13, pudiéndose detectar hasta 200 ng de este último con el suero AWP<sub>12</sub>. En todos los casos, cantidades equivalentes de BSA no fueron detectadas (no mostrado).

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que 6 de los clones aislados (1, 2, 10, 13, 30 y 36) poseen unidades repetidas de aminoácidos que son antigénicamente activas durante la infección con

**Figura 13.** Detección de anticuerpos contra las unidades repetitivas en sueros de infección. Filtros de nitrocelulosa que contenían cantidades crecientes de los péptidos sintéticos de los clones 2, 10, 13 y 30, se hicieron reaccionar con el suero humano H<sub>2</sub> utilizado en el "screening" inmunológico (A). Otros dos sueros de pacientes chagásicos (H<sub>3</sub> y H<sub>9</sub>) y dos sueros de conejos infectados con parásitos de las cepas AWP (AWP<sub>12</sub>) y CA1 fueron también analizados (B). BSA indica seroalbúmina bovina.



*Trypanosoma cruzi* y sugieren, además, que los sueros de pacientes chagásicos pueden ser detectados específicamente mediante el uso de péptidos sintéticos como los utilizados en este estudio.

### **Relevancia antigénica de los productos clonados: detección de anticuerpos en sueros de infección**

Para evaluar la importancia antigénica de los productos clonados, las proteínas de fusión de los 12 clones aislados se hicieron reaccionar con una serie de sueros de animales infectados experimentalmente con distintas cepas del parásito y con sueros de pacientes chagásicos crónicos y agudos de distintas procedencias. Los clones que reaccionaron muy intensamente (++) o más intensamente (+) que el fondo observado con  $\lambda$ gt11 fueron tabulados (tablas IV, V y VI). Los resultados obtenidos con los diferentes tipos de sueros se resumen en la tabla VII. En la fig. 14 se muestran ejemplos de los autorradiogramas obtenidos con sueros de animales (C), con sueros de pacientes crónicos (A) y de agudos (B).

#### **Reactividad de sueros de animales infectados con distintas cepas**

Fueron analizados 22 sueros de conejos y ratones infectados con 7 cepas diferentes de *T. cruzi* (tabla IV y fig. 14C). Todos estos sueros reconocen al producto del clon 7 y entre un 20 y 35% a los productos de los clones 13, 30 y 36 (tabla VII). El resto de los clones, salvo algunas excepciones, no fueron mayormente detectados. El suero del conejo infectado con la cepa CA1 de *T. cruzi* reaccionó con 7 de los 12 clones, incluidos los clones 1, 2 y 10. Sin embargo, el suero de un ratón infectado con la misma cepa sólo detectó a los productos de los clones 7 y 13. Estas diferencias pueden deberse a varios factores, entre ellos, a los distintos períodos post-infección transcurridos antes de la recolección de los sueros (tabla IV).

Los sueros de ratones infectados con la cepa Tul obtenidos a diferentes tiempos post-infección (p.i.) detectan uniformemente al producto del clon 7, desde los 15 días y hasta los 360 días p.i. Curiosamente, los productos de los clones 19 y 49 son reconocidos entre los 3 y 6 meses pero no antes ni después. Ninguno de los clones

sueros			reactividad con los clones											
animal	parásito (cepa)	días P.I.	1	2	7	10	13	19	22	26	30	36	49	54
conejo	Tul <sub>20</sub>	15			++		+					+	+	
conejo	Tul <sub>24</sub>	30			++									
conejo	AWP <sub>12</sub>	15			++		++						++	
conejo	AWP <sub>25</sub>	30			++								++	
conejo	Y <sub>22</sub>	30			++		+					++	++	
conejo	Y <sub>27</sub>	60			++							+		
conejo	UP	30			++		+						++	
conejo	RA	30			++		+							
conejo	CA1	60	++	++	++	+	+					+	++	
ratón <sup>p</sup>	Tul	15			+									
ratón <sup>p</sup>	Tul	27			++									
ratón <sup>p</sup>	Tul	49			++									
ratón <sup>p</sup>	Tul	97			++			+						+
ratón <sup>p</sup>	Tul	150			++			+						+
ratón <sup>p</sup>	Tul	184			++			+						
ratón	Tul	360			+									
ratón	Tcc	15			+									
ratón <sup>p</sup>	Tcc	29			++									
ratón <sup>p</sup>	Tcc	57			+									
ratón <sup>p</sup>	RA	22			+		+							
ratón	RA	90			++									
ratón <sup>p</sup>	CA1	21			+		+							
cobayo <sup>(1)</sup>	?	?		+								+		

**Tabla IV.** Reactividad de sueros de animales infectados con distintas cepas de *T. cruzi* con los productos de los clones recombinantes. Los resultados obtenidos con cada suero fueron tabulados. Sólo se indican las señales mucho más intensas (++) o más intensas (+) que las observadas con el vector  $\lambda$ gt11 no recombinante. Los sueros obtenidos a distintos tiempos post-infección (P.I.) provienen siempre de animales diferentes. **p** indica que se utilizó un "pool" de sueros de 3 o 5 animales.

(1) Animal infectado naturalmente, presentaba alta parasitemia y entró en remisión, se sangró con parasitemia no detectable.

fue detectado por sueros de 7 días p.i., ni aún utilizando un segundo anticuerpo anti-IgM de ratón hecho en conejo (no mostrado).

Fue analizado también el suero de un cobayo naturalmente infectado con *T. cruzi*. Este animal había mostrado tener una alta parasitemia, después de lo cual entró en remisión. Cuando se sangró, la parasitemia no era detectable. Sorprendentemente, este suero, a diferencia del resto, no reconoce al producto del clon 7 (tabla IV). Por el contrario, detecta únicamente a los productos de los clones 2 y 30. Se desconoce la cepa con la que estaba infectado ni, por supuesto, el tiempo de post-infección.

Por último, dos sueros controles de conejos y dos de ratones no infectados dieron resultados negativos con todos los clones (no mostrado).

#### Reactividad de sueros de pacientes crónicos: los productos de los clones 1 y 2 son mayoritariamente reconocidos

Los productos de los clones aislados se hicieron reaccionar con 26 sueros de pacientes crónicos de enfermedad de Chagas diagnosticados en Brasil, Honduras y Argentina (tabla V y fig. 14A). A diferencia de lo observado en infecciones experimentales en animales, sólo un 20% de los sueros humanos crónicos reaccionan con el producto del clon 7, mientras que un 60 a 85% detectan a los de los clones 1 y 2 (tabla VII). Estos dos antígenos permitieron la detección de 25 de los 26 sueros analizados, y muestran reactividad similar con los sueros de los distintos países. Estos resultados indican que los antígenos codificados por estos clones estarían presentes en parásitos de regiones geográficas muy diferentes, desde Honduras hasta Argentina.

Las proteínas de fusión de los clones 13, 30 y 36 también reaccionan con una gran proporción de los sueros analizados (entre el 40 y 50%), mientras que las de los clones 19, 22 y 49 sólo fueron detectadas por H<sub>2</sub>, el suero utilizado para el "screening". Algunos de los productos clonados mostraron una marcada preferencia por los sueros de Argentina como, por ejemplo, las proteínas de fusión de los clones 7, 10 y 26 (tabla V).

suero procedencia		reactividad con los clones											
		1	2	7	10	13	19	22	26	30	36	49	54
H <sub>1</sub>	Argentina	++	++	+		++				++	++		+
H <sub>2</sub>	Argentina	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	+	++
H <sub>3</sub>	Argentina	+	++							+	+		
H <sub>8</sub>	Argentina	+	++			+			++	++	+		
H <sub>9</sub>	Argentina	++	++	+	+	+			+	++			
H <sub>11</sub>	Argentina	++	++		+	+			+	++			
H <sub>27</sub>	Argentina	++	++	++	++	++				++			
H <sub>33</sub>	Argentina	++	++	+	+				+	++	+		
MC <sub>184</sub>	Brasil		+							+	+		
MC <sub>186</sub>	Brasil	+	+										
AL <sub>1</sub>	Brasil		+										
AL <sub>2</sub>	Brasil	++	+							+	++		
AL <sub>3</sub>	Brasil	+				+					+		
AL <sub>4</sub>	Brasil	+	+							+			
AL <sub>5</sub>	Brasil					+				+			
AL <sub>6</sub>	Brasil	+	+										
AL <sub>7</sub>	Brasil	+											
AL <sub>8</sub>	Brasil		+			+				+			
CR <sub>1</sub>	Brasil	+											
CR <sub>2</sub>	Brasil	+											
CR <sub>3</sub>	Brasil	++				+							
CR <sub>4</sub>	Brasil	++				+					+		
CR <sub>5</sub>	Brasil	+											
Hond <sub>1</sub>	Honduras	++											
Hond <sub>2</sub>	Honduras	++											
Hond <sub>3</sub>	Honduras	++	+		+						+		

**Tabla V.** Reactividad de sueros de pacientes crónicos de enfermedad de Chagas con los productos de los clones recombinantes. Los resultados obtenidos con cada suero fueron tabulados. Sólo se indican las señales mucho más intensas (++) o más intensas (+) que las observadas con el vector  $\lambda$ gt11 no recombinante. En todos los casos se trata de sueros individuales.

Ninguna de las proteínas de fusión reaccionó con cuatro sueros de pacientes de leishmaniasis (Kala-Azar) diagnosticados en Brasil, ni con cuatro sueros controles de humanos no infectados obtenidos en Brasil y Argentina (no mostrados).

Reactividad de sueros de pacientes agudos: el producto del clon 7 es específicamente antigénico durante el período agudo de la enfermedad

Se investigó la presencia de anticuerpos contra los productos clonados en 28 sueros de pacientes agudos de enfermedad de Chagas diagnosticados en Brasil (tabla VI y fig. 14B). Todos los pacientes mostraban síntomas agudos de la enfermedad entre 15 y 80 días antes de la recolección de la sangre. A diferencia de lo observado en sueros de pacientes crónicos, 26 de los 28 sueros de agudos analizados (93%) detectan al producto del clon 7, mientras que solamente 5 (18%) y 1 (4%) a los de los clones 1 y 2 respectivamente. Las proteínas de fusión de los clones 13 y 36 también reaccionan con los sueros de casos agudos (39 y 36% respectivamente). El resto de los clones no fueron mayormente detectados.

Estos resultados difieren notablemente con los obtenidos de pacientes crónicos, en donde la mayoría de los sueros reconocen a los productos de los clones 1 y 2 y sólo un 20% al del clon 7 (tabla VII). Además, éstos no parecen estar ocasionados por diferencias entre cepas del parásito de distintas localidades, ya que 13 de los 26 sueros de casos crónicos estudiados (AL<sub>1-8</sub> y CR<sub>1-5</sub>) provienen de la misma región geográfica que los agudos y, sin embargo, todos ellos reconocen a los productos de los clones 1 y 2 (tabla V). Por el contrario, el patrón obtenido con los sueros de casos agudos se asemeja al de los sueros de animales, los cuales reconocen mayoritariamente al producto del clon 7 a pesar de que provienen de infecciones obtenidas con 7 cepas diferentes del parásito (tabla VII).



suero	reactividad con los clones											
	1	2	7	10	13	19	22	26	30	36	49	54
A <sub>1</sub>	+		+		+							+
A <sub>2</sub>					+							+
A <sub>3</sub>			+		+							
A <sub>4</sub>			+									
A <sub>5</sub>	+											
A <sub>6</sub>			++									
A <sub>7</sub>			+									
A <sub>8</sub>			+						++			
A <sub>9</sub>			+									
A <sub>10</sub>			+									
A <sub>11</sub>			++		++							+
A <sub>12</sub>			+		+							
A <sub>13</sub>			+			+						+
A <sub>14</sub>		+	+									+
A <sub>15</sub>			+									+
A <sub>16</sub>	+		++		+							+
A <sub>17</sub>			+		+							
A <sub>18</sub>			++									
A <sub>19</sub>	+		+		+							
A <sub>20</sub>			+		+							++
A <sub>21</sub>			++									
A <sub>22</sub>	+		+									+
A <sub>23</sub>			+			+						
A <sub>24</sub>			+		+							++
A <sub>25</sub>			+									
A <sub>26</sub>			+		+							
A <sub>27</sub>			+									+
A <sub>28</sub>			++									

**Tabla VI.** Reactividad de sueros de pacientes agudos de enfermedad de Chagas con los productos de los clones recombinantes. Los resultados obtenidos con cada suero fueron tabulados. Sólo se indican las señales mucho más intensas (++) o más intensas (+) que las observadas con el vector  $\lambda$ gt11 no recombinante. En todos los casos se trata de sueros individuales.

**Figura 14.** Detección de anticuerpos contra los productos clonados en sueros de pacientes y de animales infectados. Filtros de nitrocelulosa que contenían las proteínas de fusión de los clones recombinantes distribuidas como se indica al pie de la figura, se hicieron reaccionar con tres sueros de pacientes crónicos (A), tres sueros de pacientes agudos (B) y tres sueros de conejos infectados con parásitos de las cepas AWP (AWP25), RA e Y (Y27) (C).  $\lambda$  indica el producto del vector  $\lambda$ gt11 no recombinante.

**A**



**H3**

**H11**

**CR2**

**B**



**A19**

**A21**

**A26**

**C**



**AWP 25**

**RA**

**Y27**

1	2	7	10	13	22
$\lambda$	26	30	36	54	$\lambda$

sueros		% que reacciona con los clones											
origen	n°anallz.	1	2	7	10	13	19	22	26	30	36	49	54
animales	23	4	9	96	4	35	13	0	0	22	26	9	0
pac. crónicos	26	85	62	19	23	42	4	4	19	50	42	4	12
pac. agudos	28	18	4	93	0	39	7	0	0	4	36	4	0

**Tabla VII.** Reactividad comparada de sueros de animales infectados y de pacientes crónicos y agudos. Se muestra el número total de sueros analizados y la fracción de los sueros positivos con las proteínas de fusión de cada clon recombinante. **pac.** = pacientes.

## Expresión y localización de los antígenos clonados

### Expresión de los antígenos clonados en tripomastigotes de sangre.

Los patrones de reacción de sueros de animales infectados y de pacientes crónicos y agudos indican que, durante la etapa temprana o aguda de la infección, se generan específicamente anticuerpos contra el antígeno 7 pero no contra los antígenos 1 y 2, como ocurre en infecciones crónicas (tabla VII). Por este motivo, se investigó la presencia de estos antígenos en tripomastigotes purificados de la sangre de ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* en el punto de máxima parasitemia, aproximadamente a los 7 días post-infección. Los sueros de ratones y conejos infectados con esta cepa contienen anticuerpos contra el producto del clon 7 pero no contra los de los clones 1 y 2, como se vió anteriormemnte (tabla IV). Como controles, se incluyeron extractos de tripomastigotes y epimastigotes de cultivo de la misma cepa.

Los extractos de parásitos lisados fueron llevados a una concentración final de 1.5 M de ClNa para liberar los anticuerpos del ratón que pudieran haber quedado unidos a los antígenos en estudio (Giannini, 1984). Los extractos así tratados fueron sembrados en filtros de nitrocelulosa que se hicieron reaccionar con anticuerpos de conejo contra los productos de los clones 1, 2, 7, 13, 30 y 36 y con el suero de un conejo infectado con la cepa Tul (Tul<sub>24</sub>) y el de un conejo

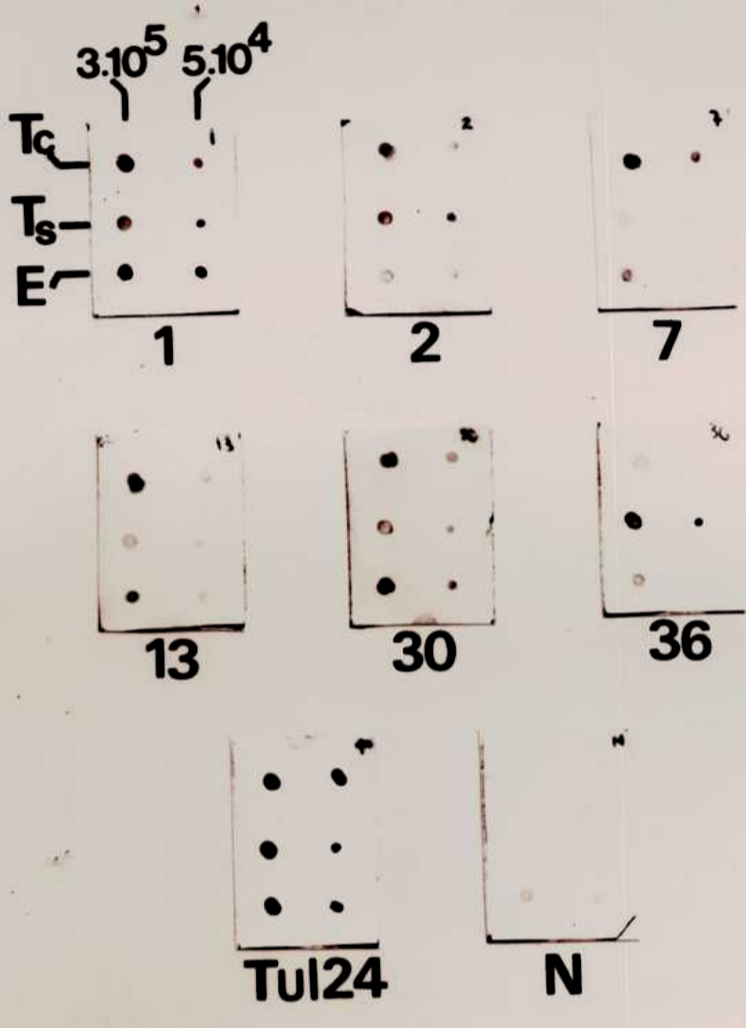
control no infectado (N). Los filtros fueron luego tratados con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en cabra acoplado a biotina y revelados por la reacción colorimétrica del sistema biotina-avidina-peroxidasa (fig. 15).

Los anticuerpos contra el antígeno 1 reaccionaron en forma similar con tripomastigotes de sangre y de cultivo y con epimastigotes. Los anticuerpos contra el antígeno 2 también reaccionaron con ambos tipos de tripomastigotes y, como se esperaba, no detectaron a los epimastigotes ya que esta proteína no se expresa en este estadio del parásito (tabla III y fig. 4). Los anticuerpos contra el antígeno 7 reaccionaron con tripomastigotes de cultivo pero, contrariamente a lo esperado, no detectaron a los de sangre. Tampoco reaccionaron con epimastigotes, en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente (tabla III y fig. 4).

Los anticuerpos contra los antígenos 13 y 30 no detectaron a los tripomastigotes de sangre pero sí reaccionaron con tripomastigotes de cultivo y epimastigotes respectivamente, como se había observado previamente. El antígeno 36 es expresado tanto en tripomastigotes como en epimastigotes (tabla III y fig. 4). Los anticuerpos contra esta proteína detectaron ambas formas de cultivo aunque muy débilmente. Por el contrario, reaccionaron muy intensamente con los tripomastigotes de sangre (fig. 15). El suero del conejo infectado con la cepa Tul reaccionó con ambos tripomastigotes y con epimastigotes, mientras que el suero control del conejo no infectado (N) no reaccionó con ninguno de ellos (fig. 15).

Estos resultados indican que los antígenos 1 y 2 son probablemente expresados por los tripomastigotes de sangre durante la fase aguda de la infección, pese a que en esta etapa no se detectan anticuerpos contra estas proteínas. Contrariamente a lo esperado, no pudo detectarse la presencia del antígeno 7 en la forma sanguínea, a pesar de ser la proteína que genera la mayor respuesta humoral durante el período agudo de la infección (tabla VII).

**Figura 15.** Expresión de los antígenos clonados en parásitos de sangre y de cultivo. Filtros de nitrocelulosa que contenían lisados totales correspondientes a  $3 \times 10^5$  y  $5 \times 10^4$  tripomastigotes de cultivo (Tc), tripomastigotes purificados de la sangre de ratones infectados (Ts) y epimastigotes de cultivo (E) de la cepa RA de *T. cruzi*, se hicieron reaccionar con anticuerpos de conejo anti-proteínas de fusión de los clones indicados. Como controles, fueron utilizados el suero de un conejo infectado con parásitos de la cepa Tul (Tul24) y el de un conejo no infectado (N).



## Detección de los antígenos clonados en la superficie de parásitos vivos

Se investigó la presencia de los antígenos clonados en la superficie de parásitos vivos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Para ello, tripomastigotes y epimastigotes vivos de la cepa RA de *T. cruzi* se hicieron reaccionar con anticuerpos del suero humano H<sub>2</sub>, seleccionados por afinidad con los productos de los distintos clones aislados. En el caso de los clones 1, 2 y 30, también fueron utilizados sueros de conejo contra las proteínas de fusión (tabla VIII). Como controles positivos se utilizaron el suero humano H<sub>2</sub> y el suero de un conejo infectado con la cepa AWP (AWP<sub>25</sub>). Sueros de humanos y conejos no infectados fueron utilizados como controles negativos (no mostrados).

clon	anticuerpos seleccionados de H2		anticuerpos de conejo	
	epimastigote	tripomastigote	epimastigote	tripomastigote
1	-	-	-	-
2	N.P.	+	N.P.	+
7	N.P.	-	N.P.	N.P.
10	+	+	N.P.	N.P.
13	N.P.	+	N.P.	N.P.
26	N.P.	-	N.P.	N.P.
30	-	-	N.P.	-
36	-	-	N.P.	N.P.
54	N.P.	-	N.P.	N.P.

**Tabla VIII.** Inmunofluorescencias de parásitos vivos de *T. cruzi*. Tripomastigotes y epimastigotes vivos de la cepa RA de *T. cruzi* se hicieron reaccionar con anticuerpos seleccionados del suero humano H<sub>2</sub> con los productos de los distintos clones recombinantes, o con sueros de conejos preparados contra diferentes proteínas de fusión. Sólo algunos anticuerpos fueron probados contra epimastigotes ya que solamente los antígenos 1, 10, 30 y 36 son expresados en este estadio. N.P. (no probado) indica que la reacción no fue realizada.



Como se vió anteriormente, los anticuerpos seleccionados con los productos de los clones 1, 10, 30 y 36 reaccionan con epimastigotes (tabla III y fig. 4). Las inmunofluorescencias realizadas con estos anticuerpos muestran que únicamente el clon 10 codifica un antígeno que puede ser detectado sobre la superficie de epimastigotes vivos. En tripomastigotes, los antígenos 2, 10 y 13 fueron los únicos detectados en la superficie de parásitos vivos.

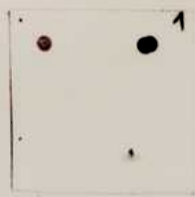
Estos resultados indican que por lo menos 3 de las 8 proteínas que poseen una estructura repetitiva están localizadas o asociadas con la superficie del parásito. El resto, en principio, podrían ser antígenos secretados o, alternativamente, hacerse reactivos sólo después de la lisis del parásito.

#### La proteína 7 es liberada en sangre por los tripomastigotes de *T. cruzi* durante la etapa aguda de la infección

Se investigó la presencia de los antígenos clonados en distintos sobrenadantes de parásitos en cultivo, con el objeto de determinar si alguno de ellos es específicamente liberado al medio por los tripanosomas. Para ello, se utilizaron sobrenadantes de cultivos de células Vero, obtenidos 5 días después de la infección con tripomastigotes (cepa RA) y sobrenadantes de tripomastigotes incubados 5 y 15 hs. en medio de cultivo libre de células. Los sobrenadantes fueron concentrados 20 veces por liofilización. 2  $\mu$ l del concentrado de cada sobrenadante fueron sembrados en filtros de nitrocelulosa los cuales se hicieron reaccionar con anticuerpos contra los productos de los clones 1, 2, 7, 13, 30 y 36 y con el suero de un conejo infectado con la cepa Tul (Tul<sub>24</sub>) y el de un conejo no infectado (N). Como controles, se incluyeron extractos de tripomastigotes y epimastigotes de cultivo de la misma cepa y el sobrenadante de cultivo de células Vero no infectadas (fig. 16).

El suero del conejo infectado detectó a los tres sobrenadantes de tripomastigotes pero no reaccionó con el de células no infectadas, lo que revela la presencia de antígenos liberados al medio por los parásitos. De los 6 anticuerpos específicos probados, únicamente los dirigidos contra el producto del clon 7 reaccionaron con el sobrenadante de células Vero infectadas. Estos anticuerpos también de

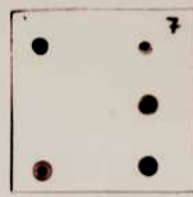
**Figura 16.** Detección de antígenos en sobrenadantes de cultivos de células infectadas con *T. cruzi*. Filtros de nitrocelulosa que contenían las muestras que se indican al pie de la figura, se hicieron reaccionar con anticuerpos de conejo anti-proteínas de fusión de los clones indicados. Como controles, se incluyeron el suero de un conejo infectado con la cepa Tul de *T. cruzi* (Tul24) y el suero de un conejo no infectado (N). Muestras: **1**,  $3 \times 10^5$  tripomastigotes de cultivo (cepa RA); **2**,  $3 \times 10^5$  epimastigotes de cultivo (cepa RA); **3**, sobrenadante de un cultivo de células Vero no infectado; **4**, sobrenadante de un cultivo de células Vero infectado con tripomastigotes (cepa RA); **5**, sobrenadante de tripomastigotes (cepa RA) incubados 5 hs. en medio libre de células; **6**, sobrenadante de tripomastigotes (cepa RA) incubados 15 hs. en medio libre de células.



1



2



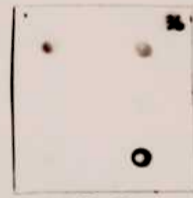
7



13



30



36



Tu124



N

1	2
3	4
5	6

tectaron a los sobrenadantes de tripomastigotes en medio libre de células. En este caso, la reactividad aumentó con el tiempo de incubación de los parásitos (fig. 16). El anticuerpo contra el producto del clon 36 reaccionó con el sobrenadante de tripomastigotes incubados durante 15 hs. en medio libre de células pero no detectó a las demás muestras. Ningún otro anticuerpo reaccionó con los sobrenadantes, lo que demuestra que éstos se encontraban libres de parásitos o de fracciones de los mismos.

Para identificar las proteínas liberadas al medio por los tripomastigotes, sobrenadantes de cultivo de células infectadas fueron fraccionados por electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidos a filtros de nitrocelulosa. Uno de estos filtros se hizo reaccionar con anticuerpos contra el producto del clon 7 (fig. 17, panel central). Como controles, se incluyeron extractos de tripomastigotes y epimastigotes de cultivo y el sobrenadante de células no infectadas. El mismo patrón de bandas (160-205 kDa) fue observado en el extracto de tripomastigotes y en el sobrenadante de células infectadas. No se detectaron bandas en epimastigotes ni en el sobrenadante de células no infectadas. Otros filtros se hicieron reaccionar con anticuerpos contra los productos de algunos de los otros clones con resultados negativos (no mostrado). Un patrón de bandas similar al del antígeno 7 fue obtenido cuando un filtro duplicado se hizo reaccionar con el suero de un paciente agudo de enfermedad de Chagas (A<sub>21</sub>) (fig. 17, panel izquierdo). A pesar de que no puede establecerse por el momento la identidad de estas bandas, es probable que estén relacionadas al antígeno 7, ya que pudo demostrarse que este suero reacciona muy intensamente con el producto del clon 7 pero no reconoce a ninguno de los otros productos clonados (fig. 14 y tabla VI).

Por último, se investigó la presencia del antígeno 7 en el plasma de ratones infectados con tripomastigotes de la cepa RA, obtenido en el punto de máxima parasitemia (10-15 x 10<sup>6</sup> parásitos/ml). Aproximadamente 50 µl de plasma concentrado (5X) fueron fraccionados en geles de poliacrilamida y transferidos a filtros de nitrocelulosa, los cuales se hicieron reaccionar con anticuerpos contra el producto del clon 7. Como controles, se incluyeron extractos de tripomastigotes y epimastigotes (cepa RA) y cantidades equivalentes del plasma de ratones no infectados (fig. 17, panel derecho).

**Figura 17.** Detección del antígeno 7 en sobrenadantes de tripomastigotes y en el plasma de ratones infectados. Sobrenadantes de cultivos de células Vero infectadas (Si) y no infectadas (Sn), plasma de ratones infectados (Pi) y no infectados (Pn) y extractos totales de epimastigotes (E) y tripomastigotes (T) de la cepa RA de *T. cruzi*, fueron fraccionados en geles de poliacrilamida al 10% y transferidos a filtros de nitrocelulosa. Estos se hicieron reaccionar con anticuerpos de conejo anti-proteína de fusión del clon 7 y con el suero de un paciente agudo de enfermedad de Chagas (A<sub>21</sub>). Los filtros con sobrenadantes fueron revelados con <sup>125</sup>I-proteína A. El que contenía plasma de ratones fue revelado con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a biotina, seguido de la reacción avidina-biotina-peroxidasa (ver Materiales y Métodos).



Nuevamente, un patrón de bandas similar fue observado en tripomastigotes y en el plasma de ratones infectados. Ninguna banda pudo ser detectada en epimastigotes ni en el plasma de ratones no infectados.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que la proteína 7 es uno de los principales antígenos liberados al medio por los tripomastigotes de *T. cruzi*, tanto en cultivo de células como en plasma de infecciones agudas.

**DISCUSSION**



## Clonado y caracterización de genes que codifican antígenos de *Trypanosoma cruzi*

Doce grupos de clones recombinantes diferentes fueron aislados utilizando el suero de un paciente chagásico para el "screening" inmunológico de un banco genómico de *Trypanosoma cruzi* en el vector de expresión  $\lambda$ gt11. Dicho banco fue construido a partir de fragmentos producidos por ruptura mecánica del ADN nuclear del parásito. Mediante este procedimiento, se clonan fragmentos de ADN que comprenden a todo el genoma, en todos los marcos de lectura posibles. A diferencia de los bancos de ADN complementario, todas las porciones del genoma se encuentran igualmente representadas. Esto posibilita que puedan ser clonados fragmentos de todos los genes del parásito, aún de aquéllos que se expresan en muy bajos niveles. Por el mismo motivo, un banco genómico permite aislar genes expresados en todos y cada uno de los estadios del ciclo de vida del parásito, lo que resulta de gran utilidad para el estudio de un organismo como *T. cruzi*.

Los productos de los clones recombinantes aislados resultaron ser representativos del total de moléculas del parásito antigénicamente activas durante la infección. Esto pudo demostrarse mediante sucesivos "screenings" inmunológicos con 6 sueros de infección diferentes, entre los que se encontraban dos sueros de pacientes diagnosticados en Honduras. La mayoría de las señales detectadas por estos sueros eran también reconocidas por H<sub>2</sub>, el suero con el que fueron aislados los clones estudiados en el presente trabajo (tabla II).

Seis de los doce grupos identificados contienen dos, tres y hasta seis clones homólogos (tabla I). Las diferencias en el número de clones aislados en cada grupo podría estar indicando la presencia de genes repetidos, como ya se ha observado en algunos otros genes de *T. cruzi* (González, 1985; Dragon, 1987; Manning, 1988; Beard, 1988). Sin embargo, el patrón de restricción del ADN nuclear obtenido con la mayoría de los clones es compatible con la presencia de genes de copia única (fig. 6A). No obstante, con el clon 7 se pudieron detectar varias bandas de alto peso molecular, lo que sugiere la presencia de más de una copia de este gen en el genoma del parásito (fig. 6B). Estos resultados pudieron ser confirmados por otros estudios realizados en el laboratorio. El análisis de un gran número de cepas de *T. cruzi* con

diferentes enzimas reveló que, en la mayoría de los casos, los genes 1, 2, 10, 13, 26, 30, 36 y 54 se presentan en dos copias (alélicas?) en el genoma del parásito (no mostrado). Estos estudios mostraron también que los diferentes fragmentos del gen 7 generados con las enzimas PstI, HpaI y HaeIII provienen efectivamente de distintas copias de este gen, las cuales presentan diferentes deleciones (no mostrado). Este último resultado explicaría la obtención de grupos escalonados de fragmentos en los patrones de restricción con estas tres enzimas. Por último, también pudieron ser confirmados los resultados obtenidos con el clon 13 (fig. 6B). La porción 3' de este clon contiene una secuencia repetitiva distribuida por todo el genoma del parásito (no mostrado).

El análisis de las proteínas nativas y ARN mensajeros homólogos a 9 de los clones aislados reveló que 5 de ellos son expresados únicamente en tripomastigotes, mientras que otros 3 lo son también en epimastigotes (figs. 4 y 5 y tabla III). La proteína homóloga al producto del clon 30 sólo pudo ser detectada en epimastigotes, aunque ambas formas expresan productos de transcripción de este gen.

En la mayoría de los casos, los epitopes antigénicamente activos fueron localizados en proteínas de pesos moleculares diferentes. Sin embargo, los anticuerpos contra los productos de cuatro clones no relacionados (clones 2, 13, 36 y 54) detectaron proteínas nativas de tamaños similares (85-90 kDa), tres de las cuales (clones 2, 13 y 54) resultaron ser específicas de tripomastigotes (fig. 4). Otros autores han reportado en *T. cruzi* la presencia de proteínas de alrededor de 85 kDa relacionadas con la penetración celular (Zingales, 1985), con la unión a fibronectina (Ouaisi, 1986a) y con homología con genes de proteínas de "heat-shock" (Dragon, 1987). Por otro lado, también han sido clonados dos genes que codifican proteínas de 90 kDa (Beard, 1988) y 85 kDa (Peterson, 1986). Esta última contiene una región repetitiva que comprende 5 unidades de 9 aminoácidos cada una. Ninguno de los clones aislados en el presente trabajo pareciera estar relacionado con este gen, ya que oligonucleótidos diseñados de acuerdo con la secuencia publicada no pudieron detectar a ninguno de ellos, en condiciones que permitieron la detección de bandas en digestiones de ADN nuclear del parásito (no mostrado). La

comparación con las secuencias obtenidas tampoco reveló similitud alguna.

Cinco proteínas y cuatro ARN mensajeros con homología con el clon 7 pudieron ser detectados (figs. 4 y 5 y tabla III). Como se vió anteriormente, este gen aparece en varias copias en el genoma de *T. cruzi*, lo que plantea la posibilidad de que las distintas proteínas y mensajeros detectados provengan de copias diferentes del gen. Por otro lado, no pudieron detectarse los ARN mensajeros homólogos a los clones 36 y 54 (fig. 5). Ambos clones contienen aparentemente secuencias presentes en varias especies de ARN diferentes. No se encontró homología al comparar las secuencias obtenidas de estos clones con la del mini-exón descrito en *T. cruzi* ni en otros tripanosomátidos (De Lange, 1984).

### **Antígenos con epitopes repetitivos en *T. cruzi***

El análisis de las secuencias de los fragmentos clonados reveló que 8 de los 9 clones analizados contienen una estructura interna repetitiva. Queda aún la posibilidad de que el clon 54 también contenga repeticiones fuera de las porciones secuenciadas (fig. 7). Se desconoce la razón por la cual el procedimiento utilizado en el "screening" seleccionó antígenos con estructura repetitiva. Pueden considerarse, al respecto, varias posibilidades. Los antígenos localizados podrían ser componentes mayoritarios de la superficie del tripanosoma, los cuales, debido a su localización y abundancia, generan una fuerte respuesta de anticuerpos en el huésped. Este podría ser el caso de las proteínas detectadas en la superficie del parásito (antígenos 2, 10 y 13), o de la proteína liberada en sangre durante la etapa aguda de la infección (antígeno 7).

Por otro lado, las proteínas que contienen estructuras repetitivas son por lo general muy antigénicas. En este sentido, puede hacerse un paralelo con la situación en malaria (también causada por parásitos intracelulares, pertenecientes al género *Plasmodium*), en donde ya han sido estudiados un gran número de antígenos con repeticiones. En varios de estos antígenos se ha podido demostrar que la mayoría de la respuesta inmune generada en el huésped por la infección de malaria está dirigida contra epitopes de las regiones repetitivas (Kemp,

1987). En el presente trabajo, pudo demostrarse, mediante el uso de péptidos sintéticos y proteínas de fusión, que en al menos 6 de los 8 antígenos con repeticiones, las unidades repetitivas son inmunógenos naturales en la infección con *T. cruzi* (figs. 3 y 12). Se desconoce, sin embargo, qué proporción de la respuesta de anticuerpos está dirigida contra las regiones no repetitivas de los productos clonados. El hecho de haber aislado casi exclusivamente clones con repeticiones utilizando un suero de infección sugiere que, como en el caso de *Plasmodium*, estas regiones son epitopes dominantes, hacia los cuales se dirige la mayoría de la respuesta inmune del huésped.

Las estructuras repetitivas podrían tener un papel importante en la evolución de proteínas, especialmente en el caso de polipéptidos que deben adaptarse a situaciones de rápida evolución, como la relación entre huésped y parásito. Ya que las repeticiones parecieran ser altamente inmunogénicas, es probable que estos antígenos se encuentren compitiendo contra respuestas inmunes del huésped que producen protección. En una situación tal, mecanismos como la duplicación génica y la dispersión de mutaciones en regiones repetitivas aumentarían esta competencia y permitirían la formación, por los productos resultantes, de lo que se ha dado en llamar "smokescreen" o cortina de humo. En este modelo, originalmente formulado para malaria (Kemp, 1987), se propone que este tipo de antígenos ayudarían a camuflar al parásito del sistema inmune del huésped, provocando una hiperestimulación de células B con especificidades irrelevantes, disminuyendo así la efectividad de la respuesta contra epitopes críticos. La competencia que resulta de presentar al sistema inmune una gran cantidad de antígenos con repeticiones altamente inmunogénicas parecería ser la clave de esta estrategia de evasión.

Otro mecanismo adicional de evasión, también propuesto inicialmente en *Plasmodium* (Kemp, 1987), se relaciona con la existencia de reacciones cruzadas entre distintos epitopes del mismo o de diferentes antígenos, y estaría mediado por el efecto de estos epitopes en la proliferación de células B y en la maduración de la afinidad de los anticuerpos. La generación de anticuerpos de alta afinidad depende, probablemente, de la selección de células B con ciertas mutaciones somáticas acumuladas en sus inmunoglobulinas de superficie que provocan un aumento en la afinidad del anticuerpo por

el epítopo que desencadenó la respuesta (Manser, 1985). El mismo epítopo es el que normalmente selecciona a los mutantes generados. Sin embargo, una célula B mutada que falla al reaccionar con el epítopo original con la suficiente afinidad, podría reaccionar en forma cruzada con algún otro epítopo con mayor afinidad y, en consecuencia, comenzar a proliferar. En estas circunstancias, una proporción anormal de las células B que acumulan mutaciones somáticas en sus inmunoglobulinas de superficie serían preservadas durante la expansión clonal, lo cual podría determinar que el desarrollo de una respuesta de anticuerpos de alta afinidad, que podría ser importante para la inmunidad contra la infección, se vea retrasado enormemente, ya que la proliferación de células B se vería limitada por el número de células disponibles. En el presente trabajo, dos de los productos clonados (clones 7 y 36) mostraron reacción cruzada cuando se seleccionaron anticuerpos de dos sueros de conejos infectados con la cepa AWP de *T. cruzi* (fig. 3B). Esta respuesta pudo haber sido generada por la presencia de epítopos comunes a ambos antígenos como, por ejemplo, el definido por la secuencia PVD, mencionado anteriormente (ver Resultados, Estructura Primaria). Cabe destacar al respecto, que también pudo obtenerse en el laboratorio un suero de conejo contra la proteína de fusión del clon 7 que presenta reacción cruzada con el producto del clon 36 (no mostrado). Probablemente, nuevas reactividades cruzadas entre los antígenos descritos serán reveladas en futuros estudios, especialmente, a partir de la utilización de anticuerpos monoclonales contra los productos clonados.

Por lo dicho anteriormente, en algunas de estas proteínas, las repeticiones podrían no tener otra función más que en la evasión de la respuesta inmune. Sin embargo, varios de estos antígenos podrían tener otras funciones. Recientemente, fue clonado el fragmento de un gen que codifica una proteína asociada a microtúbulos en *T. brucei* (Schneider, 1988). Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) median la unión de microtúbulos entre sí y con la membrana celular. La proteína de *T. brucei* (p320) fue co-localizada junto con tubulina en micrografías electrónicas del parásito, utilizando anticuerpos específicos acoplados a partículas de oro. El fragmento clonado está enteramente compuesto de repeticiones de 114 pb (38 aa') de longitud. La secuencia de estas repeticiones muestra un 63% de similitud al nivel de aa' (considerando las posiciones conservadas) con la secuen-

cia de las repeticiones del clon 36. La mayoría de la homología entre ambas secuencias se concentra en 2/3 de la repetición, en esta zona la similitud es del 77% (fig. 10). Además, en ambas proteínas las repeticiones tienen la misma longitud. En p320 éstas comprenderían la mayor parte de la proteína, de acuerdo al patrón de bandas obtenido luego de proteólisis parcial. La gran diferencia en peso molecular aparente entre ambas proteínas (85 y 320 kDa) podría deberse a diferencias en el número de repeticiones. En concordancia con lo observado en las inmunofluorescencias con el producto del clon 36 (tabla VIII), p320 tampoco pudo ser localizada en la superficie del parásito. Estos resultados sugieren que el clon 36 podría codificar un fragmento de una proteína asociada a microtúbulos en *T. cruzi*. En este caso, la actividad antigénica de esta proteína podría revelarse luego de la ruptura del parásito.

La presencia de una estructura repetitiva en proteínas del citoesqueleto podría parecer sorprendente. Sin embargo, también han sido descritas repeticiones en espectrina, aunque éstas se encuentran mucho menos conservadas (Speicher, 1984). La única MAP cuya secuencia completa ha sido publicada es la proteína tau en el cerebro del ratón (Lee, 1988). Esta proteína no tiene similitud con la p320 de *T. brucei* ni con el clon 36. Sin embargo, la secuencia de tau también contiene repeticiones, aunque en este caso son de 18 aa' de longitud. Por otro lado, experimentos de proteólisis y de secuenciación directa de otras dos MAPs de mamíferos revelan también estructuras repetitivas en estas proteínas (Huber, 1985; Maier, 1987). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de motivos repetitivos podría ser una característica común en las MAPs.

El resto de los antígenos clonados en el presente trabajo podrían tener otras funciones, particularmente en la interacción del parásito con la célula huésped, como también ha sido descrito en *Plasmodium* (Godson, 1983; Kochan, 1986). Siendo *Trypanosoma cruzi* un parásito intracelular capaz de invadir un amplio rango de células del huésped, la presencia de varias proteínas antigénicas con estructura repetitiva podría estar relacionada con el hecho de que el tripanosoma puede interactuar con muchos tipos de células diferentes.

## Antígenos liberados en sangre por tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

El análisis de sobrenadantes de cultivo de células Vero infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* reveló la presencia del producto del clon 7 en el medio de cultivo. Los productos de los otros clones no pudieron ser detectados (fig. 16). Anticuerpos específicos permitieron localizar al antígeno 7 (165-205 kDa) en sobrenadantes de células infectadas y en el plasma de ratones infectados (fig. 17). Resultados similares se obtuvieron al utilizar el suero de un paciente agudo de enfermedad de Chagas, lo que sugiere que la proteína 7 es uno de los principales antígenos liberados durante la etapa aguda de la infección. Por este motivo, se rebautizó a esta proteína como "Shed Acute Phase Antigen" o SAPA.

La secuencia de aminoácidos deducida de este clon reveló la presencia de un dominio altamente hidrofóbico en la porción COOH-terminal de la proteína, lo que sugiere que su liberación podría estar mediada por un proceso de clivaje en la membrana del parásito. En este sentido, se aproxima a lo que ocurre en plasmodios con la proteína del circumsporozoito. Un dominio hidrofóbico en la porción COOH-terminal permite la inserción de esta proteína en la membrana. Como consecuencia de la interacción con anticuerpos, la proteína es liberada, formándose así un precipitado, fenómeno que se conoce como "reacción del circumsporozoito" (Nussenzweig, 1986). En el caso de SAPA, esto podría explicar por qué este antígeno no pudo ser detectado en las inmunofluorescencias de parásitos vivos (tabla VIII), ni en los lisados de tripomastigotes purificados de la sangre de ratones infectados (fig. 15).

Si bien aún no han sido individualizados antígenos solubles de *T. cruzi*, se sabe que están presentes en sangre de humanos y animales infectados y en sobrenadantes de células infectadas (Araujo, 1982; Galvão-Castro, 1984). Además, se ha sugerido que tanto inmunocomplejos como antígenos circulantes podrían mediar lesiones de tejidos, y de esta forma, participar en la patogénesis de la enfermedad de Chagas (Galvão-Castro, 1984). Por otro lado, antígenos solubles del parásito podrían unirse a la membrana de células no infectadas, mediando así, la destrucción de células del huésped por células T y/o

anticuerpos (Araujo, 1982). Recientemente ha sido reportada la identificación de una proteína liberada por los tripomastigotes de *T. cruzi* que afectaría la estabilidad del complejo C<sub>3b</sub>-B<sub>b</sub> (Rimoldi, 1988). Los autores sugieren que esta actividad podría ser la responsable de la resistencia de los tripomastigotes a la lisis por complemento (ver Introducción, Antígenos involucrados en la evasión de la respuesta inmune). Si bien varias especies fueron detectadas en los sobrenadantes de parásitos (86-155 kDa), no pudo identificarse a la responsable de la actividad mencionada. SAPA también es liberado por tripomastigotes, y anticuerpos anti-SAPA detectan varios componentes en el rango de 165 a 205 kDa.

Otros parásitos también producen antígenos solubles. En *Plasmodium*, los antígenos S son proteínas solubles, termoestables, detectables en el plasma de humanos y animales infectados. Sin embargo, y a diferencia de SAPA, estos antígenos presentan una enorme heterogeneidad serológica (Saint, 1987). Los merozoitos de plasmodios también liberan una proteína que aparentemente mediaría la invasión de eritrocitos (Kochan, 1986). Otros antígenos con repeticiones internas podrían interferir en la producción de anticuerpos efectivos contra epitopes críticos, como se vió anteriormente (Kemp, 1987). Dada la estructura repetitiva de SAPA, su liberación en sangre podría, de alguna manera, ayudar al "camuflage" del parásito, evitando así la generación de una respuesta inmune contra epitopes críticos durante el período agudo de la infección. Varias pueden ser las funciones de SAPA, algunas de las cuales podrían ser esenciales para la supervivencia del parásito.

### **Antígenos de *Trypanosoma cruzi* en infecciones crónicas y agudas**

Las proteínas codificadas por varios de los clones aislados reaccionan con una amplia colección de sueros de animales infectados y de pacientes chagásicos. Anticuerpos contra el producto del clon 7 pudieron ser detectados en todos los sueros de animales analizados, a pesar de que provenían de infecciones obtenidas con 7 cepas diferentes del parásito (tabla IV). Por otro lado, las proteínas de



fusión de los clones 1 y 2 reaccionaron con una gran proporción de sueros de pacientes chagásicos obtenidos en diferentes regiones geográficas como Honduras, Brasil y Argentina (tabla VII). Estos resultados demuestran que algunos de los productos clonados representan antígenos que se encuentran conservados en diferentes aislamientos del parásito. Otras proteínas de fusión mostraron, sin embargo, reactividad variable con los diferentes sueros (clones 10, 13, 26, 30 y 36), lo que probablemente esté reflejando diferencias en la composición antigénica de distintas cepas de *T. cruzi* (Araujo, 1981; Kirchoff, 1984a; González, 1985; Wrightsman, 1986).

Los resultados obtenidos del análisis de sueros de pacientes crónicos fueron confirmados por otros estudios realizados en el laboratorio. En este caso, fue analizado un número mayor de sueros, provenientes de pacientes diagnosticados en Chile, Brasil y Argentina. Los productos de los clones 1, 2, 13 y 30 fueron juntos capaces de detectar anticuerpos en 70 de los 84 sueros analizados (83%). Los restantes 14 sueros carecían de anticuerpos contra los productos clonados. Cabe mencionar que dos de estos sueros fueron utilizados en "screening" inmunológico del banco en  $\lambda$ gt11 con resultados negativos (no mostrado). Dada la gran diversidad existente en *T. cruzi* (Brenner, 1985), es posible que los tripanosomas que infectaron a las personas de las cuales se obtuvieron los 14 sueros negativos sean muy diferentes del resto. Por otro lado, tampoco puede descartarse la posibilidad de que muchos de ellos sean en realidad falsos positivos, o que provengan de pacientes con enfermedades relacionadas, como leishmaniasis, sobre todo si se considera las metodologías utilizadas corrientemente para el diagnóstico (ver Introducción, Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas).

A diferencia de lo observado en sueros de pacientes crónicos, solamente 4 a 18% de los sueros de casos agudos analizados detectaron a los productos de los clones 1 y 2. Sin embargo, el 93% (26/28) reaccionó con el producto del clon 7, el cual sólo fue detectado por el 19% de los sueros de pacientes crónicos (tabla VII). Resultados similares se obtienen al comparar los sueros de casos agudos con los de casos crónicos provenientes de la misma región geográfica, lo que indica que las diferencias observadas no se deben a la utilización de sueros de distintas procedencias. Estas diferencias podrían estar

ocasionadas por la expresión diferencial de antígenos durante el transcurso de la infección. Si bien los antígenos 1 y 2 pudieron ser detectados en tripomastigotes de sangre obtenidos en etapas tempranas (7 días p.i.) (fig. 15), no puede descartarse por el momento que, con el desarrollo de la infección, ocurran variaciones en el patrón antigénico de ciertas subpoblaciones de parásitos circulantes. Por otro lado, estos resultados fueron obtenidos con lisados totales de parásitos. La ausencia de anticuerpos contra los productos de los clones 1 y 2 durante la etapa temprana de la infección podría deberse a que estos antígenos no se encuentran expuestos apropiadamente, ya sea porque no aparecen en la superficie de la célula (como podría ser el caso de la proteína 1), o porque los epitopes analizados no son accesibles al sistema inmune, debido a la asociación con otros componentes o a diferencias en el medio ambiente de membrana que los rodea. Situaciones de este tipo ya han sido descritas anteriormente en la superficie de *T. cruzi* (Kirchoff, 1984b). En el transcurso de la infección, la lisis del parásito y el procesamiento y/o re-exposición de éstos y otros antígenos podrían finalmente hacerlos reactivos al sistema inmune.

Las diferencias en la reactividad de sueros crónicos y agudos podrían también estar relacionadas al ciclo de vida del parásito. Después del pico inicial de parasitemia, la proliferación de los tripanosomas está, en la mayoría de los casos, controlada por el huésped. La respuesta inmune generada no es capaz de eliminar completamente a los parásitos, aunque su número puede reducirse a niveles casi indetectables. En estas condiciones, aquellos antígenos que son liberados a la sangre podrían generar preferencialmente una respuesta de anticuerpos durante la etapa temprana de la infección. Este podría ser el caso del antígeno 7 o SAPA. Por cierto, esta proteína pareciera ser uno de los principales antígenos liberados por el parásito durante el período agudo de la enfermedad (fig. 17). En infecciones crónicas a largo plazo, otros antígenos pueden exponerse al sistema inmune, lo que podría explicar por qué los anticuerpos en los sueros de pacientes crónicos están dirigidos contra otras proteínas (tabla VII). Cabe mencionar al respecto, que ya han sido descritas anteriormente diferencias en la cinética de aparición de anticuerpos circulantes en ratones infectados (Krettli, 1984). La aparente ausencia de anticuerpos contra SAPA en la mayoría de los sueros crónicos

analizados podría estar indicando que el antígeno deja de ser liberado o expresado en etapas tardías de la infección. En coincidencia con esta observación, la ausencia de anticuerpos anti SAPA en el suero de un cobayo naturalmente infectado (tabla IV), se correlaciona con la desaparición de la parasitemia.

Por otro lado, ya que todos los sueros de casos agudos analizados fueron obtenidos de pacientes sintomáticos, tampoco puede descartarse por el momento la existencia de distintas subespecies de *T. cruzi*, algunas de las cuales producen manifestaciones agudas de la enfermedad y expresan SAPA, mientras que otras no generan síntomas y no expresan SAPA. Sin embargo, los anticuerpos contra este antígeno pudieron ser detectados en conejos infectados con 7 cepas diferentes del parásito (tabla IV).

La verificación de varias de las hipótesis discutidas presenta, sin embargo, algunas dificultades. Las infecciones tempranas no son por lo general detectables en ausencia de síntomas. Por otro lado, los niveles de parasitemia que se alcanzan en la etapa crónica son tan bajos, que no permiten obtener parásitos suficientes para analizar. Además, no se disponen al momento de buenos modelos de infecciones crónicas en animales experimentales.

### **Utilización de antígenos clonados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas**

Los métodos serológicos de diagnóstico utilizados corrientemente hacen uso de parásitos enteros o de fracciones del parásito (Krettli, 1982a). El uso de poblaciones heterogéneas de antígenos ocasiona la aparición de falsos positivos con sueros controles y con sueros de casos de leishmaniasis visceral (Kirchoff, 1987). En el caso de utilizar proteínas individuales con fines de diagnóstico, éstas no deberían reaccionar inespecíficamente con sueros controles ni con sueros de personas afectadas por otras enfermedades.

Los productos clonados en el presente trabajo fueron reconocidos por una amplia colección de sueros de pacientes crónicos y agudos de diferentes regiones geográficas de América del Sur y Central.

Anticuerpos contra los antígenos aislados fueron detectados en pacientes diagnosticados en Honduras, en el norte y centro de Brasil, en el norte y centro de Argentina y en Chile. Sin embargo, no pudieron detectarse anticuerpos en cuatro sueros de pacientes de leishmaniasis visceral (Kala-Azar), ni en cuatro sueros de humanos no infectados. Estos resultados fueron también confirmados en el laboratorio mediante el análisis de otros 21 sueros de casos de leishmaniasis, 9 sueros de casos de toxoplasmosis y 35 sueros de humanos no infectados. Ninguno de estos sueros reconoció a los productos clonados (no mostrado). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los antígenos clonados permitirían mejorar los métodos serológicos actualmente disponibles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que son reconocidos por una amplia variedad de sueros de infección pero no reaccionan con sueros controles ni de casos de leishmaniasis o toxoplasmosis, los cuales pueden dar lugar a reacciones cruzadas en las pruebas serológicas convencionales (Kirchoff, 1987).

En el presente estudio, fue identificado uno de los principales antígenos liberados en sangre por los tripomastigotes de *T. cruzi* durante la etapa aguda de la infección. Como se vió anteriormente, los anticuerpos contra SAPA pudieron ser detectados en casi la totalidad de los sueros de pacientes agudos analizados, y sólo en una baja proporción de los sueros de casos crónicos. También fueron detectados en varios sueros de conejos infectados con *T. cruzi*, a pesar de que provenían de infecciones obtenidas con 7 cepas diferentes del parásito. Estos resultados sugieren que SAPA podría ser de utilidad en el diagnóstico diferencial de los casos agudos de la enfermedad. Al respecto, es importante mencionar que los anticuerpos contra SAPA pudieron ser detectados desde 15 días después de la aparición de síntomas en humanos infectados, y desde los 15 días post-infección en conejos y ratones (tabla IV). Además de la detección de anticuerpos contra SAPA, otra posibilidad de diagnóstico sugerida por estos resultados es el uso de anticuerpos anti-SAPA en la localización del correspondiente antígeno circulante.

Las drogas quimioterapéuticas disponibles al momento han mostrado ser efectivas principalmente durante el período agudo de la infección (Rassi, 1987). Además, los síntomas agudos, dado el caso,

no son normalmente característicos ni específicos de la enfermedad, por lo que su aparición no conduce, necesariamente, a la identificación del caso. En este sentido, el diagnóstico diferencial de casos agudos podría brindar información de suma utilidad ante la eventual necesidad de prescribir algún tratamiento de los actualmene disponibles.

Los resultados del presente trabajo sugieren también que la utilización de péptidos sintéticos en el diagnóstico de la enfermedad podría incrementar considerablemente la capacidad de detección de las infecciones de *T. cruzi*. El uso de péptidos sintéticos permitiría aumentar notablemente la especificidad de la reacción. Hasta 200  $\mu\text{g}$  de péptido pudieron ser utilizados sin pérdida de especificidad (fig. 13), lo que sugiere que también sería posible mejorar la sensibilidad de la detección. Cabe mencionar sin embargo que, si bien todos los péptidos sintetizados fueron reconocidos por sueros de infección, algunos no reaccionaron contra sueros que sí poseen anticuerpos contra la correspondiente proteína de fusión (fig. 13, panel inferior). Esto sugiere que, probablemente, en algunos casos sean necesarios otros péptidos y seguramente otras técnicas que permitan una mejor detección. En este sentido, la utilización de péptidos sintéticos en el ensayo de ELISA ha dado ya buenos resultados en otros sistemas (Campbell, 1987).

Por último, varios de los productos clonados en este trabajo, especialmente los de los clones 1, 2, 7 (SAPA) y 30, podrían también ser utilizados en experimentos de protección *in vivo* y en ensayos *in vitro*, como el de inhibición de la penetración de células en cultivo (Zingales, 1986).

## Conclusiones

En el presente estudio se analizaron los determinantes antigénicos de *T. cruzi*, mediante la localización de genes del parásito cuyos productos puedan ser detectados por sueros de pacientes chagásicos. La utilización de productos clonados permitió estudiar y caracterizar diferentes antígenos del parásito en forma individual y, además, obtener información sobre la respuesta inmune generada por cada uno de ellos en el huésped vertebrado. La aplicación de esta metodología ha mostrado ser de gran utilidad, especialmente en organismos con un complejo ciclo de vida como *Trypanosoma cruzi*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían resumirse en los siguientes puntos:

- 1) Doce grupos de clones diferentes, no relacionados entre sí, fueron aislados mediante "screening" inmunológico de un banco genómico de *Trypanosoma cruzi* construido en el vector  $\lambda$ gt11, utilizando el suero de un paciente de enfermedad de Chagas.
- 2) Las proteínas nativas y los ARN mensajeros homólogos a los clones aislados fueron identificados, lo que permitió establecer que varios de los productos clonados son únicamente expresados en el estadio tripomastigote del parásito.
- 3) La mayoría de los clones aislados contienen aparentemente fragmentos de genes de copia única, mientras que otros pertenecen a genes que parecerían estar presentes en al menos 4 o 5 copias.
- 4) Ocho de los clones aislados contienen una estructura repetitiva. Las repeticiones son diferentes en los distintos clones y varían en tamaño desde 5 a 68 aa'.
- 5) Las repeticiones de al menos 6 de estos clones son antigénicamente activas durante la infección.
- 6) Al menos tres de los antígenos clonados estarían localizados en la superficie del parásito.

7) Uno de los productos clonados (SAPA) resultó ser uno de los principales antígenos liberados en sangre por los tripomastigotes de *T. cruzi* durante la etapa aguda de la infección.

8) Anticuerpos contra SAPA pudieron ser detectados en conejos infectados con 7 cepas diferentes del parásito.

9) Las proteínas codificadas por varios de los clones aislados reaccionan con una amplia colección de sueros de pacientes chagásicos, desde Honduras hasta Argentina.

10) SAPA (antígeno 7) y los antígenos 1 y 2 son reconocidos diferencialmente por sueros de pacientes agudos y crónicos.

11) Los antígenos clonados permitirían mejorar considerablemente los métodos serológicos actualmente disponibles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.



INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES  
FUERZAS ARMADAS VENEZOLANAS  
DR. CARLOS FRASCH

## **APÉNDICE**



## Secuencias de genes que codifican antígenos de *T. cruzi*

A continuación, se listan las secuencias obtenidas del análisis de los insertos de los clones aislados. Sólo se incluyen las regiones codificantes, comenzando por la secuencia GAATTC correspondiente al sitio de clonado EcoRI del vector  $\lambda$ gt11. En el clon 15, sólo se muestra la porción central que contiene las repeticiones (ver fig. 7).

### Clon 1

1	GAATTCAGCATGAATGCCCGCGCACAGGAGCTGGCGCGGAGAAGAAGCTTGCCGACCGCGCGTTCCCTTGACCAG	75
	E F S M N A R A Q E L A R E K K L A D R A F L D Q	
76	AAGCCGAGGGCGTGCCGCTGCGAGAGCTGCCGCTCGACGACGACAGCGACTTTGTTGCGATGGAGCAGGAGCGC	150
	K P E G V P L R E L P L D D D S D F V A M E Q E R	
151	AGACAGCAGCTCGAGAAGGACCCGCGCAGGAACGCGAGGGAGATTGCTGCGCTTGAGGAGAGCATGAATGCCCGC	225
	R Q Q L E K D P R R N A R E I A A L E E S M N A R	
226	GCACAGGAGCTGGCGCGGAGAAGAAGCTTGCCGACCGCGGTTCCCTTGACCAGAAGCCGGAGGGCGTGCCGCTG	300
	A Q E L A R E K K L A D R A F L D Q K P E G V P L	
301	CGAGAGCTGCCGCTCGACGACGACAGCGACTTTGTTGCGATGGAGCAGGAGCGCAGACAGCAGCTCGAGAAGGAC	375
	R E L P L D D D S D F V A M E Q E R R Q Q L E K D	
376	CCGCGCAGGAACCGGAAGGAGATTGCTGCGCTTGAGGAGAGGATGAATGCCCGCGCACAGGAGCTGGCGCGCGAG	450
	P R R N A K E I A A L E E S M N A R A Q E L A R E	
451	AAGAAGCTTGCCGACCGCGGTTCCCTTGACCAGAAGCCGGAGGGCGTGCCGCTGCGAGAGCTGCCGCTCGACGAC	525
	K K L A D R A F L D Q K P E G V P L R E L P L D D	
526	GACAGCGACTTTGTTGCGATGGAGCAGGAGCGCAGACAGCAGCTCGAGAAGGACCCGCGCAGGAACCGGAAGGAG	600
	D S D F V A M E Q E R R Q Q L E K D P R R N A K E	
601	ATTGCTGCGCTTGAGGAGAGCATGAATGCCCGCGCACAGGAGCTGGCGCGGAGAAGAAGCTTGCCGACCGCGCG	675
	I A A L E E S M N A R A Q E L A R E K K L A D R A	
676	TTCCTTGACCAGAAGCCGGAGGGCGTGCCGCTGCGAGAGCTGCCGCTCGACGACGACAGCGACTTTGTTGCGATG	750
	F L D Q K P E G V P L R E L P L D D D S D F V A M	
751	GAGCAGGAGCGCAGACAGCAGCTCGAGAAGGACCCGCGCAGGAACCGGAAGGAGATTGCTGCGCTTGAGGAGAGC	825
	E Q E R R Q Q L E K D P R R N A K E I A A L E E S	
826	ATGAATGCCCGCGCACAGGAGCTGGCGCGGAGAAGAAGCTTGCCGACCGCGGTTCCCTTGACCAGAAGCCGGAG	900
	M N A R A Q E L A R E K K L A D R A F L D Q K P E	
901	GGCGTGCCGCTGCGAGAGCTGCCGCTCGACGACGACAGCGACTTTGTTGCGATGGAGCAGGAGCGCAGACAGCAG	975
	G V P L R E L P L D D D S D F V A M E Q E R R Q Q	
976	CTCGAGAAGGACCCGCGCAGGAACCGGAAGGAGATTGCTGCGCTTGAGGAGAGCATGAATGCCCGCGCACAGGAG	1050
	L E K D P R R N A K E I A A L E E S M N A R A Q E	
1051	CTGGCACGCGAGAAGAAGCTTGCCGACCGCGGTTCCCTTGACCAGAAGCCGGAGGGCGTGCCGCTGCGAGAGCTG	1125
	L A R E K K L A D R A F L D Q K P E G V P L R E L	
1126	CCGCTCGACGACGACAGCGACTTTGTTGCGATGGAGCAGGAGCGCAGACAGCAGCTCGAGAAGCACCCGCGCAGG	1200
	P L D D D S D F V A M E Q E R R Q Q L E K D P R R	

1201 AACGCGAAGGAGATTGCTGCGCTTGAGGAGAGCATGAATGCCCGCGCACAGGAGCTGGCGCGGAGAAGAAGCTT 1275  
 N A K E I A A L E E S M N A R A Q E L A R E K K L

1276 GCCGACCGCGCTTCCCTTGACCAGAAGCCGGAGGGCGTGCCGCTGCGAGAGCTGCCGCTCGACGAATTC 1344  
 A D R A F L D Q K P E G V P L R E L P L D E F

## Clon 2

1 GAATTCGGAGGTGACAAACCATCACCGTTTGGACAGGCCGCCGAGGTGACAAGCCATCACCATTTGGACAGGCC 76  
 E F G G D K P S P F G Q A A A G D K P S P F G Q A

76 GCCGAGGTGACAAACCATCGCTATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAACCACCACCATTTGGACAGGCCGCA 150  
 A A G D K P S L F G Q A A A G D K P P P F G Q A A

151 GCAGGTGACAAACCATCGCTATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAACCATCACCATTTGGACAGGCCGCTGCA 225  
 A G D K P S L F G Q A A A G D K P S P F G Q A A A

226 GGTGACAAACCATCACCATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAACCATCGCTATTTGGACAGGCCGCTGCAGGT 300  
 G D K P S P F G Q A A A G D K P S L F G Q A A A G

301 GACAAACCATCACCATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAGCCATCACCATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGAC 375  
 D K P S P F G Q A A A G D K P S P F G Q A A A G D

376 AAACCATCACCATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAACCACCACCATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAA 450  
 K P S P F G Q A A A G D K P P P F G Q A A A G D K

451 CCATCGCTATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAACCACCACCATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAACCA 525  
 P S L F G Q A A A G D K P P P F G Q A A A G D K P

526 TCACCATTTGGACAGGCCGAGCAGGTGACAAACCATCACCATTTGGACAGGCCGCTGCAGGTGACAAACCACCA 600  
 S P F G Q A A A G D K P S P F G Q A A A G D K P P

601 CCATTTGGACAGGCTGCTGCAGGTGACAGACCATCACCATTTGGACAGGGAACAGTGTGTTGATGCGTCTCGAAGC 675  
 P F G Q A A A G D R P S P F G Q G T V F D A S R S

676 ACTGTGTTTGGCAATGCGCCTGGTGTGTTGCCAGGTGTCGTTTGGAAAGCCATCGACGACGTTTGAACCATCC 750  
 T V F A N A P G V A Q V S F G K P S T T F A T T S

751 TTTGCTGCTGGTGGTGGGTTTGGAGCACCAAGTGTCTTTGGTTCTATTTTACAGAATGTTTCATGCTACATTGCCT 825  
 F A A G G G F G A P A F G S I L Q N V H A T L P S

826 GCCGGAAGCGCTTGTCTCATATTGGAAGTGCCTTTGGTTCTCCTGGAATGCATTCTGGCGGTGCGTTTGGTGGGA 900  
 A G S A L S H I G S A F G S P G M H S G G A F G G

901 GCAGGTGTAAGTGGTCCGGCAATTGGTGGTGGTAAACTACCTGCATTGGAGGGAAGTGGGTTGGTCAGGCTTTTT 975  
 A G V S G P A I G G G K L P A L E G S G F G Q A F

976 AGTGCTTTTGGCAATCATGCATCAACTGTTTTAGGAAATTTGGTCAGAAAGAAGGTGAGGGCACCTTTGGTACT 1050  
 S A F G N H A S T V L G N F G Q K E G E G T F G T

1051 GTGGGAGCCCATGGGACGGTTCCGCCACCCCGTTTTCAAAGACCAGTACCACATTTCAATCTTCTCTTTTTTCC 1125  
 V G A H G T G S A T P F S K T S T T F Q S S S F S

1126 AGTATTGCGGAAACTACAAGGCTCTCCGCAATTTAAGAGTGTTTTTGGTCTCATTGATATGCGGTTTTTTTTT 1200  
 S I A G N Y K A L R N L R V F L V L I D M R F F F

1201 AATCTGAATTTTTGCTTGTGAATGATAATCAATTAATTGAAGTTGTTTTGGGGATGTTTGTGCAACTTTGCTTG 1275  
 N L N F C L \*

1276 CTGAAAGCCATTTGTTTTTGGTTGTTGTTGTTGTTTTTGGCTCAAGGAATAACATTTGGGCATGTCGGATG 1350

1351 AATTGGGTGAACTGGAATTAAGGGAAGTTGAAGAGGGGGATGTACCGAGTCTTTTAGATCTTCTCAGGCACCTGA 1425

1426 CTGATGCACCGGCTGTGACTGCATCTGCGCTGCAGGCAATTGCTGAGGCACGTCGTCAAGCTGGCATGGTAACAA 1500  
 1501 AGGTTTTTATTACAGACCAACAAGGCGTGTCTAGGGACTGCATCTCTTTTTGTTGAACCCAAATTTTCGCGCG 1575  
 1576 GTGGAAAATCTGTGGGACACATTGAAGCATGTCGTTGTTGATCCCTCATATCGAGGCAAAAAGCTTGGGCAGGCC 1650  
 1651 CATTGATGACCTTGCAATATTGCCGT 1676

## Clon 7

1 GAATTCGGGCCAACCATAGCCACGTGACGGTGAATAATGTTCTTCTTTACAACCGTCAGCTGAATGCCGAGGAG 75  
 E F G P T I S H V T V N N V L L Y N R Q L N A E E  
 76 ATCAAGACCTTGTCTTGAGCCAGGACCTGATTGGCACGGAAGCACACATGGACAGCAGCAGCGACAGCAGTGCC 150  
 I K T L F L S Q D L I G T E A H M D S S S D S S A  
 151 CACGGTACGCCCTCAACTCCCCTGACAGCACTGCCACGGTACGCCCTCGACTCCCCTGACAGCAGTGCCAC 225  
 H G T P S T P V D S T A H G T P S T P A D S S A H  
 226 AGTACGCCCTCGACTCCCCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCCCTCGACTCCCCTGACAGCAGTGCCACAGT 300  
 S T P S T P A D S S A H S T P S T P V D S S A H S  
 301 ACGCCCTCGACTCCCCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCCCTCGACTCCCCTGACAGCAGTGCCACAGTACG 375  
 T P S T P A D S S A H S T P S T P A D S S A H S T  
 376 CCCTCAACTCCCCTGACAGCACTGCCACGGTACGCCCTCGACTCCCCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCC 450  
 P S T P V D S T A H G T P S T P A D S S A H S T P  
 451 TCAACTCCCCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCCCTCGACTCCCCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCCCTCA 525  
 S T P V D S S A H S T P S T P A D S S A H S T P S  
 526 ACTCCCCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCCCTCGACTCCCCTGACAGCAGTGCCACGGTACGCCCTCGACT 600  
 T P V D S S A H S T P S T P A D S S A H G T P S T  
 601 CCCCTGACAGCAGTGCCACAGTACGCCCTCAACTCCCCTGACAGCAGTGCCAAATGGTACGGTTTTGATTTG 675  
 P V D S S A H S T P S T P A D S S A N G T V L I L  
 676 CCCGATGGCGCTGCACTTTCCACCTTTTCGGGCGGAGGGCTTCTTCTGTGTGCGTGTGCTTTGCTGCTGCAGTG 750  
 P D G A A L S T F S G G G L L L C A C A L L L H V  
 751 TTTTTACGGCAGTTTTTTCTGATGTAGTGAGAGAGTCTCCTAACAAATGTAGATAAANTCATAATTGTGGTGT 825  
 F F T A V F F \*  
 826 GCAANCGTTGGGTAAATGTGTGTGTGCCTTCATACA 863

## Clon 10

1 GAATTCGGCAACGAGAGGCTGAGAAGCGTGCTCAACGAGAGGCTGAGGAGCGTGCCCAACGAGAGGCTGAGAAGC 75  
 E F G N E R L R S V L N E R L R S V P N E R L R S  
 76 GTGCTCAACGAGAGGCTGAGGAGCGTGCTCAACGAGAGGCTGAGAAGCGTGCTCAACGAGAGGCTGAGGAGCGTG 150  
 V L N E R L R S V L N E R L R S V L N E R L R S V  
 151 CTCAACGAGAGGCTGAGGAGCGTGCCCAACGAGAGGCTGAGAAGCGTGCTCAACGAGAGGCTGAGGAGCGTGCC 225  
 L N E R L R S V P N E R L R S V L N E R L R S V P  
 226 AACGAGAGGCTGAGGAGCGTGCTCAACGAGAGGCTGAGGAGCGTGCCCAACGAGAGGCTGAGGAGCGTGCTCAAC 300  
 N E R L R S V L N E R L R S V P N E R L R S V L N

301 GAGAGGCTGAGGAGCGTGCTCAACGAGAGGCTGAGGAGCGTGCTCAACGAGAGGCTGAGAAGCGTGCTCAACGAG 375  
 E R L R S V L N E R L R S V L N E R L R S V L N E

376 AGGCTGAGGAGCGTGCCCAACGAGAGGCTGAGAAGCGTGCTCAACGAGAGGCTGAGAAGCGTGCTCAACGAGAGG 450  
 R L R S V P N E R L R S V L N E R L R S V L N E R

451 CTGAGGAGCGTGCCC 465  
 L R S V P

## Clon 13

1 GAATTCGCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCA 75  
 E F A K S A E P K S A E P K S A E P K S A E P K S

76 GCTGAGCCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCCGAAATCAGCTGAGCCGAAGTCAGGGGAGCCGAAATCA 150  
 A E P K S A E P K S A E P K S A E P K S G E P K S

151 GCGGAGCCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCCGAAGGCAGCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCCGAAATCA 225  
 A E P K S A E P K S A E P K A A E P K S A E P K S

226 GCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCCGAAATCAGCGGAGCCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCCGAAGGCA 300  
 A E P K S A E P K S A E P K S A E P K S A E P K A

301 GCGGAGCCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCCGAAGGCAGCGGAGCCGAAGGCAGCGGAGCCGAAGTCA 375  
 A E P K S A E P K S A E P K A A E P K A A E P K S

376 GGGGAGCCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCAGCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCCGAAGTCAGGGGAGCCGAAGTCA 450  
 G E P K S A E P K S A E P K S A E P K S G E P K S

451 GCGGAGCCGAAGTCAGCTGAGCC 473  
 A E P K S A E ?

## Clon 15

1 AATTCCTTCTCAATTGTTTTCAACAGCATTATACTTTTGGCAGATAAAGCTACAAGTGCCTCTTCCAACTCACGAG 75  
 F L L N C F N S I I L L A D K A T S A S S N S R D

76 ATTTAGACTCCAGCCCACCAACAACCAACTCCCTCGACCTACACTCCGATTCAATTCTTTCCCTTTCCAAAACAT 150  
 L D S S P P T T N S L D L H S D S I L S L S K T F

151 TCCGCTCCAACTCCTCCTCCAAACGCTTTTTATCATCTAACAGCCTCTCATTCTCCGCGGCCTTCTGCTCAAGCT 225  
 R S N S S S K R F L S S N S L S F S A A F C S S S

226 CATCCGCCAGCCTCTCATTCTCCGCGGCCTTCTGCTCAAGCTCCTCCGCCAGCCTCTCATTCTCCGCGGCCTTCT 300  
 S A S L S F S A A F C S S S S A S L S F S A A F C

301 GCTCGAGCTC 310  
 S S ?

## Clon 30

### Extremo 5'

1 GAATTCGGGGAGAAGCAGAAGGCAGCTGAAGCCATGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAAGGCAGCTGAAGCC 75  
E F G E K Q K A A E A M K V A E A E K Q K A A E A

76 ACGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGGAGAGGGCAGCTGAAGCCACGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAGGGCA 150  
T K V A E A E K Q R A A E A T K V A E A E K Q R A

151 GCTGAAGCCACGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAGGGCAGCTGAGGCCACGAAGGTTGCTGAAGCGGAGAAG 225  
A E A T K V A E A E K Q R A A E A T K V A E A E K

226 CAGAAGGCAGCTGAAGCCATGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAAGGGCAGC 279  
Q K A A E A M K V A E A E K Q K G S

### Extremo 3'

1 AGAGGGCAGCTGAAGCCACGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAAGGCAGCTGAGGCCACGAAGGTTGCCGAAG 75  
R A A E A T K V A E A E K Q K A A E A T K V A E A

76 CGGAGAAGCAGAAGGCAGCTGAAGCCATGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAGGGCAGCTGAAGCCACGAAGG 150  
E K Q K A A E A M K V A E A E K Q R A A E A T K V

151 TTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAAGGCAGCTGAAGCCACGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAAGGCAGCTGAAG 225  
A E A E K Q K A A E A T K V A E A E K Q K A A E A

226 CCACGAAGGTTGCCGAAGCGGAGAAGCAGAGGGCAGCTGAAGCCACCGAATTC 278  
T K V A E A E K Q R A A E A T E F

## Clon 36

1 GAATTCGGCGCCTTGCCGCAGGAAGAGCAAGAGGATGTGGGGCCGCGCCACGTTGATCCCGACCACTTCCGATCG 75  
E F G A L P Q E E Q E D V G P R H V D P D H F R S

75 ACGACTCAAGACGCGTACAGGCCCGTTGATCCCTCGGCGTACAAGCGCGCCTTGCCGCAGGAAGAGGAAGAGGAT 150  
T T Q D A Y R P V D P S A Y K R A L P Q E E E E D

151 GTGGGGCCGCGCCACGTTGATCCCGACCACTTCCGCTCGACGACTCAGGACGCGTACAGGCCCGTTGATCCCTCG 225  
V G P R H V D P D H F R S T T Q D A Y R P V D P S

226 GCGTACAAGCGCGCCTTGCCGCAGGAAGAGCAAGAGGATGTGGGGCCGCGCCACGTTGATCCCGACCACTTCCGC 300  
A Y K R A L P Q E E Q E D V G P R H V D P D H F R

301 TCGACGACTCAGGACGCGTACAGGCCCGTTGATCCCTCGGCGTACAAGCGCGCCTTGCCGCAGGAAGAGCAAGAG 375  
S T T Q D A Y R P V D P S A Y K R A L P Q E E Q E

376 GATGTGGGGCCGCGCCACGTTGATCCCGACCACTTCCGCTCGACGACTCAGCACGCGTACAGGCCCGTTGATCCC 450  
D V G P R H V D P D H F R S T T Q D A Y R P V D P

451 TCGGCGTACAAGCGCGCCTTGCCGCAGGTAGAGGAAGAGGATGTGGGGCCGCGCCACGTTGATCCCGACCACTTC 525  
S A Y K R A L P Q V E E E D V G P R H V D P D H F

526 CGCTCGACGACTCAAGACGCGTACAGGCCCGTTGATCCCTCGGCGTACAAGCGCGCCTTGCCGCAGGAAGAGCAA 600  
R S T T Q D A Y R P V D P S A Y K R A L P Q E E Q

601 GAGGATGTGGGGCCGCGCCACGTTGATCCCGACCACTTCCGCTCGACGACTCAAGACGCGTACAGGCCCGTTGAT 675  
E D V G P R H V D P D H F R S T T Q D A Y R P V D

676 CCCTCCGAATTC 687  
P S E F

## **REFERENCIAS**

- Alcina, A., Fresno, M. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 181-190
- Alves, M.J.M., Colli, W. (1974) *J. Protozool.* 21: 575-578
- Andrews, N.W., Katzin, A.M., Colli, W. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140: 599-604
- Araujo, F.G. (1982) *Annals Trop. Med. Parasitol.* 76: 25-36
- Araujo, F.J., Remington, J.S. (1981) *J. Immunol.* 127: 855-859
- Auffray, C., Rougeon, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107: 303-314
- Basombrío, M.A., Besuschio, S. (1982) *Infect. Immun.* 36: 351-356
- Beard, C.A., Wrightsman, R., Manning, J.E. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 199-212
- Beard, C.A., Wrightsman, R., Manning, J.E. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 28: 227-234
- Bonaldo, M.C., Souto-Padron, T., de Souza, W., Goldenberg, S. (1988) *J. Cell Biol.* 106: 1349-1358
- Borst, P., Fase-Fowler, F., Frasch, A.C.C., Hoeijmakers J.H.J., Weijers, P.J. (1980) *Mol. Biochem. Parasitol.* 1: 221-246
- Brack, C. (1968) *Acta Tropica* 25: 289-356
- Brener, Z. (1973) *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 347-383
- Brener, Z. (1984) *Mem. Inst.Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 79 (Suppl.): 149-155
- Brener, Z. (1985) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18 (Suppl.): 1-8
- Brener, Z. (1986) *Parasitology Today* 2: 196-197
- Budzco, D.B., Pizzimenti, M.C., Kierszenbaum, F. (1975) *Infect. Immun.* 11: 86-91
- Burnette, W.N. (1981) *Anal. Biochem.* 112: 195-203

- Campbell, G.H., et al. (1987) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 17-21
- Castellani, O., Ribeiro, L.V., Fernández, J.F. (1967) *J. Protozool.* 14: 447
- Chagas, C. (1909) *An. Acad. Med. Rio de Janeiro*, 72: 188
- Chou, P.Y., Fasman, G.D. (1978) *Adv. Enzymol.* 47: 45-148
- Colli, W. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 79(Suppl.): 45-50  
Zingales, B., Katzin, A.M., Arruda, M.V., Colli, W. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 21-34
- Contreras, V.T., Morel, C.M., Goldenberg, S. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 83-96
- De Lange, T., Berkvens, T.M., Veerman, H.J.G., Frasch, A.C.C., Barry, J.D., Borst, P. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 4431
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12: 387-395
- Dragon E.A., Sias, S.R., Kato, E.A., Gabe, J.D. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 1271-1275
- Dragon, E.A., Brothers, V.M., Wrightsman, R.A., Manning, J. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 213-229
- Engel, J.C., Dvorak, J.A., Segura, E.L., Crane, M. (1982) *J. Protozool.* 29: 555-559
- Engman, D.M., Reddy, L.V., Donelson, J.E., Kirchoff, L.V. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 22: 115-123
- Fischer, E., Ouaiissi, M.A., Velge, P., Cornette, J., Kazatchkine, M.D. (1988) *Immunology* 65: 299-303
- Galvão-Castro, B., Sá-Ferreira, J.A., Pirmez, C. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 79 (Suppl.): 69-76
- Giannini, S.H., D'Alesandro, P.A. (1984) *Infect. Immun.* 43: 617-621
- Godson, G.N., Ellis, J., Svec, P., Schlesinger, D.H., Nussenweig, V. (1983) *Nature* 305: 29-33



- González Cappa, S.M., Chiale, P., Del Prado, G.E., Katzin, A.M., Martin, G.W., Isola, E.D., Abramo Orrego, L., Segura, E.L. (1980) *Medicina* (Buenos Aires) 40 (Supl. 1): 63-68
- González Cappa, S.M., Katzin, A.M., Añasco, N., Lajmanovich, S. (1981) *Medicina* (Buenos Aires) 41: 549-555
- González, A., Lerner, T.J., Huecas, M., Pineda, B.S., Nogueira, N., Lizardi, P.M. (1985) *Nucl. Acid Res.* 13: 5789-5804
- González, N.S., Sánchez, D.O., Frasch, A.C.C., Algranati, I.D. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* 63: 157-164
- Gribskov, Burguess (1986) *Nucl. Acid Res.* 14: 6745-6763
- Hoare, C.A.J. (1964) *J. Protozool.* 11: 200-207
- Huber, G., Alaimo-Beuret, D., Matus, A. (1985) *J. Cell Biol.* 100: 496
- Hudson, L. (1985) *Parasitology Today* 1: 6
- Joiner, K., Hieny, S., Kirchoff, L.V., Sher, A. (1985) *J. Exp. Med.* 161: 1196-1212
- Joiner, K., Sher, A., Gaither, T., Hammer, C. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6593-6597
- Katzin, A.M., Colli, W. (1983) *Biochimica et Biophysica Acta* 727: 403-411
- Kemp, D., J., Coppel, R., L., Anders, R., F. (1987) *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 181-208
- Kierszenbaum, F. (1985) *Parasitology Today* 1: 4
- Kipnis, T.L., Krettli, A.U., Días da Silva, W. (1985) *Scand. J. Immunol.* 22: 217-216
- Kirchoff, L.V., Engel, J.C., Dvorak, J.A., Sher, A. (1984a) *Mol. Biochem. Parasitol.* 11: 81-89
- Kirchoff, L.V., Gam, A.A., Gusmao, R.D'A., Goldsmith, R.S., Rezende, J.M., Rassi, A. (1987) *J. Infect. Dis.* 155: 561-564

- Kirchoff, L.V., Hieny, S., Shiver, M., Snary, D., Sher, A. (1984b) *J. Immunol.* 133: 32731-2735
- Kochan, J., Perkins, M., Ravetch, J.U. (1986) *Cell* 44: 689-696
- Krettli, A.U. (1982a) *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.* 3: 327-345
- Krettli, A.U. (1984) *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 79 (Suppl.): 59-65
- Krettli, A.U., Brener, Z. (1982b) *J. Immunol.* 128: 2009-2012
- Krettli, A.U., Thomas, N. Eisen, H. (1980) *INSERM* 97: 553-558
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105-132
- Laemli, U.K. (1970) *Nature* 227: 680-682
- Lanar, D., Manning, J. (1983) *J. Cell. Biochem. Suppl.* 7A, 12th Annual UCLA Symposia, abstr. 0057
- Lee, G., Cowan, M., Kirschner, M. (1988) *Science* 239: 285
- Leedale, G.F.T. (1974) *Taxon* 23: 261-270
- Lemesre, S.L., Afchain, D., Orozco, O., Loyers, M., Breiere, F.S., Desjeux, P., Carlin, Y. Martin, U., Nogueira-Queiroz, J.A., Le Ray, D., Capron, A. (1986) *Am. J. Trop. Med Hyg.* 35: 86-93
- Lima-Martins, M.V.C., Sánchez, G.A., Krettli, A.U., Brener, Z. (1985) *Parasite Immunol.* 7: 367-376
- Luquetti, A.O., Miles, M.A., Rassi, A., de Rezende, J.M., de Souza, A.A., Pova, M.M., Rodrigues, I. (1986) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 462-470
- Maier, G., et al. (1987) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368: 440
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbour Laboratory.
- Manning, J.E., Peterson, D.S. (1988) *Molecular Genetics of Parasitic Protozoa.* Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbour Laboratory.

- Manser, T., Wysoki, L.J., Gridley, T., Near, R.I., Geffer, M.L. (1985) *Immunol. Today* 6: 94-101
- Martins, M.S., Hudson, L., Krettli, A.U., Cancado, J.R., Brener, Z. (1985) *Cli. Exp. Immunol.* 61: 343-350
- Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560-564
- Mc Hardy, N., Elphick, J.P. (1978) *Int. J. Parasitol.* 8: 25-32
- Nogueira, N., Bianco, C., Cohn, Z. (1975) *J. Exp. Med.* 142: 224-229  
Kipnis, T.L., David, J.R., Alper, C.A., Sher, A., Dias da Silva, W. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 602-605
- Nogueira, N., Chaplan, S., Tydings, J.D., Unkeless, J., Cohn, Z. (1981) *J. Exp. Med.* 153: 629-639
- Nogueira, N., Unkeless, J., Cohn, Z. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1259-1263
- Nussenweig, V., Nussenweig, R.S. (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 678-688
- Orozco, O., Afchain, D., Dissous, C., Rodriguez, C., Ovlaque, G., Lemesre, J.L., Loyens, M., Capron, A. (1984) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 560-568
- Ouaissi, M.A. (1988) *Parasitology Today* 4: 169-173
- Ouaissi, M.A., Afchain, D., Capron, A., Grimaud, J.A. (1984) *Nature* 308: 380-382
- Ouaissi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., Gras-Masse, H., Tartar, A., (1986b) *Science* 234: 603-607
- Ouaissi, M.A., Cornette, J., Capron, A. (1985) *Eur. J. Immunol.* 15: 1096-1101
- Ouaissi, M.A., Cornette, J., Capron, A. (1986a) *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 201-211
- Pereira, M.E.A. (1983) *Science* 219: 1444-1446

- Pereira, M.E.A., Loures, M.A., Villalta, F., Andrade, A.F.B., (1980) *J. Exp. Med.* 152: 1375-1392
- Peterson, D.S., Wrightsman, R., Manning, J.E. (1986) *Nature* 322: 566-568
- Pinto Días, J.P. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 79 (Suppl.): 85-91
- Pizzi, T. (1956) *Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Monografías de la Universidad de Chile* (ed).
- Prata, A. (1985) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18 (Suppl.): 9-16
- Rassi, a. (1987) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20: 20-23
- Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977) *J. Mol. Biol.* 113: 237-251
- Rimoldi, M.T., Sher, A., Hieny, S., Lituchy, A., Joiner, K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 193-197
- Roditi, I., Carrington, M., Turner, M. (1987) *Nature* 325: 272-274
- Ruiz, A.M., Esteva, M., Riarte, A., Subías, E., Segura, E.L. (1986) *Immunol. Lett.* 12: 1-4
- Saint, R.B., Beall, J.A., Grumont, R.J., Mitchell, G.F., García, E.G. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 333-341
- Saint, R.B., Coppel, R.L., Cowman, A.F., Brown, G.V., Shi, P.T., Barzaga, N., Kemp, D.J., Anders, R.F. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 2968-2973
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Sánchez, G.A., Krettli, A.U., Brener, Z. (1982) *Proceedings IX Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease Caxambú, Brasil* 173: 7
- Schmunis, G.A., et al. (1980) *Exp. Parasitol.* 50: 90-102

- Schneider, A., Hemphill, A., Wyler, T., Seebeck, T. (1988) *Science* 241: 459-462
- Scott, M.T., Snary, D. (1979) *Nature* 282: 73-74
- Sher, A., Snary, D. (1982) *Nature* 300: 639-640
- Snary, D. (1980) *Exp. Parasitol.* 49: 68-77
- Snary, D., Ferguson, M.A.J., Scott, M.T., Allen, A.K. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 343-356
- Snary, D., Hudson, L. (1979) *FEBS Lett.* 100: 166-170
- Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- Speicher, D.W., Marchesi, V. (1984) *Nature* 311: 177
- Storino, Milei (1985) *Miocardopatía Chagásica Crónica*. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.
- Strout, R.G. (1962) *J. Parasitol.* 48: 100
- Taylor, A.E.R., Baker, J.R. (1968) *The cultivation of parasites in vitro*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Teixeira, M.M.G., Yoshida, N. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 271-282
- The Comitee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologists (1980) *J. Protozool.* 27: 37-54
- Thomas, P.S. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5201-5205
- Warren, L.G. (1960) *J. Parasitol.* 46: 529-538
- Wrightsmann, R., Leon, W., Manning, J. (1986) *Infect. Immun.* 53: 235-239
- Yoshida, N. (1983) *Infect. Immun.* 40: 836-839
- Yoshida, N. (1986) *Exp. Parasitol.* 61: 184-191
- Young, R.A., Davis, R.W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1194-98

Zingales, B., Andrews, N.W., Kuwajima, V.Y., Colli, W. (1982) Mol. Biochem. Parasitol. 6: 111-124

Zingales, B., Katzin, A.M., Arruda, M.V., Colli, W. (1985) Mol. Biochem. Parasitol. 16: 21-34

Zweerink, H.J., Weston, H.D., Andersen O.F., Garber, S.S., Hayes, E.C. (1984) Infect. Immun. 46: 826-830

