

T 8/70

UNIDAD DE INVESTIGACIONES MÉDICAS. HOSPITAL
UNIVERSITARIO "SAN CECILIO". SAS-UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA "LÓPEZ-NEYRA".CSIC

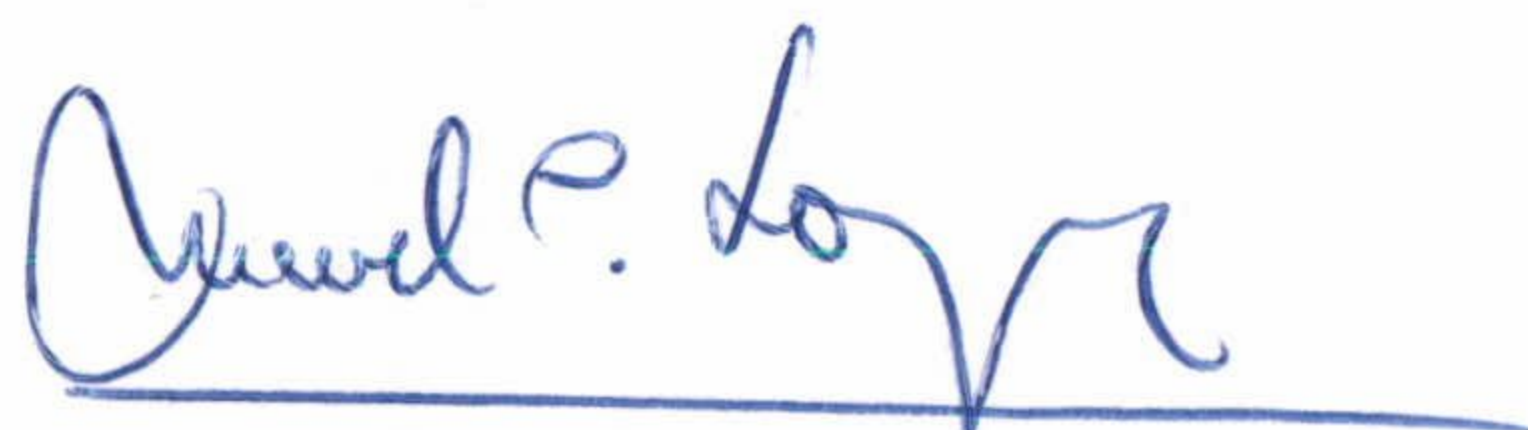
UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 15/12/03
ENTRADA NUM. 4962

**CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS
PROTEÍNAS PAR1 Y PAR2 DE TRIPANOSOMA
CRUZI EN VACUNAS DNA. ANÁLISIS DEL PAPEL
INMUNOMODULADOR DE LA PROTEÍNA HSP70.**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 61486664x
N.º Copia i16074944

Directores de la tesis:

UNIVERSIDAD DE GRANADA
13 NOV. 2003
COMISION DE DOCTORADO



M.C. López López



M.C. Thomas Carazo

Memoria presentada por la licenciada:



María Morell Hita

1.-INTRODUCCIÓN:

1-39

1.1.- *T. cruzi* . Características generales:

1.1.1.-Clasificación filogenética.

1.1.2.-Ciclo de vida.

1.1.3.-Peculiaridades de la biología molecular de *T. cruzi*:

1.1.3.1.- Cariotipo y tamaño molecular.

1.1.3.2.- Organización génica. Transcripción policistrónica y discontinua.

1.1.3.3.-Trans-splicing y poliadenilación

1.1.3.4.- Regulación génica :

1.1.3.4.1.- Regulación de la transcripción.

1.1.3.4.2.- Regulación post-transcripcional.

1.2.- *T. cruzi* y enfermedad de Chagas:

1.2.1.-Patología de la enfermedad de Chagas.

1.2.2.- Respuesta inmune protectora

1.2.3.- Control vectorial. Quimioterapia e inmunoterapia

1.3.- Antígenos de *T. cruzi*:

1.3.1.-Generalidades.

1.3.2.-Proteínas de membrana

1.3.3.-Proteínas flagelares.

1.4.- Modelos experimentales de infección.

1.5.- Vacunas genéticas:

1.5.1-Antecedentes.

1.5.2.-Respuesta inmune generada por las vacunas genéticas.

1.6.-Proteínas de choque térmico. Capacidad adyuvante

2.-MATERIALES Y MÉTODOS:

41-67

2.1.-Productos químicos y material básico.

2.2.-Tampones.

2.3.-Soluciones.

2.4.-Enzimas.

2.5.-Anticuerpos.

2.6.-Oligonucleótidos sintéticos.

2.7.-Péptidos sintéticos.

2.8.-Medios de cultivos.

2.9.-Cepas bacterianas.

2.10.-Cultivo de líneas celulares de mamífero.

2.11.-Cepas de ratones.

- 2.12.-Inducción de la síntesis de anticuerpos en conejo.
- 2.13.-Purificación de DNA plasmídico.
- 2.14.-Tratamiento de DNA con proteínas enzimáticas.
- 2.15.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 2.16.-Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.
- 2.17.-Clones recombinantes existentes en el laboratorio.
- 2.19.-Transformación de *E. coli* con los plásmidos de DNA recombinante.
 - 2.19.1.-Preparación en células de *E. coli* electrocompetentes.
 - 2.19.2.-Selección de colonias recombinantes de *E. coli*.
- 2.20.-Secuenciación de DNA.
- 2.21.-Purificación de las proteínas recombinantes PAR1 y PAR2.
 - 2.21.1.-Purificación de la proteína recombinante PAR1.
 - 2.21.2.-Purificación de la proteína recombinante PAR2.
- 2.22.-Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida: SDS-PAGE.
- 2.23.-"Western blot". Inmunodetección de proteínas fijadas en membranas.
- 2.24.-Expresión de proteínas recombinantes en células eucariotas por los vectores recombinantes de pCMV4.
- 2.25.-Protocolo de inmunización de ratones con plásmidos de DNA.
- 2.26.-Procesamiento de órganos linfoides.
- 2.27.-Detección de anticuerpos.
 - 2.27.1.-Anticuerpos frente a proteínas: ELISA.
 - 2.27.2.-Anticuerpos frente a péptidos: FAST-ELISA.
- 2.28.-Inmunodetección de proteínas de la superficie celular mediante citometría de flujo.
- 2.29.-Estimulación de linfocitos *in vitro*.
- 2.30.-Determinación de citoquinas.
 - 2.30.1.-A nivel intracelular mediante citometría de flujo.
 - 2.30.2.-En el sobrenadante de cultivos celulares mediante ELISA.
- 2.31.-Ensayo de linfoproliferación.
- 2.32.-Ensayos de unión y estabilidad de péptidos A2.
- 2.33.-Análisis de actividad citotóxica en esplenocitos de ratones inmunizados con DNA.
 - 2.33.1.-Estimulación de los esplenocitos *in vitro*.
 - 2.33.2.-Ensayo de liberación de cromo.
- 2.34.- Obtención de formas tripomastigotes de *T. cruzi*.

3.-OBJETIVOS

68-69

4.-RESULTADOS

70-117

4.1.-Clonaje, expresión y purificación de las proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en un sistema procariota.

4.2.-Antigenicidad de la proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en infección natural.

4.2.1.-Reconocimiento de las proteínas PAR1 y PAR2 por sueros de pacientes chagásicos.

4.2.2.-Análisis de los determinantes antigénicos contenidos en las proteínas PAR1 y PAR2 de *T. cruzi*.

4.3.- Antigenicidad de las proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en infección experimental murina.

4.3.1.- Reconocimiento de la proteínas PAR1 y PAR2 por sueros de ratones infectados con *T. cruzi*.

4.3.2.- Análisis de los determinantes antigénicos contenidos en la proteínas PAR1 y PAR2 de *T. cruzi*.

4.4.-Diseño de una vacuna genética basada en la utilización de los genes PAR1 y PAR2 de *T. cruzi*. Papel modulador de la proteína HSP70.

4.4.1.-Construcción y purificación de los vectores vacuna de ADN.

4.4.2.-Expresión de los genes PAR1 y PAR2 tanto aislados como fusionados al gen de la HSP70 (PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70) en células de mamífero (Cos-7).

4.4.3.- Vacunación con las proteínas PARs. Modelo experimentales.

4.4.3.1.-Respuesta humoral inducida por las proteínas PARs en vacunas DNA. Análisis de determinantes antigénicos.

4.4.3.2.-Respuesta celular inducida por las proteínas PARs en vacunas DNA. Análisis de determinantes antigénicos.

4.4.3.3.-Respuesta celular inducida por la inmunización con los genes de fusión *PAR1-HSP70* y *PAR2-HSP70*

4.4.3.3.1.-Proliferación linfocitaria frente a las proteínas PARs

4.4.3.3.2.-Proliferación linfocitaria frente a péptidos de la proteínas PAR1 y PAR2

- 4.4.3.3.3.-Perfil de citoquinas.
- 4.4.3.3.4.-Ensayos de citotoxicidad.
- 4.4.3.4.-Parasitemia en ratones vacunados.
- 4.4.3.5.-Determinación de anticuerpos en ratones vacunados e infectados.
- 4.4.4.-Evaluación de protección en ratones inmunizados con el DNA de las proteínas PARs aisladas o fusionadas a la HSP70.
- 4.5.- Búsqueda de proteínas análogas a PAR1 en otros trypanosomátidos

5.-DISCUSIÓN: 118-131

- 5.1.-Clonaje, expresión y purificación de las proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en un sistema procariota.
- 5.2.-Antigenicidad de la proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en infección natural.
 - 5.2.1.-Reconocimiento de las proteínas PAR1 y PAR2 por sueros de pacientes chagásicos.
 - 5.2.2.-Análisis de los determinantes antigénicos contenidos en las proteínas PAR1 y PAR2 de *T. cruzi*.
- 5.3.- Antigenicidad de las proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en infección experimental murina.
 - 5.3.1.- Reconocimiento de la proteínas PAR1 y PAR2 por sueros de ratones infectados con *T. cruzi*.
 - 5.3.2.- Análisis de los determinantes antigénicos contenidos en la proteínas PAR1 y PAR2 de *T. cruzi*.
- 5.4.-Diseño de una vacuna genética basada en la utilización de los genes PAR1 y PAR2 de *T. cruzi*. Papel modulador de la proteína HSP70.
 - 5.4.1.-Construcción y purificación de los vectores vacuna de ADN.

5.4.2.-Expresión de los genes PAR1 y PAR2 tanto aislados como fusionados al gen de la HSP70 (PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70) en células de mamífero (Cos-7).

5.4.3.- Vacunación con las proteínas PARs. Modelo experimentales.

5.4.3.1.-Respuesta humoral inducida por las proteínas PARs en vacunas DNA. Análisis de determinantes antigénicos.

5.4.3.2.-Respuesta celular inducida por las proteínas PARs en vacunas DNA. Análisis de determinantes antigénicos.

5.4.3.3.-Respuesta celular inducida por la inmunización con los genes de fusión *PAR1-HSP70* y *PAR2-HSP70*

5.4.3.3.1.-Proliferación linfocitaria frente a las proteínas PARs

5.4.3.3.2.-Proliferación linfocitaria frente a péptidos de la proteínas PAR1 y PAR2

5.4.3.3.3.-Perfil de citoquinas.

5.4.3.3.4.-Ensayos de citotoxicidad.

5.4.3.4.-Parasitemia en ratones vacunados.

5.4.3.5.-Determinación de anticuerpos en ratones vacunados e infectados.

5.4.4.-Evaluación de protección en ratones inmunizados con el DNA de las proteínas PARs aisladas o fusionadas a la HSP70.

5.5.- Búsqueda de proteínas análogas a PAR1 en otros tripanosomátidos

6.-CONCLUSIONES: 132-133

7.-BIBLIOGRAFÍA: 134-157

Introducción



UNIVERSITY OF TORONTO

1.-*Trypanosoma cruzi*. Características generales.

1.1.-Clasificación filogenética.

T. cruzi es un protozoo parásito flagelado perteneciente al Filum *Sarcomastigophora*, Subfilum *Mastigophora*, Clase *Zoomastigophorea*, Orden *Kinetoplastida*. En este grupo se encuadra una sola familia *Trypanosomatidae* en la que se incluyen especies de los Géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. La característica que distingue a este Orden de otros es la presencia de una sola mitocondria de gran tamaño llamada kinetoplasto, con una forma diferente de DNA (kDNA), consistente en miles de copias de minicírculos y algunas copias de maxicírculos, interconectados topológicamente formando una red (Simpson, 1989). El kDNA supone entre un 10-30% del DNA total dependiendo de la especie. Este orgánulo especial se sitúa adyacente al cuerpo basal del flagelo y su replicación se produce en coordinación con la del DNA nuclear (sus fases S están reguladas coordinadamente) (Pasion y col., 1994), a diferencia de lo que ocurre con los DNA mitocondriales de otros organismos.

Dentro de los kinetoplástidos, se reconocen dos tipos de relaciones parásito-hospedador: (i) kinetoplástidos monogénicos, que parasitan un solo hospedador, invertebrado, y (ii) kinetoplástidos digénicos, que parasitan a dos hospedadores, normalmente uno invertebrado y otro vertebrado. Estos organismos eucariotas inferiores, por sus implicaciones sanitarias y económicas, están sujetos a intereses biológicos y médicos. Las especies monogénicas son conocidas como "triptanosomátidos inferiores", y se cree que los géneros digénicos *Leishmania* y *Trypanosoma* provienen de un ancestro monogénico. Además, las etapas en insectos de las especies digénicas patógenas recuerdan a las especies monogénicas (Lake y col, 1991). Los *Trypanosomatidae* son descendientes directos de los primeros eucariotas que aparecieron en la tierra hace unos 1500 millones de años, según se infiere de los árboles filogenéticos contruidos con secuencias ribosomales (Knoll, 1992).

1.2.-Ciclo de vida.

T. cruzi posee un ciclo de vida complejo que incluye la infección de un hospedador vertebrado y la transmisión por un insecto vector. Este parásito adopta a lo largo de su ciclo de vida tres estadios morfológicos principales: la forma amastigote no flagelada y las formas flageladas epimastigote y tripomastigote (Brener, 1973, 1981). La forma epimastigote prolifera en el insecto vector y eventualmente se diferencia para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, con capacidad infectiva. El vehículo son las heces del insecto vector. La entrada del parásito en el hospedador puede producirse directamente a través de mucosas o a través de la piel facilitado por la erosión que se produce al rascar la picadura producida por el insecto. De forma ocasional, también puede existir la transmisión oral, al comer el hospedador vertebrado alimentos contaminados con heces de estos insectos. Una vez en el torrente sanguíneo del hospedador, estos tripomastigotes son capaces de penetrar en una gran variedad de tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, células del sistema nervioso y musculares) (Burleigh y col., 1995). Dentro de estas células, los parásitos se transforman en formas amastigotes que sufren varios ciclos de división y se diferencian, pasando por formas intermedias de morfología similar a los epimastigotes, a tripomastigotes sanguíneos que son liberados por ruptura de la célula anfitriona, iniciando así el siguiente ciclo de infección. Las formas tripomastigotes son una población pleomórfica, con dos morfologías básicas descritas como *slender* y *broad*. Las formas *slender* pueden invadir nuevamente células de forma similar a los tripomastigotes metacíclicos. Además, células infectadas lisadas prematuramente, pueden liberar formas amastigotes, que podrían también infectar células particularmente fagocíticas. La ingestión de los tripomastigotes sanguíneos por parte del insecto vector (*Rhodnius*, *Triatoma*, etc.), permite que se complete el ciclo de vida del parásito al diferenciarse el tripomastigote en formas amastigotes replicativas conocidas como esferoamastigotes. Como paso intermedio a los esferoamastigotes, todas las formas tripomastigotes sanguíneas pasan por una morfología *broad* (Tyler y Engman, 2001). Seguidamente, éstas se transforman en epimastigotes replicativos. *In vitro*, la transformación de amastigotes a epimastigotes es reversible y dependiente de la concentración de glucosa (Tyler y Engman,

2000). Es importante destacar que la invasión de las células y la replicación intracelular son esenciales para la inducción de la enfermedad y la continuación del ciclo de vida del parásito. En la siguiente figura se muestra un esquema del ciclo de vida del parásito:



Fig 1.-**Ciclo de vida de *T. cruzi***. Se puede observar la diferenciación de formas epimastigotes a tripomastigotes en el intestino del insecto vector. En el hospedador vertebrado estos tripomastigotes se diferencian a amastigotes, formas replicativas que tras varios ciclos de división vuelven a diferenciarse a tripomastigotes.

1.3.- Peculiaridades de la biología molecular de *Trypanosoma cruzi* .

Aunque el estudio de estos protozoos flagelados se inició principalmente por razones de salud pública, posteriormente el descubrimiento en ellos de una serie de peculiaridades, tales como transcripción policistronica, el mecanismo de “*trans-splicing*” o la edición del RNA mitocondrial, los han convertido en interesantes modelos de estudio. Se postula que la intensa presión evolutiva a la que están sometidos estos organismos, especialistas en sobrevivir en condiciones adversas, ha dado lugar por una parte al mantenimiento de estructuras evolutivamente antiguas y por

otra al desarrollo de nuevos mecanismos bioquímicos con amplia repercusión en la expresión de la información génica. Algunos de los fenómenos descritos inicialmente como específicos de tripanosomátidos, se ha comprobado posteriormente que también tienen lugar en organismos eucariotas superiores, como es el caso del *trans-splicing* de mRNAs, presente en células humanas y otros mamíferos (Caudevilla y col., 2001) o la interferencia de RNA, descrito en una amplia variedad de organismos, incluido el hombre (Bernstein y col., 2001).

1.3.1.- Cariotipo y tamaño molecular.

Actualmente se acepta que el genoma de *T. cruzi* es diploide (Borst, 1982; Gibson, 1985), con un tamaño de aproximadamente $3,5 \times 10^8$ pb, y con unos 10.000 genes (Clayton, 2002). Los cromosomas de los tripanosomátidos no se condensan durante la mitosis y resulta difícil estimar su número por técnicas convencionales (Solari, 1980). Aunque existen diferencias cariotípicas entre diferentes cepas, *T. cruzi* posee alrededor de 20 cromosomas (Cano y col., 1995; Henrikson y col., 1996) con tamaños comprendidos entre 450Kb y 4Mb. Además, los cromosomas homólogos difieren considerablemente en su tamaño, debido fundamentalmente a variaciones en el número de genes repetidos en tandem y a la mayor o menor presencia de secuencias repetidas, especialmente en regiones subteloméricas (Agüero y col., 2000; Clayton, 2002).

Estudios de la estructura genética en poblaciones de *T. cruzi* demuestran la existencia de fijación de heterocigocidad, ausencia de segregación, predominancia o ausencia de determinados genotipos y otras características que indican un predominio de la reproducción asexual y por lo tanto una distribución de la población de linajes clonales (De Luca D'oro y col., 1993; Henriksson y col., 1990).

Recientemente se ha podido comprobar que realmente *T. cruzi* es capaz de realizar intercambio de material genético. Se han encontrado híbridos en el estado mamífero del ciclo de vida, que deben resultar de una fusión, seguida de pérdida de material genético, probablemente en conjunción con fenómenos de recombinación homóloga. Este intercambio genético que resulta esencial en otros parásitos como en el caso de *Plasmodium*, donde forma parte obligatoria de su ciclo de vida, no lo es en el caso de *T. cruzi*. Este tipo de fenómeno

permite recorrer mayores distancias genéticas que la herencia mendeliana y potencialmente facilita una rápida especiación y evolución posibilitando la adaptación a nuevos huéspedes (Gaunt, M.W., 2003)

1.3.2.- Organización génica. Transcripción policistrónica y discontinua.

La organización génica en *T. cruzi* y otros miembros del Orden *Kinetoplastida*, posee ciertas reminiscencias de la organización en operones presente en el reino procariota. Es especialmente llamativo el hecho de que sus genes no están interrumpidos por intrones (Borst, 1986). Recientemente, Mair y colaboradores (Mair, y col., 2000), mostraron en *T. brucei* una estructura tipo intrón en el gen que codifica para la polimerasa poli-A. Además, este intrón es eficientemente procesado mediante *cis-splicing*, mecanismo análogo al que utilizan los eucariotas superiores. Asimismo comprobaron que *T. cruzi* también posee y procesa esta estructura intrónica en el gen poli-A polimerasa (Mair y col., 2000). No parece ser un hecho genérico, ya que tras la secuenciación de aproximadamente el 50% del genoma de *T. cruzi* no se han localizado más intrones (Mair, y col., 2000; Degraeve y col., 2001). A diferencia de lo que ocurre en los operones procariotas, la estructura génica de los operones de tripanosomátidos es azarosa, sin que exista relación con la actividad, ni con la regulación de estos genes contenidos en un mismo "operon". En *T. cruzi* la única relación que poseen dichos genes es que son co-transcritos al mismo tiempo (Gibson y col., 1985; Clayton, 2002). Normalmente los genes que codifican proteínas aparecen en agrupaciones que contienen repeticiones en tandem del mismo gen separadas por pequeñas regiones intergénicas. Este es el caso de los genes que codifican las histonas H2A (Puerta y col., 1994) ó de la HSP70 (Requena y col., 1988) de *T. cruzi*. Se ha descrito que los genes así agrupados se transcriben como parte de un transcrito policistrónico primario (Clayton, 1992). La transcripción del policistrón parece depender de un promotor localizado en 5' corriente arriba del comienzo de la agrupación. Esta particular organización probablemente explica porqué en tripanosomátidos se han encontrado muy pocas secuencias con capacidad promotora.

1.3.3.- “Trans-splicing” y poliadenilación

Uno de los hechos más llamativos de los mecanismos de expresión y regulación genética de tripanosomátidos es la forma en que transcriben y procesan sus genes nucleares (Nilsen, 1994). La transcripción policistrónica requiere de un mecanismo para procesar el transcrito primario en RNA mensajeros (RNAm) maduros individuales. El proceso implica la adición de una secuencia de 39 nucleótidos (*mini-exon* ó SL) en el extremo 5' del mensajero y la de una cola de poliadeninas (poli-A) en el extremo 3'. Se genera así un RNAm quimérico resultante de la transcripción de dos segmentos de DNA que se encuentran separados en el genoma. Las primeras evidencias de este fenómeno fueron resultado del análisis del extremo 5' de las secuencias de los RNAm de los antígenos de superficie de *T. brucei*. Se comprobó que los primeros 35 nucleótidos en todos los RNAm de diferentes antígenos analizados eran comunes (Boothroyd y Cross, 1982). Aunque en un principio se pensó que esta secuencia líder era específica de los genes de las glicoproteínas variables de superficie (VSGs), más tarde se demostró que todos los RNAm procedentes del DNA nuclear de distintas especies de tripanosoma empezaban con la misma secuencia (DeLange y col., 1984; Parsons y col., 1984) aunque existen excepciones. Algunos ejemplos en *T. cruzi* son los transcritos de los elementos L1Tc y NARTc que no presentan SL (Olivares, 2000; Bringaud y col., 2002a) o en el caso de *T. brucei*, los transcritos del retrotransposón *ingi/RIME* que tampoco presentan SL (Vasella y col., 1996).

Así pues, la secuencia líder (SL) o *mini-exon*, consiste en 39 nucleótidos con una estructura conocida como *cap* altamente modificada (Freistadt y col., 1987). Esta secuencia forma parte de una unidad precursora de 1'35kb repetida en tandem unas 200 veces en el genoma (De Lange y col., 1983). La unidad se transcribe en un RNA intermediario (*medRNA*) de 135-147 nucleótidos de los cuales los 39 primeros corresponden al *mini-exon*. Esta transcripción es independiente de la de los genes codificantes de proteínas (Campbell y col., 1984). La secuencia del *mini-exon* es entonces donada al pre-RNAm mediante un proceso denominado *trans-splicing* (Murphy y col., 1986; Sutton y Boothroyd, 1986; Agabian, 1990). El extremo 5' del RNA del SL y el 3' del RNA codificante poseen las secuencias consenso características de los

sitios donadores y aceptores de *splicing*, una región rica en pirimidinas que precede al dinucleótido aceptor AG (Huang y col., 1991, Curotto de LaFaille y col., 1992). Este fenómeno de *trans-splicing* parece estar estrechamente ligado a la transcripción policistrónica de los genes codificantes de proteínas de tripanosomátidos, lográndose así un mecanismo eficaz para generar mensajeros individuales con estructura *cap* en su extremo 5', a partir de transcritos policistrónicos (Laird, 1989). Este mecanismo de procesamiento mediante transcripción discontinua no es exclusivo de tripanosomátidos, se ha demostrado la existencia de un mecanismo similar al "trans-splicing" en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Krause y Hirsh, 1987; Choquet y col., 1988), así como en mamíferos (Castellino y col., 2001).

No se han encontrado señales consenso de poliadenilación en tripanosomas. Se ha propuesto que el fenómeno de poliadenilación es posterior al de *trans-splicing*, y que es la posición de inserción de la secuencia líder (SL) la que condiciona la adición de la cola de poli-A del gen situado en la posición inmediatamente anterior, en algún lugar incluido en la región situada aproximadamente 1Kb corriente arriba del lugar de *trans-splicing* (LeBowitz y col., 1993; Ullu y col., 1993). Incluso se ha propuesto que la misma secuencia rica en pirimidinas, que modula el lugar aceptor de *trans-splicing*, podría dirigir el lugar de la poliadenilación (Matthews y col., 1994; Schürch y col., 1994). La poliadenilación no se produce en un punto concreto. Se han observado microheterogeneidades para varios transcritos en tripanosomátidos, con la inserción de la cola de poli-A después de un residuo de adenina como única característica común aparente (Huang y col., 1984; Kapler y col., 1990, Marañón y col., 1998).

Como ya se ha indicado, el DNA de la mitocondria única de los tripanosomas (DNA_k) consiste en una red de maxicírculos y minicírculos interconectados. El DNA de los maxicírculos codifica proteínas y RNAs esenciales para la función mitocondrial. La expresión de los maxicírculos implica un proceso de edición de los RNAs mensajeros mitocondriales en el que son añadidos o eliminados residuos de uridina, hasta crear mensajeros funcionales. Se generan RNAs que son diferentes de los genes de los que proceden. Este proceso supone la inserción o delección específica de residuos de uridina en los RNAs para dar lugar a los mensajeros funcionales (Stuart, 1991). La edición del transcrito primario implica la creación codones de iniciación o de terminación, corrige y extiende marcos abiertos de lectura. La

información genética que dirige la edición reside en unos transcritos mitocondriales cortos (50-70 nucleótidos) o RNA guías (Blum y col., 1990) y en el proceso han sido implicadas actividades endonucleasas y ligasas específicas. La especificidad del proceso de edición está determinada por los "ARN guías" codificados tanto en los maxicírculos como en los minicírculos (Strum y Simpson, 1990). En tripanosomátidos hasta el momento sólo se han descrito fenómenos de edición en transcritos de genes codificados en el kinetoplasto (Piller y col., 1996).

1.3.4.-Regulación génica.

1.3.4.1.-Regulación de la transcripción.

Las RNA polimerasas de tripanosomátidos aisladas y caracterizadas hasta la fecha se han clasificado según su sensibilidad a α -amanitina siguiendo la denominación clásica para el resto de eucariotas. Así, la RNA polimerasa I no es sensible a α -amanitina y transcribe los RNA ribosomales (Evers y col., 1993); se han descrito dos RNA polimerasa II, muy sensibles a α -amanitina y a N-lauril sarcosina, que transcribirían genes codificantes de proteínas (Jess y col., 1989), así como la de los medRNA de la secuencia líder (Günzl y col., 1997). La RNA polimerasa III es poco sensible a α -amanitina y sensible a tagetitoxina, y sería la actividad encargada de la transcripción de los ARN nucleares pequeños (snRNA), los RNA de transferencia y el ribosomal 5s (Köck y col., 1988). Los promotores se clasifican como de tipo I, II ó III, según la actividad polimerasa que dirijan.

Se han definido algunas secuencias promotoras para la RNA polimerasa I. Estas se han encontrado dirigiendo la transcripción de RNAr, pero también de genes codificantes de proteínas, como las VSG (Pham y col., 1996), o los genes PARP (Brown y col., 1992) de *T. brucei*. Su estructura es similar a la de otros promotores eucariotas de los genes RNA ribosomales (Laufer y col., 1999; Laufer y Günz, 2001).

En cuanto a los promotores tipo III, se ha descrito el de los genes U2-snRNA (RNA nucleares pequeños) de *T. brucei* (Fantoni y col., 1994), que funciona también como promotor en los RNAt de eucariotas, presentando los

promotores de tipo III las cajas A y B descritas corriente arriba de otros genes RNAt (Nakaar y col., 1997).

Sin embargo, en el caso de la RNA polimerasa II a pesar de todos los estudios realizados no se han encontrado secuencias promotoras tipo II. La aparente ausencia de estas secuencias, unida a la transcripción policistrónica, hacen que la gran mayoría de los genes en estos organismos se transcriban constitutivamente y que una vez transcritos, sean controles de tipo post-transcripcional los que determinen la expresión final en el citoplasma de cada mensajero. Así, por ejemplo, se ha encontrado que genes pertenecientes a un mismo policistrón se expresan en diferentes estadios morfológicos del parásito, aunque sus tasas de transcripción no se modifican a lo largo del ciclo de vida del mismo (Wilson y col., 1993, Vanhamme y Pays, 1995). Asimismo, se ha descrito transcripción constitutiva del gen de la HSP70 de *T. brucei*, aunque sus mensajeros son mucho más abundantes en condiciones de choque térmico (Häusler y Clayton, 1996).

1.3.4.2.-Regulación post-transcripcional.

Los estudios descritos anteriormente avalan la gran relevancia que el control post-transcripcional tiene en la regulación génica en tripanosomátidos (Revisado en Vanhamme y Pays, 1995). Por un lado, se han encontrado ejemplos de agrupaciones de genes que difieren entre sí solamente en sus regiones 3' no traducidas (3'UTR) y en los que las diferencias en zonas no traducidas dan lugar a distintos patrones de expresión de los mismos (Quijada y col., 1997). Más aún, se ha demostrado por ejemplo, que la 3' UTR del mensajero de la HSP83 de *L. amazonensis* confiere termoestabilidad a este mensajero, de tal forma que su vida media aumenta con la temperatura (Argaman y col., 1994; Aly y col., 1994). Esta regulación de la estabilidad de los transcritos maduros mediada por las secuencias 3' UTR no sólo ocurre en genes inducibles, sino también en genes con expresión dependiente de estadio, como ocurre con las VSG de *T. brucei* (Berberof y col., 1995).

En cuanto al control del procesamiento de los transcritos inmaduros, se ha encontrado un ejemplo en el gen ESAG6, localizado en el sitio de expresión de las VSG de *T. brucei* (Coquelet y col., 1989; Pays y col., 1989). Los transcritos

de este gen sufren un proceso de trans-splicing anormal en las formas procíclicas que da lugar a mensajeros inestables, que no llegan a acumularse en el citoplasma. Por el contrario, en las formas sanguíneas una alta proporción de transcritos dan lugar a mensajeros maduros mediante “trans-splicing” en una posición tal que aumenta su estabilidad y de esta forma se acumulan en el citoplasma.

A nivel del control de la traducción del RNA, se ha comprobado que el aumento de la estabilidad del transcrito a veces se ve acompañado por un aumento en la tasa de traducción del mismo (Argaman y col., 1994). En algunos casos se ha observado que los elementos que determinan esta diferencia en la traducibilidad del transcrito se localizan en la región 3' UTR del mensajero, como ocurre con la gp72 y la gp85 de *T. cruzi* (Nozaki y col., 1995).

2.- *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas.

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, patología descrita a principios de siglo (Chagas, 1909). Actualmente esta enfermedad afecta a más de 6 millones de personas en América Central y Sudamérica (OMS, 2002) presentando elevados índices de morbilidad y mortalidad, así como una clara disminución tanto de la calidad de vida, como de la productividad laboral. Al mantenimiento de la infección, transmitida por el insecto vector, colaboran la existencia de animales naturalmente infectados y las bajas condiciones socioeconómicas de la población, lo que conlleva a la domiciliación de estos insectos infectados en las viviendas. De este modo, se establece una interacción muy cercana entre el vector y las personas propensas a convertirse en hospedadores, hecho necesario para la generación de la infección (Nogueira, 1987). La quimioterapia convencional, que utiliza compuestos derivados del nitrofurano es altamente tóxica y de baja eficacia (de Andrade y col., 1996; Braga y col 2000), de modo que parásitos viables e inflamaciones crónicas locales pueden ser detectados durante toda la vida del paciente (Nogueira, 1987; Viotti y col., 1994).

2.1.-Patología de la enfermedad de Chagas.

Esta enfermedad involucra tres fases distintas (i) una fase aguda, inaparente en la mayoría de los casos, que ocasiona la muerte en aproximadamente el 10% de los individuos y que se caracteriza por una elevada parasitemia que persiste durante unas semanas, (ii) una fase indeterminada (fase crónica asintomática), que compromete cerca del 40% de los casos serológicamente positivos (la mayoría de los casos agudos en un período de 2 a 3 meses, pasan a un estado subagudo, y de éste a un estado crónico asintomático); (iii) una fase crónica sintomática, en la que el parásito se localiza en los tejidos y un 30% de los individuos infectados desarrolla lentamente lesiones inflamatorias de larga duración (entre 5 y 20 años después de la infección) los pacientes desarrollan cardiomiopatías y/o megaesófago y megacolon (Prata 2001).

Actualmente, los mecanismos implicados en la patogénesis de esta enfermedad no se conocen claramente. Las reacciones autoinmunes y los procesos inflamatorios crónicos y progresivos, probablemente asociados a la presencia del parásito, podrían explicar en parte los daños neurológicos y cardíacos (Pentreath, 1995).

Los mamíferos infectados con *T. cruzi* desarrollan manifestaciones de inmunosupresión (Mosca y col., 1991; Kierszenbaum y col., 1994), incluyendo alteraciones funcionales en linfocitos y otras células relevantes para la organización de una respuesta inmune efectiva (Mejia-Lopez y col., 1993; Motrán y col., 1996). Tanto en ratones como en humanos, esta inmunosupresión está asociada con un descenso en la producción de IL-2 (Harel-Bellan y col., 1985) y en la expresión de su receptor (Gomes y col., 1996; Rottenberg y col., 1989), al igual que un funcionamiento defectuoso del receptor de antígeno de las células T (Lopes y col., 1994). Recientemente se ha descrito que *T. cruzi* también interfiere con la presentación de antígenos al sistema inmune, ya que macrófagos infectados *in vitro* son incapaces de presentar de una manera eficaz antígenos restringidos a MHC-II (La Flamme y col., 1997). Asimismo, la expresión de citoquinas como IFN- γ , IL-4 e IL-5 también se encuentra alterada tras la infección con *T. cruzi* (Kierszenbaum y col., 1996), así como la expresión de moléculas de coestimulación (Planelles y col. 2003),

Entre los primeros mecanismos que fueron propuestos como responsables de la patología asociada a la fase crónica de la enfermedad de Chagas, se encuentra la existencia de un proceso autoinmune (Kierszembbaum, 1985; Petry y Eisen, 1989; Rossi y Bestetti, 1995; Kalil y Cunha-Neto, 1996 revisado en Kierszembbaum 2003). Argumentos a favor de esta hipótesis han sido la dificultad para detectar parásitos en las lesiones inflamatorias crónicas (Jones y col., 1993), la activación policlonal durante la infección aguda (Minoprio y col., 1989), el reducido repertorio de cadenas variables en los receptores de los linfocitos infiltrados en las lesiones crónicas, y la existencia de “epítopes compartidos” entre el parásito y los tejidos neuronal y cardíaco del hospedador (Rizzo y col, 1989; Van Voorhis y col., 1991; Cunha-Neto y col., 1996; Girones, N. 2003) . Se trataría de un proceso conocido como mimetismo molecular. De alguna manera los antígenos del propio parásito son capaces de adoptar conformaciones similares a las de proteínas del hospedador siendo así reconocidos como propios, consiguiendo pasar desapercibidos al sistema inmune.

Sin embargo, el tratamiento con inmunosupresores no mejora los síntomas, lo que hace que aunque exista un componente autoinmunitario en la enfermedad de Chagas no es posible abordar su tratamiento como el de una enfermedad autoinmune.

Aunque la presencia de respuestas inmunes contra proteínas del hospedador ha sido incuestionablemente demostrada en individuos infectados, no lo ha sido su participación en el desarrollo de la enfermedad, y tampoco se ha encontrado correlación entre estas autorreactividades y la severidad de la enfermedad. Experimentos de inmunosupresión durante las fases aguda o crónica de la infección no dieron como resultado la mejoría, sino la exacerbación de los síntomas (Tarleton y col., 1996). Estos mismos autores comprueban que se requiere la infección local del tejido cardíaco para la inducción de la respuesta patogénica característica de la fase crónica del síndrome de Chagas (Tarleton y col., 1997).

Por otra parte, la localización de parásitos en lesiones inflamatorias crónicas se ha comprobado tanto por PCR como por PCR *in situ* (Salomone O.A. 2000; Lane J.E. y col Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 98 (3):373-376, Apr 2003). Además la reducción en el número de parásitos correlaciona con una disminución en la severidad de la enfermedad (Tarleton

2001). También se ha comprobado la presencia de antígenos del parásito o parásitos intactos en tejidos dañados (Anez N. Y col 1999).

En resumen, aunque la existencia de autoanticuerpos ha sido irrefutablemente demostrada, también lo ha sido la presencia del parásito, o al menos su DNA o proteínas de éste en las lesiones. En nuestra opinión ambas hipótesis pueden complementarse sin ser excluyentes. Puede ser el propio parásito presente en las lesiones, el que ocasione o potencie la generación de estos autoanticuerpos al dañar los tejidos del hospedador. Esto explicaría la disminución de la severidad de los síntomas al eliminar el parásito y que el tratamiento con inmunosupresores no sea suficiente y no provoque la mejoría. Una disminución de estos autoanticuerpos beneficiaría al hospedador, pero si sigue estando presente el parásito en las lesiones estos autoanticuerpos volverían a generarse. En definitiva existe un componente autoinmune en esta enfermedad pero no podemos negar que lo ocasione el propio parásito.

2.2.- Control vectorial

Dado el número de personas afectadas y las importantes consecuencias socioeconómicas de esta enfermedad, en las zonas endémicas se han desarrollado programas de control fundamentalmente basados en la erradicación del insecto vector (Schofield CJ. y col . 1999). Según los datos de los propios países afectados, Uruguay se declara libre de transmisión de chagas en 1997, Chile en 1999, Brasil (zona central y el sur) en 2001, cuatro provincias de Argentina en 2002 y un departamento de Paraguay en 2003 (Miles, MA. Y col BMJ 2003 1444-1448) Según los últimos datos de la OMS (2002), el número de casos se ha reducido de unos 18 millones de personas afectadas a unos 6 millones. Sin embargo, sin entrar en polémica, debemos tener en cuenta varias consideraciones. Por una parte los datos presentados siempre son relativos, pues en estos países con bajas condiciones socioeconómicas no están controlados y/o censados todos los casos reales. Además, esto no dejan de ser cifras recogidas en momentos puntuales. Hay que destacar, como se mencionó anteriormente, que son muchas las especies de *Triatoma* que transmiten la enfermedad, varían de una zona a otra, e incluso en un mismo área, y de zonas selváticas a peridomésticas. Los hospedadores intermediarios igualmente están aumentando. Además, los

tratamientos empleados para erradicar las distintas especies del insecto no son los mismos, por tanto, hay que añadir la dificultad de identificar la especie implicada en cada caso. Finalmente habría que preguntarse ¿qué pasa con estos insecticidas empleados para un control masivo del insecto?. Recientemente se ha publicado un estudio con trabajadores expuestos a estos insecticidas. En él se incluía un total de 97 pacientes, y se demuestra que un 67% mostraba pérdidas auditivas con una media de exposición a estos compuestos de 3,4 años (Fernández Teixeira C. y col Rev Saude Pública 2003; 37 (4)). En definitiva, quizá sea una alternativa pero habrá que estudiar y valorar otros efectos. Parece evidente que no se ha conseguido de momento controlar esta enfermedad, lo que hace necesaria la búsqueda de otras vías en las que hoy por hoy se sigue trabajando, como el empleo de fármacos o la búsqueda de antígenos con fines inmunoprolácticos.

2.3.- Tratamientos actuales.

Actualmente las únicas drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son los nitrofuranos (nifurtimox) y los nitroimidazoles (benznidazol), que tienen una actividad significativa sólo en las fases aguda o crónica-reciente de la enfermedad y además inducen una serie de efectos tóxicos en el huésped (Prata 2001).

Se ha comprobado que *T. cruzi* al igual que muchos hongos y levaduras, tiene requerimientos estrictos de esteroides endógenos para la viabilidad celular y el crecimiento, siendo extremadamente sensible a la inhibición de la biosíntesis de ergosterol *in vitro* e *in vivo* (Revisado en Urbina 2000 , 2001 , 2002). Nuevos derivados de triazol e inhibidores de la citocromo p-450 dependiente de C14 esteroldemetilasa, están resultando efectivos tanto en fase aguda como crónica en ratones. Un ejemplo es el compuesto TAK-187, que ha mostrado ser 20 veces más potente que el benznidazol. La actividad observada en estos ensayos, particularmente en fase crónica, sólo se había visto antes con los compuestos DO870 (Urbina, 1996) y posconazol (Urbina, 1998).

2.4.-Respuesta inmune protectora.

Aunque el mecanismo preciso de la respuesta antiparasitaria en el hospedador vertebrado aún permanece sin aclarar, se ha demostrado que se

requieren los esfuerzos combinados de diversos tipos celulares, incluyendo los macrófagos (Aliberti y col., 1996; Aliberti y col., 1999), las células NK (Rottenberg y col., 1988; Cardillo F.J. y col., 1996; Brener, A. 1997 Int.Arch Alergy Immunol 114:103-110), linfocitos T CD4+ y CD8+ (DosReis, 1997; Rodrigues y col., 1999) así como células B productoras de anticuerpos (Kumar y Tarleton, 1998). Se resume de forma esquemática en la figura 2.

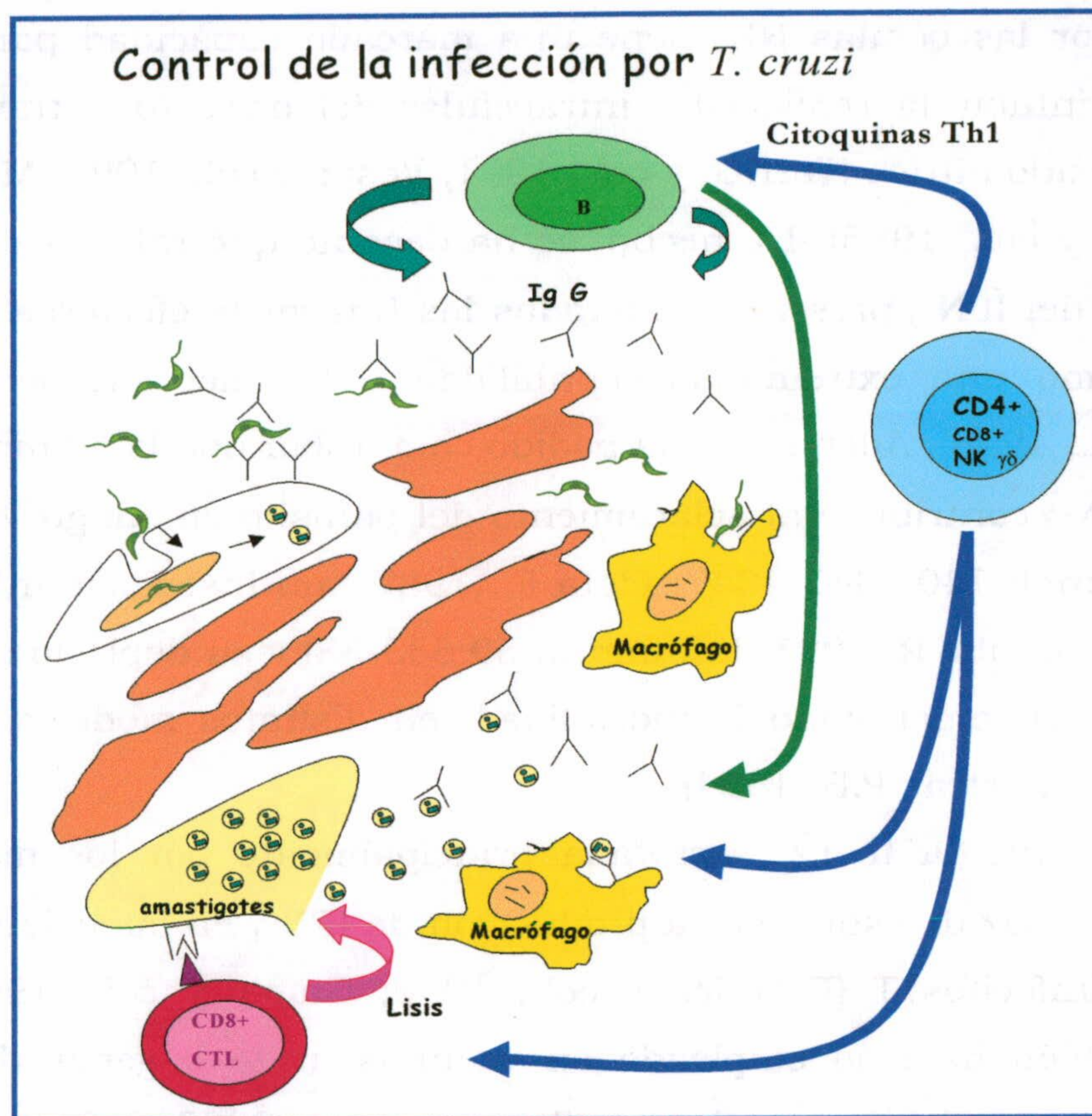


Fig 2.-Modelo de la respuesta inmune necesaria para el control de la infección por *T. cruzi*. Se muestra la necesidad de distintos tipos celulares como las células B productoras de anticuerpos, células CD4+, CD8+ ó NK productoras de citoquinas, principalmente tipo Th1, los macrófagos que intervienen en la eliminación del parásito, y linfocitos T CD8+ encargados de lisar aquellas células que expresen en su superficie péptidos antigénicos del propio parásito en moléculas MHCI.

Se ha comprobado que ratones tratados con anticuerpos monoclonales anti-CD4 (Araujo, 1989; Rottenberg y col., 1988; Russo y col., 1988) o anti-CD8 (Tarleton, 1990) se vuelven altamente susceptibles a la infección por *T. cruzi*, aumentando el porcentaje de mortalidad. Resultados similares se obtuvieron infectando ratones *knockout* para las moléculas CD4, CD8

(Rottenberg y col., 1993; Tarleton y col., 1996) ó β_2 -microglobulina (Tarleton y col., 1992).

Uno de los mecanismos por los que el sistema inmune contribuye a la erradicación del parásito es a través de la secreción de citoquinas de tipo Th1 como IFN- γ (Reed, 1988), TNF (Lima y col., 1997) o citoquinas proinflamatorias como IL-12 (Aliberti y col., 1996; Hunter y col., 1996). El IFN- γ , secretado inicialmente por las células NK, tiene una marcada capacidad para activar macrófagos e inhibir la replicación intracelular del parásito a través de la inducción de óxido nítrico (Torrico y col., 1991; Vespa y col., 1994; Metz y col., 1993; Cardillo y col., 1996). De hecho, se ha descrito que ratones deficientes en el receptor del IFN- γ presentan alteradas las funciones efectoras del óxido nítrico así como una extrema susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* (Holscher y col., 1998). Además se ha podido comprobar que la administración exógena de IFN- γ contribuye al aclaramiento del parásito en sangre (Reed SG, 1988, J. Immunol; 140:4342-4347; Plata F. ,1987 Ann Inst Pasteur/immunol 138:397-415; McCabe R, 1991, Inf.Immun;59:633-38) y su depleción exacerba la parasitemia incrementando la mortalidad, en distintos modelos animales ((Torrico F. 1991; Petray P.B.,1994).

Por su parte la IL-12, secretada principalmente por los macrófagos infectados, es capaz de estimular la producción de IFN- γ en las células NK así como en los linfocitos T (D'Andea y col., 1992; Gately y col., 1994). Esta citoquina también ha sido empleada en vacunas junto a genes del propio parásito comprobándose su eficacia (Katae y col 2002 Infect Inmmun. 70:4833-4840). En cuanto al TNF, también ha sido implicado en los mecanismos que llevan al aclaramiento del parásito por parte del macrófago (Silva y col., 1995; Lima y col., 1997; Castaños-Velez y col., 1998). Estos efectos son regulados negativamente por otras citoquinas como TGF- β o la IL-10, la cual es un potente bloqueador de diversas funciones del macrófago (Reed y col., 1994; Gazzinelli y col., 1992; Ding y col., 1993).

Si bien el INF- γ contribuye al aclaramiento del parásito, recientes estudios en pacientes crónicos, ponen de manifiesto que una producción excesiva de IFN- γ también puede tener efectos negativos en estos pacientes, siendo responsable de los daños en los tejidos y la morbilidad. Existiría según estos autores, un control por parte de la IL-10 secretada por monocitos y

macrófagos que permitiría controlar los efectos de una producción excesiva de IFN- γ , disminuyendo la severidad de las lesiones. (Gomes J.A.S. y col., 2003).

3.-Antígenos de *T. cruzi*

3.1.-Generalidades.

T. cruzi presenta una elevada complejidad antigénica existiendo una gran heterogeneidad a nivel de antígenos entre cepas, clones (Alves y col., 1987) e incluso entre las distintas formas que adopta en su ciclo de vida (Rangel-Aldao y col., 1986). La interacción e internalización del parásito en la célula hospedadora son fenómenos multifactoriales y no bien conocidos, en los que resulta esencial el establecimiento de estrechas interacciones entre las membranas de ambas células que finalmente llegan a fusionarse (N. Andrews). Recordaremos que *T. cruzi* tiene la peculiaridad como otros tripanosomátidos de adaptarse a ambientes muy diferentes. Desarrolla varios mecanismos de protección tanto pasiva como activa con el fin de sobrevivir a las distintas condiciones que presentan las células hospedadoras. *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado, debe entrar en la célula hospedadora para dividirse y como se ha comentado tiene la capacidad de invadir un amplio rango de células, tanto fagocíticas como no fagocíticas. *T. cruzi* es capaz de invadir células esencialmente no fagocíticas, tales como fibroblastos, en un proceso que consta de dos fases: una primera fase de adhesión y otra posterior de internalización activa en el interior de la célula parasitada (Van Voorhis y col., 1989). Hay claras evidencias de la existencia de receptores específicos para moléculas del parásito en la membrana de la célula diana (Araujo-Jorge, 1989). Las glicoproteínas de superficie juegan un papel relevante en los procesos infectivos (Gazzinelli y col., 1990; Villalta y col., 1998), pero se desconoce en gran medida la regulación de su expresión génica, así como los mecanismos de respuesta inmunológica a las mismas.

3.2. Proteínas antigénicas de *T. cruzi*.

La existencia de actividad neuroaminidasa en la superficie del parásito (Villalta y col., 1999; Melo Coutinho y col., 1998; Soeiro y col., 1999) y la presencia en la membrana del macrófago de proteínas de unión a azúcares (lectinas) (Soeiro y col., 2000; Piras y col., 1983), que podrían ser receptores para glicoproteínas (Galactosamina, N-acetilgalactosamina) de membrana de *T. cruzi*, hacen pensar en un mecanismo de infección parecido al propuesto para el virus Influenza (Prioli y col., 1991). También se ha propuesto un modelo de interacción parásito-célula hospedadora a través de fibronectina y colágeno (Prioli y col., 1992), donde parece estar involucrada una glicoproteína de superficie de 85 kDa de *T. cruzi* (Pellegrin y col., 1992). Anticuerpos monoclonales contra esta proteína inhiben entre un 50% y un 90% la internalización del parásito en la célula hospedadora, detectándose una respuesta heterogénea frente a distintas cepas y clones del parásito. También se ha implicado a este antígeno de 85 kDa en la resistencia a lisis por complemento de los tripomastigotes, actuando como factor inactivador de la C3 convertasa o acelerador de la degradación de la misma (Souto-Padron y col., 1993). Actualmente se conoce que existe una superfamilia de proteínas de superficie de 85 kDa y se han descrito más de 100 genes que codifican para estas proteínas, con homologías de secuencia entre ellas del 70 y al 80% (Millar y col., 1999). En el parásito se expresan simultáneamente diferentes miembros de la superfamilia de trans-sialidasas y se ha descrito que al menos algunas de ellas son antígenos dominantes de células T, capaces de inducir una fuerte estimulación de células CD4⁺ productoras de IFN- γ que confieren protección. Así, se sugiere que durante la infección por *T. cruzi* la respuesta CD4 frente a la superfamilia de las proteínas trans-sialidasas podría ser crítica para la inducción de una respuesta protectora (Millar y Kahn, 2000).

Otro antígeno relacionado es el denominado SAPA (Shed acute phase antigen). Se trata de una familia de varios genes que se expresan fundamentalmente en el estadio de tripomastigote (Affranchino y col., 1989). Este antígeno SAPA se caracteriza por poseer en su secuencia de aminoácidos un extremo carboxilo terminal con un número variable de unidades de repetición de 12 residuos. La región amino terminal contiene cuatro bloques enriquecidos en ácido aspártico con una clara homología con sialidasas

bacterianas y virales. Esta proteína, además de presentar actividad sialidasa, posee también actividad trans-sialidasa que parece ser la responsable de la sialidación de Ssp-3, una estructura que es requerida por *T. cruzi* para el anclaje de los tripomastigotes a la célula hospedadora (Souto-Padron y col., 1989a). Se ha descrito también que durante la infección natural y experimental por *T. cruzi* se produce una fuerte respuesta inmune frente a este antígeno de la superficie de los tripomastigotes (Fouts y col., 1991). Asimismo, se ha mostrado que la proteína TSA, miembro de la familia de las sialidasas, es reconocida por CTL inducidos en el sistema murino (Low y Tarleton, 1997), así como por CTL CD8⁺ específicos humanos (Wizel y col., 1998a). Además, la inmunización con plásmidos DNA que contienen el gen que codifica esta proteína TSA, induce protección frente a la infección letal murina por *T. cruzi* (Wizel y col., 1998b).

Con esta idea también se han ensayado dos proteínas de la superficie del amastigote (ASP) y se ha podido comprobar que ambas (ASP-1 y ASP-2) resultan ser dianas para los CTLs generados in vivo por la infección con *T. cruzi* en un modelo murino, la respuesta frente a ambas es péptido específica, restringida por MHC de clase I y dependiente de CD8 (Low, H.P., 1998).

Por otra parte, el ácido siálico presente en la superficie de los tripomastigotes contribuye a su resistencia al sistema del complemento. Los tripomastigotes no sintetizan ácido siálico, pero pueden sializar su superficie captándolo de donantes glicoconjugados presentes en el suero y otras proteínas de membrana de las células del huésped. En este proceso está implicada una trans-sialidasa asociada a membrana. (Schenkman, S y col 1991). El ácido siálico es un importante determinante de virulencia de muchos microorganismos patógenos, por su habilidad para activar una ruta alternativa del complemento en la que se une el factor H favoreciéndose la unión de C3b. Esta unión factor H-C3b provoca la ruptura de C3b lo que impide la unión de la C3 convertasa, necesaria en la cascada del complemento. Se ha podido comprobar que si se priva a los tripomastigotes de ácido siálico estos incrementan su susceptibilidad a la lisis por el complemento. En contraste a lo que ocurre en los tripomastigotes, las formas amastigotes resisten a este mecanismo de lisis porque si bien se activa la ruta alternativa del complemento, son capaces de resistir esta lisis inhibiendo la formación del complejo de ataque a membrana (MAC o C5b-9) en su membrana. (Tomlinson y col, 1998).

Otro antígeno que ha sido ensayado como candidato para una posible vacuna, es la proteína reguladora del complemento o CRP. En un modelo murino

se ensayó la capacidad de esta proteína en forma de vacuna genética con resultados de protección en un 100% de los animales inmunizados (Sepúlveda , P. 2000). Esta proteína ha sido descrita como factor de virulencia, permitiendo al parásito escapar a la lisis por el sistema del complemento de su hospedador (Norris, K.A. , 1998). Se trata de una glicoproteína que se une de forma no covalente a las proteínas C3b y C4b de las rutas clásicas y alternativa respectivamente. Su expresión regulada por la diferenciación, siendo expresada en la conversión de epimastigotes (sensibles a la lisis por el sistema del complemento) a la forma tripomastigote (resistente a esta lisis). Es interesante comentar que en sueros de pacientes chagásicos se han detectado anticuerpos que bloquean su actividad (Norris, K, 1999).

El antígeno TcMP es una proteína de la membrana de *T. cruzi* (*T. cruzi* membrane protein) que estaría participando directamente en los procesos de infección del parásito a la célula hospedadora (Martín y col., 1997). Ensayos *in vitro*, con anticuerpos frente al epítipo TcMe contenido en esta proteína, muestran la inhibición de la infección del parásito en fibroblastos LLC-MK2, debido a un bloqueo en el mecanismo de entrada a la célula (Martín y col., 1997).

Así mismo la proteína de 11 kDa denominada *kinetoplastid membrane protein* (KMP11), la cual es específica de kinetoplastidos es otro antígeno relevante de estos parásitos. La proteína KMP11 fue descrita por primera vez en *L. donovani* asociada a moléculas de lipofosfoglicano (LPG) ligadas a la membrana del parásito. El gen codificante para la KMP11 de *T. cruzi* está organizado en una agrupación formada por cuatro unidades génicas colocadas en tándem y localizadas en un cromosoma de 1'9 Mb (Thomas y col., 2000). La síntesis de KMP11 de *T. cruzi* está regulada a nivel de traducción, apareciendo principalmente asociada con el citoesqueleto del parásito y especialmente en la cavidad flagelar (Thomas y col., 2000), estructuras claves en la movilidad del parásito y en el proceso de invasión en la célula huésped. Además, la amplia distribución de la proteína KMP11 en kinetoplastidos junto con su alto grado de conservación, sugieren que pueda jugar un papel importante en la biología de estos parásitos. En el laboratorio se llevaron a cabo estudios de inmunización con esta proteína en forma de vacuna genética y se pudo comprobar que tanto aislada como fusionada al gen de la HSP70 era

capaz de inducir una respuesta protectora frente a la infección (Planelles y col., 2001). Por otra parte, la proteína homóloga de *Leishmania* ha mostrado ser un potente inductor de respuesta inmune celular y se postula que podría jugar un papel relevante en el desarrollo de inmunidad protectora (Toston y col., 1994; Jensen y col., 1998). En el laboratorio se llevaron a cabo estudios de inmunización con esta proteína en forma de vacuna genética y se pudo comprobar que tanto aislada como fusionada al gen de la HSP70 era capaz de inducir una respuesta protectora frente a la infección (Planelles y col., 2001).

Otro antígeno que ha sido empleado con éxito en un modelo murino y en forma de vacuna genética es la proteína LYT1 (Fralish, B. H. 2003, (21) 3070-3080). Esta proteína parece estar implicada en el proceso de infección y lisis de la célula hospedadora (González, A. 2001).

3.3.- Proteínas paraflagelares (PARs)

En esta línea de uso de antígenos del propio parásito con posibles fines terapéuticos o inmunoproliféricos también se encuentran las proteínas PARs. Estas proteínas se localizan de forma exclusiva en el flagelo del parásito en una estructura única de Kinetoplastidos, Euglenoides y Dinoflagelados (Maga, J.A. y col., 1999). Esta estructura conocida como PAR o PFR (del inglés *paraflagellar* o *paraxial rod*) se sitúa a lo largo del flagelo sobre una de las caras del axonema (Fig 3.A). Centrándonos en tripanosomátidos se han descrito dos principales familias de genes con elevados porcentajes de homología intra-familia y también bastante conservadas inter-familia. Estas dos principales familias al parecer podrían provenir de un fenómeno de duplicación génica (Maga, J.A. 1999). La ausencia de esta estructura en géneros como *Critidia* podría apuntar una evolución diferencial del flagelo en *Trypanosoma* y *Leishmania*.

En función de sus pesos moleculares estas proteínas se han agrupado en 2 subfamilias (Figura 3.B) con distinta nomenclatura dependiendo del organismo; por ejemplo en *Leishmania* se denominan PFR1 y PFR2, en *T. brucei* se han nombrado como PFRA y PFRC. Las proteínas homólogas en *T. cruzi* se nombra como PAR2 y PAR3. Estas dos familias presentan pesos moleculares entre 68 y 72kD y los porcentajes de homología, en secuencia de aminoácidos están en torno al 80% entre los distintos miembros de una misma subfamilia y cerca del 60% interfamilia. Es interesante mencionar que

las regiones que exhiben mayor grado de divergencia entre los miembros de los dos grupos de PFRs, se localizan en los extremos amino y carboxilo de estas proteínas. A pesar de ser un conjunto de proteínas bastante heterogéneo en su secuencia de aminoácidos todas ellas parecen compartir características químicas y estructurales, como un punto isoeléctrico en torno a 5 y una estructura secundaria con un alto porcentaje en α -hélice y motivos lazo-hélice (Maga, J.A. 1999).

En *T. cruzi* se han descrito y caracterizado 4 proteínas PARs: PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4. Según sus homologías se han clasificado tanto PAR1 como PAR4 en dos nuevas familias, como miembros distantes de este grupo de genes. (Fig 3). En este caso concreto parece que existe una regulación homeostática de los niveles de RNAm. Además, se propone que estas proteínas pueden compartir algunos epítopes (Manning, J.E y col. 1998).

Aunque no se conoce con exactitud cómo se ensamblarían estas proteínas a lo largo de la estructura paraflagelar, en el caso de *T. brucei* se ha podido comprobar que PFR-A y PFR-C formarían heteropolímeros. PFR-A y PFR-C están cada una codificada por en dos *cluster* individuales, con una organización similar, conteniendo cada *cluster* cuatro copias en tandem del gen. La región 5' UTR del primer gen en cada cluster es idéntica mientras que la de la cuarta copia es distinta (Deflorin, J. 1994). Esta inusual organización permite la generación de RNAs mensajeros que contienen secuencias codificantes idénticas pero distintas regiones 5' y 3' no codificantes, lo cual podría estar implicado en la evolución del flagelo a lo largo del ciclo de vida del parásito.

El filamento paraflagelar (PFR) está formado por proteínas filamentosas que no se parecen a otras proteínas de citoesqueleto caracterizadas. Son exclusivas de Protistas y no se han encontrado en eucariotas superiores, lo que las convierte en un potencial blanco para drogas con actividad "tripanocida". Por otro lado las proteínas paraflagelares de Kinetoplastidos, Euglenoides y Dinoflagelados se ha comprobado que están inmunológicamente relacionadas. Además, es importante reseñar su alto grado de conservación entre tripanosomátidos que divergieron hace más de 100 millones de años como es el caso de *T. brucei* y *T. cruzi* (Machado, C.A. y Ayala, F.J. 2001) y también entre éstos y *Leishmania*.

Dado el importante papel del flagelo para la movilidad e infección, el desarrollo de estrategias que interfieran con las funciones de estas proteínas en estos organismos, podría suponer una alternativa quimioterápica no sólo activa

contra el organismo en particular sino frente a un amplio rango de tripanosomátidos causantes de enfermedades que afectan al hombre. En este sentido se ha podido comprobar que estas proteínas resultan esenciales para la viabilidad de *T. brucei* (Bastin y col., 1998). También se han realizado ensayos de *knockout* en *L. mexicana*, que han mostrado que el gen homólogo a la PAR2 de *T. cruzi* juega un papel crítico en la movilidad y supervivencia del parásito *Leishmania* (Santrich y col., 1997).

Wrightsmann y col. (1995) ya describieron la inducción de inmunidad protectora frente a *T. cruzi*, en ratones inmunizados con estas proteínas PAR purificadas de la fracción flagelar del parásito, sugiriéndose que tal efecto estaría principalmente mediado por una respuesta celular (Wrightsmann y Manning, 2000). Estos mismo autores han podido comprobar que en infección experimental (modelo murino) se generan linfocitos T CD8+ frente a determinados epítopes de estas proteínas aunque no han podido demostrar la capacidad citolítica de los mismos (Wrightsmann Parasite Immunology, 2002, 224, 401-412)

La idea de utilizar “el flagelo” como posible vía para generar una respuesta protectora frente a *T. cruzi* ya fue ensayada en 1976 por Segura y colaboradores, con resultados satisfactorios (100% de supervivencia). (Segura et al., 1976)

Muy recientemente y durante la escritura de esta tesis se ha publicado un trabajo en el que se muestra que la administración de al menos 3 de estas cuatro proteínas PARs como proteínas recombinantes, en ratones genera una respuesta inmune protectora frente al reto con formas infectivas del parásito. En este ensayo utilizando estas proteínas como inmunógenos se tuvo que emplear hidróxido de aluminio junto con IL-12 recombinante como adyuvante para obtener inmunidad protectora desconociéndose su capacidad inmunoprolifáctica como moléculas individuales, sin adyuvantes (Lahrs, y col 2003).

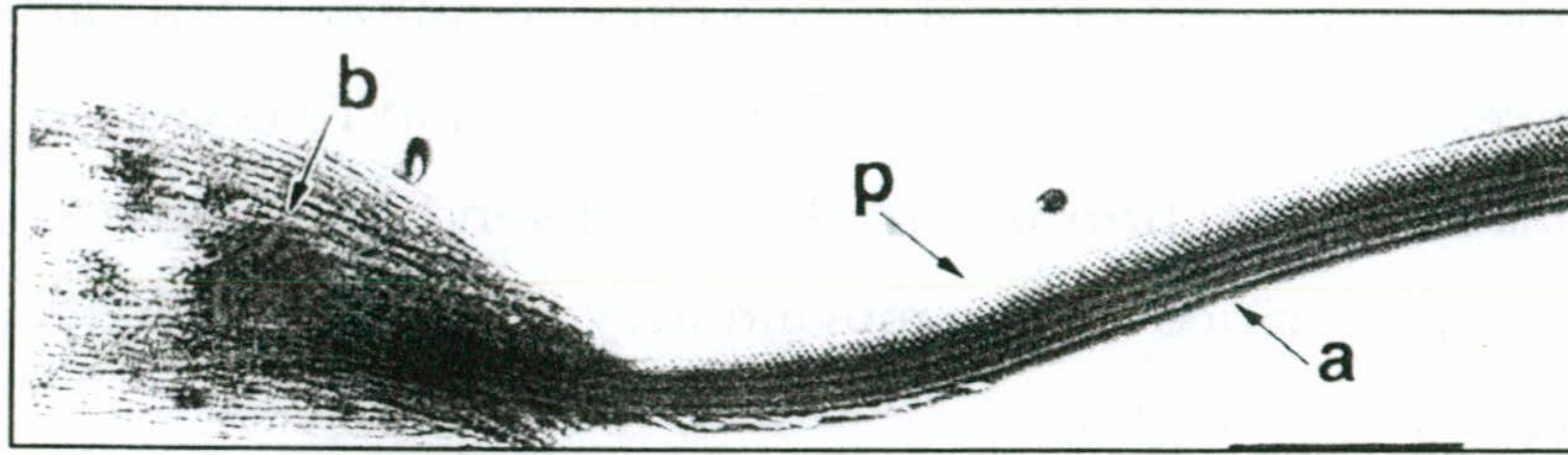


Figura 3.A.- Esquema de la estructura PFR (**p**) presente en el flagelo de tripanosomátidos. Como muestra la micrografía se encuentra anclada al axonema (**a**) a lo largo de una de sus caras.

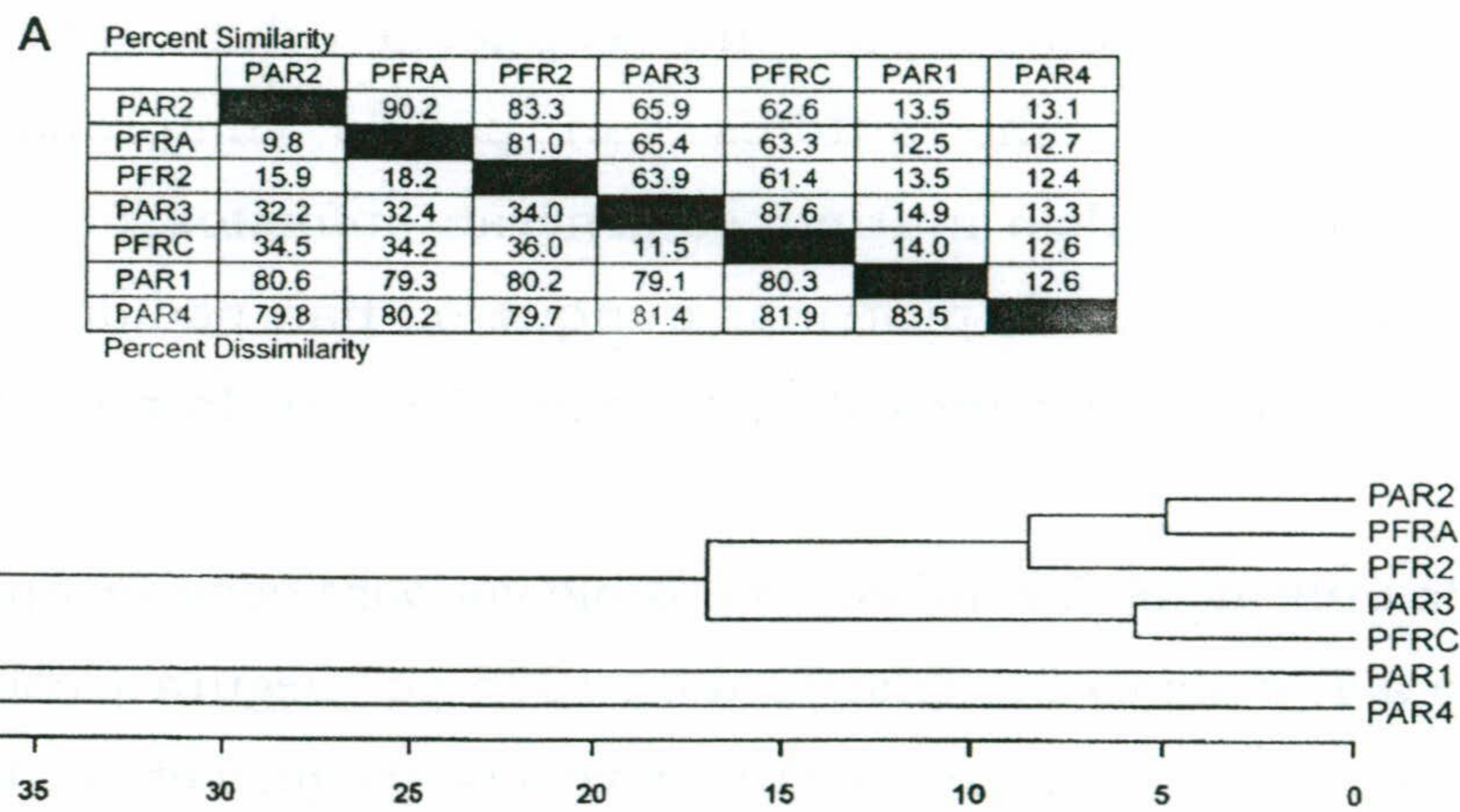


Figura 3.B.-(A) Cuadro de porcentaje de homología en secuencia de aminoácidos entre las distintas proteínas PARs de Tripanosomátidos descritas hasta la fecha. (B) Arbol filogenético de las proteínas PARs. Obsérvese que tanto PAR1 como PAR4 de *T. cruzi* son miembros distantes de esta familia multigénica

4.- Modelos experimentales de infección.

La infección de ratones con *T. cruzi* ha sido ampliamente utilizada como modelo experimental para la enfermedad de Chagas. Los ratones al igual que el hombre, desarrollan una parasitemia detectable durante la fase aguda, seguida por un parasitismo crónico de tejidos análogos (músculo y epitelio intestinal). Diferentes cepas de ratones exhiben distintos patrones de susceptibilidad durante el curso de la infección (Zhang y col., 1996). Ratones BALB/c (H-2 K^d, D^d, A^d, E^d) son relativamente susceptibles a la infección por *T. cruzi*, presentando elevadas parasitemias que conducen a la muerte en una

gran proporción de animales (Tanowitz y col., 1981; Nogueira y col., 1981; Wrightsman y col., 1982; Andrade y col., 1985). En comparación, ratones de la cepa C57BL/6 (H-2 K^b, D^b, A^b, E^b) son más resistentes cuando se enfrentan a la misma infección por *T. cruzi* (Trischmann, 1986; Rowland y col., 1984; Murfin y col., 1985). Con objeto de estudiar las diferencias entre ambas cepas se realizó un estudio de la respuesta generada tras la infección con *T. cruzi*. Se pudo comprobar que en ratones de la cepa BALB/c (haplotipo H2-Kd) se ve disminuida la expresión de moléculas de coestimulación como CD86 y CD40, en macrófagos y células dendríticas de bazo, fenómeno que no sucedió en los ratones de la cepa C57BL/6. También pudimos comprobar la existencia de diferencias en el patrón de citoquinas secretadas por células CD3⁺, siendo IL2 e TNF- α las principales en el caso de C57/BL 6 y la IL-4 e IL-5 las que se veían aumentadas en la cepa BALB/c (Planelles, L. y col.2003). Se ha demostrado que los patrones de susceptibilidad o resistencia son determinados por más factores genéticos además del haplotipo H-2 (Trischmann y col., 1978; Wrightsman y col., 1984). Además de la cepa de ratón, hay que considerar también otros parámetros que influirán en el desarrollo de la infección y patología, tales como la cepa del parásito utilizada para infectar (Kierszenbaum y col., 1989), la procedencia de la misma (cultivos o procedentes de animales infectados), la dosis inoculada o la vía de inoculación.

Aunque el sistema murino es sin duda el más utilizado y el que ha proporcionado mayor información sobre la infección y la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas, también se han empleado otros modelos animales. Por ejemplo, el primate no humano *Cebus apella* se ha desarrollado como modelo experimental para la patología chagásica crónica (Falasca y col., 1986; Rosner y col., 1989; Malchiodi y col., 1993). Presenta entre sus características una parasitemia detectable por los métodos convencionales y que se mantiene un tiempo largo post-infección (Falasca y col., 1986); los animales infectados con *T. cruzi* evolucionan a través de las fases clínicas similares a las descritas para humanos, detectándose en la fase crónica alteraciones electrocardiográficas, fallos cardíacos y complicaciones gastrointestinales (Rosner y col., 1989; Lima y col., 1986). Además las lesiones se desarrollan en un período de tiempo relativamente corto. Por todo ello, los estudios realizados utilizando este modelo (*C. apella*), van encaminados principalmente al análisis

de la infección por *T. cruzi* y de la respuesta inmunológica del huésped en la fase crónica de la enfermedad (Samudio y col., 1999).

Otro modelo animal que ha servido para estudiar la inmunopatología de la enfermedad de Chagas es el modelo canino (de Lana y col., 1992; Andrade, 1999). Normalmente los perros desarrollan una fase aguda severa cuando son infectados natural o experimentalmente con *T. cruzi* (Andrade, 1984), a la que sigue un período de latencia que puede prolongarse durante toda la vida. Eventualmente, se desarrolla la fase crónica con miocarditis, cardiomegalia o arritmias (Anselmi y col., 1966; Laranja y col., 1980). Las lesiones en otros órganos han sido poco exploradas y la mayoría de los trabajos se centran en la patología del corazón (Meurs y col., 1998; Andrade y col., 1997; Zhang y col., 1999; Barr, 1993)

5.-Vacunas genéticas.

El concepto de vacunación apareció hace unos 200 años cuando Jenner mostró que la exposición al virus *vaccinia* podía prevenir la infección de la viruela. En el último siglo se han conseguido vacunas frente a distintas enfermedades infecciosas, lo que ha supuesto un gran triunfo para la Medicina.

El uso del DNA en vacunas es una nueva estrategia utilizada para inducir una respuesta a un antígeno proteico expresado *in vivo*. Estas vacunas, llamadas de tercera generación, están basadas en la introducción por distintas vías, como inyección intramuscular, bombardeo con partículas de oro ("gene gun" o pistola de genes) o aerosoles, de un plásmido de DNA purificado que codifica para una secuencia polipeptídica de un determinado antígeno. Este tipo de vacunas presenta una serie de ventajas respecto a las vacunas proteicas clásicas como son:

- menor coste
- mayor estabilidad
- plasticidad, con posibilidad de combinar distintos antígenos o incluir moléculas de coestimulación en estos plásmidos
- mayor especificidad

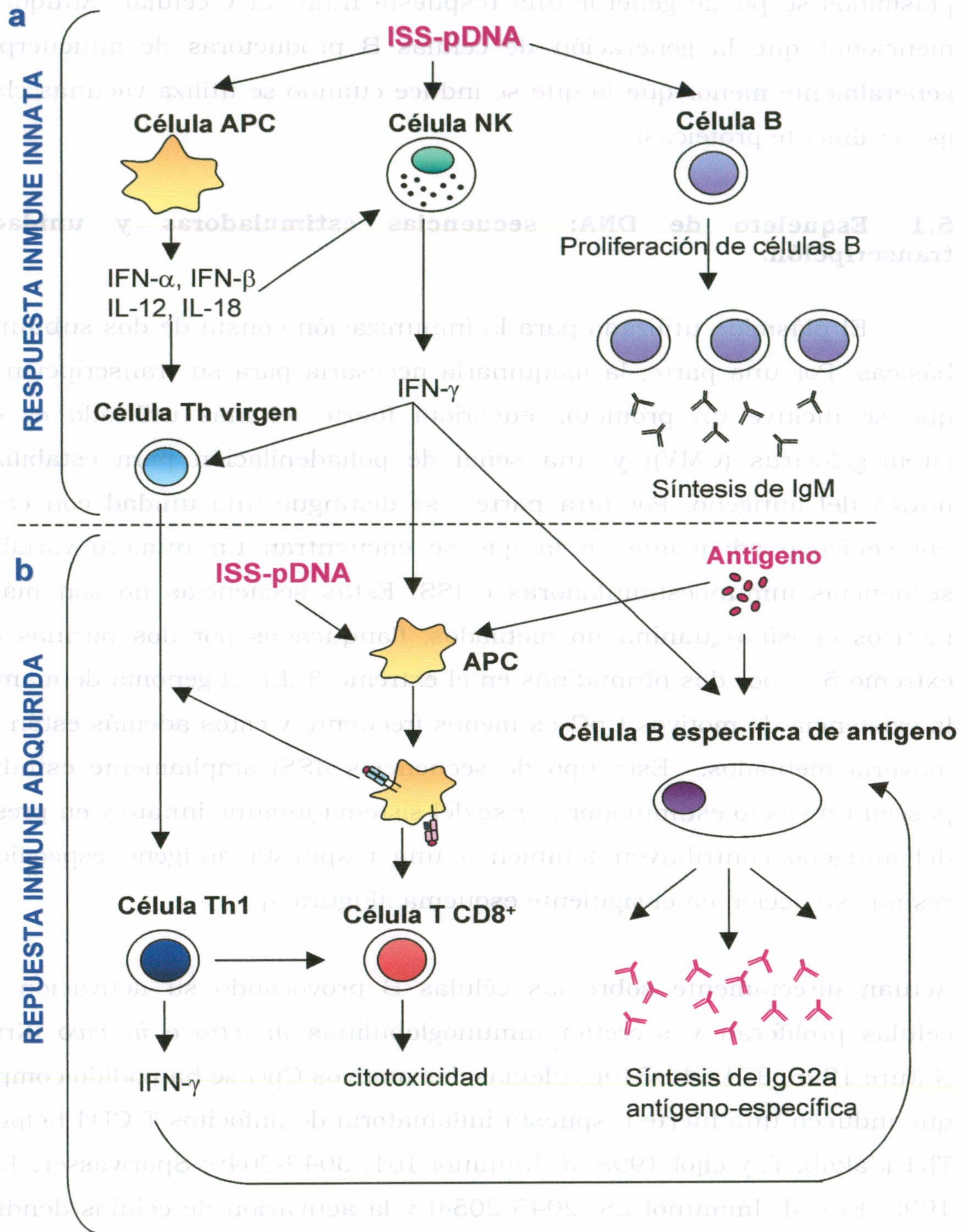
La efectividad de las vacunas de DNA ha sido demostrada en distintos modelos animales y así se ha podido comprobar que utilizando estos

plásmidos se puede generar una respuesta humoral y celular. Aunque cabe mencionar que la generación de células B productoras de anticuerpos es generalmente menor que la que se induce cuando se utiliza vacunas clásicas (generalmente proteicas)

5.1- Esqueleto de DNA: secuencias estimuladoras y unidad de transcripción.

El plásmido utilizado para la inmunización consta de dos subunidades básicas. Por una parte, la maquinaria necesaria para su transcripción en la que se incluye un promotor eucariota fuerte (el más utilizado es el del citomegalovirus (CMV)) y una señal de poliadenilación para estabilizar el mRNA del antígeno. Por otra parte, se distingue una unidad con carácter mitogénico o adyuvante en la que se encuentran un número variable de secuencias inmunoestimuladoras ó ISS. Estas secuencias no son más que motivos citosina-guanina no metilados, flanqueados por dos purinas en su extremo 5' y por dos pirimidinas en el extremo 3'. En el genoma de mamíferos la existencia de motivos CpG es menos frecuente y estos además están en su mayoría metilados. Este tipo de secuencias (ISS) ampliamente estudiadas, poseen un efecto estimulador *per se* del sistema inmune innato y en presencia del antígeno contribuyen también a una respuesta antígeno específica. Se resume su acción en el siguiente esquema. (Figura 4)

Actúan directamente sobre las células B provocando su activación, estas células proliferan y secretan inmunoglobulinas *in vitro* e *in vivo* (Krieg A, Nature 1995, 374 546-549). Además, los motivos CpG se ha podido comprobar que inducen una fuerte respuesta inflamatoria de linfocitos T CD4 helper tipo Th1 (Jakob, T, y col 1998, J. Immunol 161, 3042-3049; Sparwasser, T. y col 1998, Eur. J. Immunol 28, 2045-2054) y la activación de células dendríticas Hartnabbbm G y col. 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96,9305-9310; Häker y col , 1999, EMBO J., 18; 6973-6982)



Recientemente se ha propuesto la existencia de un receptor para estos motivos CpG, al menos en células dendríticas y en macrófagos (TLR 9) (Hemmi H. Y col Nature, 2000 vol 408,740-745). Además se ha podido comprobar que el extremo 5' de estas secuencias debe estar accesible, para el reconocimiento por el receptor y la consecuente activación del sistema inmune. Esta actividad se ve inhibida si este extremo queda bloqueado mediante la unión por ejemplo,

de dos motivos CpG consecutivos unidos por sus extremos 5'-5'. Un efecto similar, de inhibición se produce si se forman estructuras secundarias tipo *loops de hairpin* o dímeros terminales. Este tipo de estructuras secundarias afectan significativamente a su capacidad adyuvante cuando se forman en 5' y no así si lo hacen en 3'. Esto sugiere que de alguna manera el receptor responsable de la estimulación inmune "lee" la secuencia de DNA desde el extremo 3'. Se han realizado numerosas aproximaciones con objeto de aumentar la efectividad de este tipo de vacunas. Entre estos estudios se incluyen la adición de moléculas diana que dirijan el antígeno a lugares concretos como órganos linfoides o directamente a la célula presentadora (Lew A., 2000). Otra posibilidad es coexpresar junto al antígeno de interés otras moléculas implicadas en la estimulación y/o modulación de una respuesta inmune antígeno específica, como son las citoquinas, quimioquinas o las moléculas de coestimulación (Kim y col., 1997; Chow y col., 1998; Flo y col., 2000).

5.1.1.- Optimización del vector

Como alternativa recientemente también se plantea la importancia del promotor de estos vectores en el tipo de respuesta que se obtiene. En este sentido también se ha intentado correlacionar la fuerza del promotor empleado y la magnitud de la respuesta generada frente a determinado antígeno, por citar algún ejemplo, este año se ha publicado un estudio con un antígeno de superficie de el virus de la hepatitis B. Se plantea la importancia de las secuencias 3' UTR. Estas secuencias no traducidas al estabilizar el mensajero del antígeno codificado por el plásmido, pueden tener un papel en la respuesta al antígeno, es decir, cuanto mayor sea la estabilidad de este mensajero, mayor será la expresión del antígeno y de alguna manera mayor será la respuesta. Concretamente utilizan 3 secuencias 3' UTR distintas para el mismo gen: la del propio virus, la de la hormona de crecimiento bovina y la de la β -globina de conejo. Comprueban así que esta región tiene un importante papel en la expresión del antígeno que se ve reflejada en la respuesta generada (Zinckgraf, J.W., 2003, *Vaccine*; Apr 2;21(15):1640-9).

En HIV por ejemplo, se ha explorado la hipótesis de que el uso de determinados codones, puede potenciar la expresión de los genes codificados en los plásmidos empleados en vacunación. Así se ha comprobado que

utilizando el gen GAG pero cambiando un codon (*syngag*) se ve potenciada la expresión *in vitro* del gen en mamíferos. Cuando esta nueva forma se administró como vacuna genética se comprobó que la respuesta era mayor que la obtenida con el gen salvaje, y al parecer resultaba independiente de la vía de administración empleada. Además pudieron comprobar que incluso existía una respuesta celular que no se había observado utilizando el gen original (Bojak, A. Intervirology 2002; 45 (4-6):275-86).

5.2.- Vías de administración:

Otro factor que hay que considerar es la vía de administración. Desde que se comenzaron a utilizar este tipo de vacunas hace más de una década hasta nuestros días, se han realizado numerosos estudios y con muy distintos antígenos. Básicamente existen 3 formas de administrar estas vacunas genéticas:

- Intramuscular
- Intradérmica
- Intranasal

En general lo que se ha podido comprobar es que para un mismo antígeno la respuesta generada es distinta dependiendo de la vía de administración empleada. La ruta de administración también tiene implicaciones en la duración de la respuesta que se genera. En este mismo año se ha llevado a cabo un interesante estudio comparativo de las rutas intradérmica ("gene gun") e intramuscular. Para un mismo antígeno no sólo varía la magnitud de la respuesta, también su duración. Empleando en este caso la proteína verde, que permite un seguimiento de los genes, estos autores pudieron comprobar que si bien mediante la inyección intradérmica se obtenían las mayores respuestas tanto de anticuerpos como de linfocitos T citotóxicos (en tan sólo 1 semana tras la última inmunización), esta respuesta se veía claramente disminuida transcurridas 4 semanas. Sin embargo, 5 semanas tras la inmunización, los ratones que habían sido inoculados vía intramuscular exhibían una respuesta mayor que los inoculados intradérmicamente, que aunque era de una magnitud similar a la que se había observado en los ratones inyectados intradérmicamente en sólo una semana, esta respuesta era mantenida. A pesar de todas estas diferencias no existía cambio en el tipo de anticuerpos generados.

5.3.- Presentación de antígenos tras la vacunación genética.

Realmente aunque el mecanismo de acción de las vacunas genéticas no está totalmente elucidado sí que se están haciendo ensayos para ver cómo funcionan. Partimos de un plásmido que de alguna forma llega a ver el sistema inmune, pero ¿cómo ocurre esto?. Como se ha comentado en el apartado anterior existen distintas vías para administrar estos plásmidos. Nos basaremos en las más empleadas, intradérmica e intramuscular. En el primer caso el DNA plasmídico tras ser inyectado, atravesando la dermis encuentra las células de Langerhgas. Parece evidente que sean estas células presentadoras de antígeno las encargadas de procesar ese DNA y exponer en superficie los péptidos resultantes del procesamiento.

Cuando se utiliza la inyección intramuscular el panorama es algo distinto. En músculo el número de células presentadoras es sin duda menor que en la piel. Aquí el tipo celular mayoritario son los miocitos. Se propone que los miocitos pueden ser transfectados directamente, tras la inyección, con este DNA, que tras ser procesado en su interior es presentado a las APC por un proceso conocido como “cross-priming”. Se han realizado numerosos estudios para corroborar esta teoría. *In vitro* se ha podido comprobar que los miocitos son capaces de transferir los antígenos a células presentadoras (cross-priming)

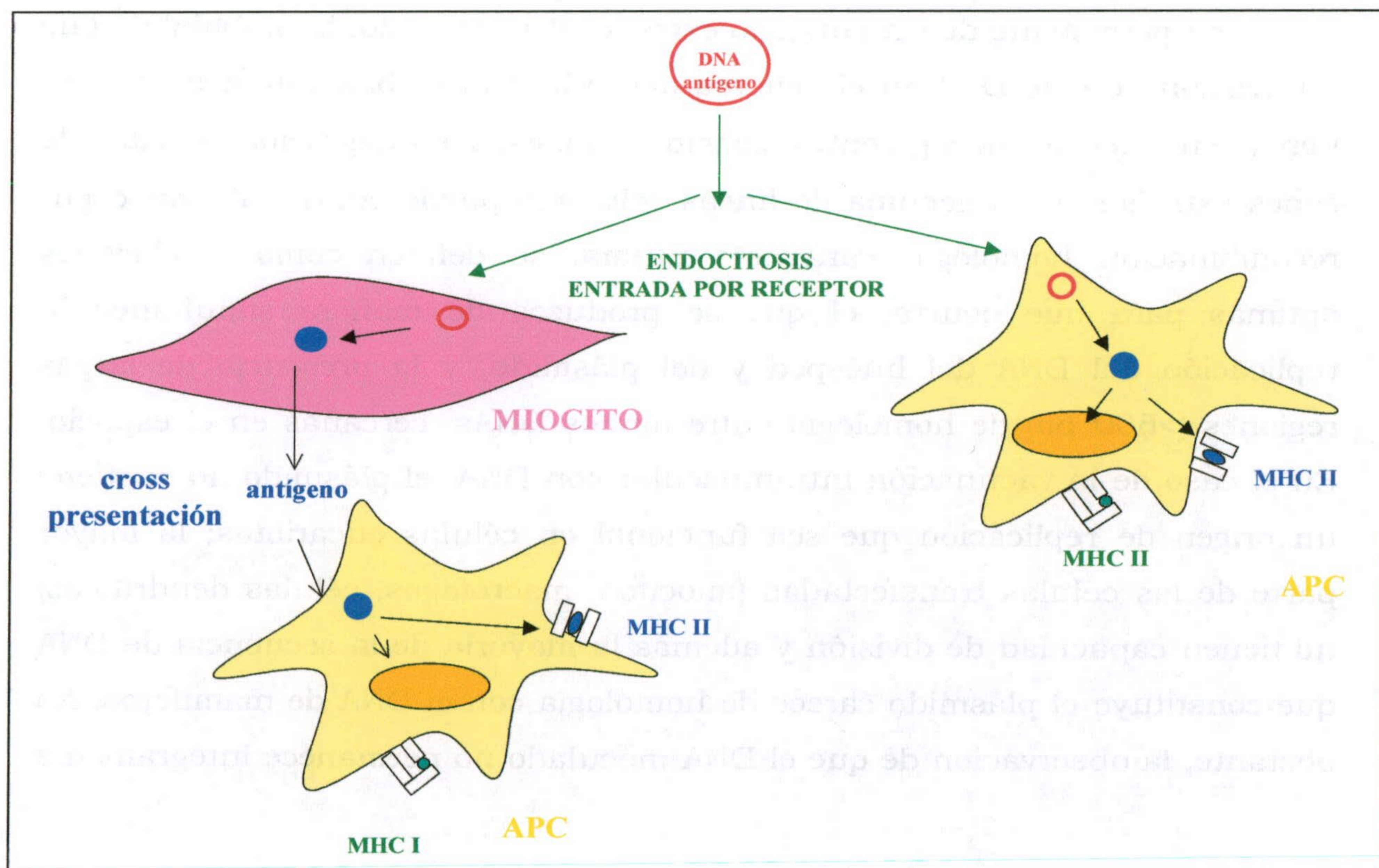


Fig 5.- Entrada del DNA plasmídico a las células presentadoras (APC) o a los miocitos. Las tres vías de entrada pueden ser transfección directa, entrada mediada por receptor o un proceso de endocitosis. Procesamiento intracelular del DNA y de la proteína resultante de su traducción, tras esta exposición en superficie de los péptidos antígenos en clase I o en clase II (moléculas MHC-I y MHC-II). También se incluye el proceso de "cross-presentación" que supone la transferencia del antígeno desde el miocito a una célula presentadora.

5.4.-Seguridad de las vacunas genéticas:

Una vez seleccionados los antígenos de interés y optimizado el vector surge una pregunta importante cuando se va a trabajar con vacunas genéticas: ¿son seguras?. No podemos olvidar que se trata de un DNA extraño que se introduce en un organismo y teóricamente existen ciertos riesgos. Hasta la fecha investigaciones con modelos animales han demostrado que las vacunas DNA son seguras. No se han observado respuestas inmunes perjudiciales como autoinmunidad o desarrollo de tolerancia en respuesta a la expresión persistente de un antígeno extraño. Por otro lado, la probabilidad de integración de este DNA en el genoma del individuo es bastante escasa si se tienen en cuenta las siguientes consideraciones. La integración *in vitro* de genes extraños en el genoma de líneas celulares puede ocurrir al azar o por recombinación homóloga. Para esta última, se definen como condiciones óptimas para que ocurra, el que se produzca de manera simultánea la replicación del DNA del huésped y del plásmido, y la presencia de largas regiones (>600 pb) de homología entre ambos DNAs, cercanas en el espacio. En el caso de la vacunación intramuscular con DNA, el plásmido no contiene un origen de replicación que sea funcional en células eucariotas; la mayor parte de las células transfectadas (miocitos, macrófagos, células dendríticas) no tienen capacidad de división y además la mayoría de la secuencia de DNA que constituye el plásmido carece de homología con el DNA de mamíferos. No obstante, la observación de que el DNA inoculado no permanece íntegramente

en el lugar de la inyección así como su presencia en núcleos celulares (Condon y col., 1996; Torres y col., 1997) no permite excluir de una forma definitiva la posibilidad de una integración.

Por otra parte, aunque la integración al azar puede ocurrir con una frecuencia entre 50 y 1000³ veces mayor que la recombinación homóloga, la amplia experiencia sobre las inmunizaciones que utilizan virus de DNA replicativos y vivos (por ejemplo, el adenovirus) no han revelado fenómenos adversos relacionados con la integración. Estudios directos sobre integración tras la inmunización intramuscular en ratones con un plásmido codificante de la nucleoproteína (NP) del virus influenza resultaron negativos (Nichols y col.,)

5.5.- Vacunas genéticas frente a *T.cruzi*.

Cabe mencionar como se comentó en el apartado anterior, que frente a *T. cruzi* se han ensayado con éxito las vacunas genéticas con antígenos como las transialidasas, proteína reguladora del complemento (CRP), la proteína KMP11, y la proteína LYT. La mayoría de ellos parecen estar implicados en la invasión de la célula hospedadora .

5.6.- Vacunas genéticas en enfermedades no infecciosas.

Debemos tener en cuenta que en el caso de enfermedades no infecciosas los planteamientos son algo distintos. En muchos casos no se trata de generar una respuesta frente a un patógeno sino de contrarrestar una respuesta desmesurada como en las alergias, o de controlar la respuesta inmune como en el cáncer.

Una vacuna diseñada para combatir una alergia necesita suprimir o alterar una respuesta inmune no deseada, mientras que una vacuna de DNA frente al cáncer pretenderá superar la tolerancia y/o supresión de esa respuesta inmune e iniciar una potente respuesta inmune. Por tanto se persiguen distintas estrategias que en definitiva pretenden mejorar la respuesta inmune en función de las necesidades y para ello se puede modificar el regimen de inmunización o bien emplear distintos adyuvantes. En el caso del cáncer, las aproximaciones más específicas que se están

empleando, persiguen la búsqueda de una activación de la respuesta inmune innata y adaptativa.

En el caso de las alergias, se suele emplear el gen que codifica el alérgeno, una modulación tipo Th1 y se asegura la seguridad de la vacuna mediante la fragmentación del gen por ubiquitinación o utilizando hipoalérgenos artificiales. Todas estas estrategias solas o combinadas están siendo analizadas en estos momentos.

5.7.- Mantenimiento de la respuesta.

Uno de los principales problemas que presentan este tipo de vacunas es su duración, es decir, resulta difícil mantener a largo plazo la respuesta inmune que se genera. Para ello se están haciendo numerosos esfuerzos utilizando fundamentalmente moléculas de coestimulación, bien incluidas en el mismo plásmido o en otro. Con esta estrategia se mejoran bastante los resultados aunque hoy por hoy aún está lejos su empleo generalizado. Entre estas opciones se pueden emplear proteínas de choque térmico, fusionadas al antígeno de interés.

Actualmente se están realizando ensayos clínicos en fase I y II con vacunas DNA para el VIH, la hepatitis B, hepatitis C, malaria o tuberculosis. También están en marcha para enfermedades como el cáncer o el tratamiento de las alergias. Cabe destacar que en estos ensayos clínicos, hasta la fecha no se han descrito fenómenos de integración del DNA plasmídico en el DNA del huésped.

6.- Proteínas de choque térmico. Capacidad adyuvante

Su descubrimiento se produjo de forma casual hace unos 50 años cuando de forma accidental alguien aumentó la temperatura de un incubador. Se pudo observar la presencia de unas estructuras conocidas como "puff" en los cromosomas de glándulas salivares de *Drosophila melanogaster*. Estas estructuras eran indicativas de *loci* transcripcionalmente activos (Ritossa

1962). Estos *loci* codificaban para las proteínas de choque térmico o HSP (*heat shock proteins*) y en los siguientes años se convirtieron en una interesante fuente de estudio para fenómenos tales como regulación transcripcional, respuesta a estrés e incluso estudios evolutivos.

La expresión de estas proteínas puede estar regulada no sólo por el aumento de temperatura, sino también por otros factores como la deprivación de glucosa, presencia de etanol o glucocorticoides. Por otro lado, estas proteínas aparecen también en niveles elevados bajo condiciones normales de la célula (Revisado en Lindquist and Craig, 1988)

Las proteínas de choque térmico son una gran familia en la que se incluyen miembros de muy distinto tamaño, con rangos de pesos moleculares que oscilan de los 6 a los 110 kDa; de hecho, existe una clasificación en función de estos pesos moleculares que las divide en un total de 6 familias: HSPs pequeñas, familia de 40, 60, 70, 90 y 100kDa. Es importante señalar que están altamente conservadas entre distintos organismos, con índices de identidad en secuencia de aminoácidos en torno al 50%. Por ejemplo la HSP 70 es una de las proteínas más conservadas que se conocen hasta la fecha.

Como se ha comentado anteriormente, estas proteínas son sintetizadas en situaciones de estrés permitiendo a la célula y en definitiva al organismo, alcanzar una situación de tolerancia ante las condiciones adversas. A pesar de ello, también cabe mencionar que estas proteínas tienen otras funciones celulares importantes en condiciones de no estrés. Así, asisten a el plegamiento correcto de otras proteínas y participan en el ensamblaje de subunidades proteicas, gracias a su actividad chaperona.

Aunque inicialmente y hoy día son ampliamente estudiadas por todas estas propiedades también tienen importantes funciones inmunológicas. Por citar algunas de estas características, podemos decir que algunas de las HSPs se han descrito como antígenos inmunodominantes, a pesar de su alto grado de conservación, un ejemplo es la HSP70 de *Mycobacterium*, aunque existen otros. Otra de sus funciones más estudiadas es su posibilidad de "primar" linfocitos T CD8 *in vivo*. Usando su capacidad de unión a péptidos las HSPs son capaces de adquirir material proteico antigénico, tanto del interior celular, como tras su administración exógena.

Ya en 1982 se pudo comprobar que las HSPs eran capaces de generar una potente respuesta antígeno específica (Srivastava 1982, P.K.). Aunque estos estudios fueron realizados con la gp96 pronto la lista de HSPs con esta

capacidad fue aumentando y se incluyeron otras HSPs como HSP90 (Ullrich y col 1986, Undono, 1993), la HSP70 (Undono, 1993), la calreticulina (CRT) (Basu, 1999) y más recientemente las HSP110 y la grp170 (Wang y col 2000). Desde estos primeros estudios hasta nuestros días, podemos concluir que las HSPs tienen importantes funciones inmunológicas, habiéndose implicado en cáncer, vacunación contra agentes infecciosos e inmunoterapia. (Anderson K:M: 2000 Immunol Letter (74) 35-39). De forma simplificada podemos decir que se les atribuye un papel central entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Srivastava Immunol. Letter 2000). Estos autores incluso proponen la liberación de las HSPs por parte de las células como evento primario para la activación de las cascadas innata y adaptativa. La liberación de complejos péptido-HSP por parte de las células podría ser la señal para que se active una respuesta del sistema inmunológico.

Por una parte se ha podido comprobar que las HSPs tienen un papel en la activación de la respuesta inmune innata, es decir, independiente del antígeno, desencadenando una serie de eventos que incluyen la producción de citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-12 o GM-CSF por parte de macrófagos, quimioquinas como MCP-1, MIP-2 y RANTES, por macrófagos y posiblemente por células T. Entre estos eventos también se incluye la inducción de la óxido nítrico sintetasa por macrófagos y células dendríticas (Panjwani N.N., 2002). Además, median en la maduración de células dendríticas, potenciando la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII) y moléculas de coestimulación como B 7.2 (CD80) y CD40, en células CD11+. (Revisado en Srivastava 2002, Ann. Rev. Immunol; 20: 395-425)

Las HSPs también intervienen en la migración de las células dendríticas desde el foco de infección a los nódulos linfáticos. Así, se ha demostrado que provocan la translocación de NF- $\kappa\beta$ al núcleo de macrófagos y células dendríticas, fenómeno que posiblemente media muchos de los citados anteriormente. (Basu, 2000).

Cabe mencionar que todas estas funciones atribuidas a las HSPs aún no se conocen con exactitud. No debemos olvidar que la mayoría de los estudios se realizan con proteínas purificadas en sistemas bacterianos, y esto hace que siempre exista la duda de la posible presencia de lipopolisacárido (LPS) en las preparaciones. El LPS tiene un claro efecto sobre el sistema de

inmunidad innata, se trata de una endotoxina por lo que puede ser responsable de muchos de los efectos comentados para las HSPs. De hecho el TLR4 descrito como receptor para el LPS se ha implicado en la vía de señalización por HSP60.

Por otro lado, en cuanto al papel de estas proteínas en la inmunidad adaptativa, respuestas antígeno específicas, ya en los años 50 se propuso que podían tener actividad antitumoral (Klein y col 1960, Cancer Res. 20:1561-72). Se ha podido comprobar que gp96, hsp90, hsp70, calreticulina, hsp110 y grp170, son proteínas de choque térmico que unen péptidos, apareciendo asociadas a epítopes antigénicos, de ahí su eficiencia antitumoral. Esta idea se extrapoló a células infectadas por virus y se comprobó que ocurría igual, con la gp96 en virus influenza, listeria o micobacterium.

También se ha comprobado que la administración exógena de HSPs (hsp70 y gp96) fusionadas a péptidos genera una respuesta de linfocitos T CD8+ (Blachere et al) aunque también la administración de péptidos fusionados a HSPs puede generar respuestas CD4+ restringidas a clase II. Estos efectos se producían con cantidades muy pequeñas de péptido, y además se pudo comprobar que estas funciones ejercidas por las HSPs fusionadas a los péptidos eran extremadamente sensibles a las funciones de las células presentadoras de antígeno. Esto llevó a pensar que debía existir un receptor para las HSPs y más tarde se pudo comprobar que así era. En el 2000 Binder y col (ref) describen el receptor CD91 de la β_2 -macroglobulina como receptor de la proteína gp96. Más tarde, en el 2001, Basu y colaboradores confirman que probablemente es también receptor de la hsp70, hsp90 y calreticulina. Sin embargo, existen pocas evidencias de que CD91 esté implicado en los fenómenos que desencadena la interacción entre HSP-APC independientes de antígeno. Algunos de estos procesos implican transducción de señales y no está claro que CD91 sea un receptor de señalización. Deben existir otros receptores en este caso. En este sentido se ha implicado a TLR4 (*toll like receptor* , receptor de LPS) en la ruta de señalización de hsp60 (Oashi K.y col., 2000). También se ha descrito el CD36 como receptor de gp96 (Panjwani N.N., 2000). De todas formas, hay que comentar que no está bien establecida la interacción física con TLR4 ó CD36, ni las vías de señalización. Cabe mencionar además que las HSPs también podrían interaccionar con otras células presentadoras como plaquetas, células NK o células T.

Otra de las funciones atribuidas a las HSPs es su posible papel en la señalización de muerte celular por necrosis.

La HSP70 además se ha descrito como una molécula con capacidad chaperona y como citoquina, a través de su interacción con CD40, estimulando la síntesis de TNF- α ó INF- γ , (Asea, A. 2000). Se ha empleado con éxito vacunas genéticas, fusionada al antígeno de interés. Gracias a su capacidad chaperona se propone que facilita la entrada del antígeno hacia la vía de procesamiento de clase I, lo que permite la generación de linfocitos T citotóxicos específicos frente a este antígeno, o mejor dicho frente a los péptidos antigénicos del mismo.

Materiales y métodos

Abstract of 2010/2011

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Productos químicos y material básico.

En general los reactivos que se han utilizado en la realización de esta tesis son principalmente de las firmas Merck, Sigma, Boehringer, Pharmacia, Promega, Stratagene, Gibco y Bio-Rad. Las membranas para la inmovilización de macromoléculas se obtienen de Bio-Rad y Millipore.

2. Tampones.

- Laemmli: Tris-ClH 50 mM pH 6'8, DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0'1%, Glicerol 10% (Laemmli, 1975).
- Tampón de carga 10x: glicerol 70% (v/v), sarcosil 5%, azul de bromofenol (BPB) 2% (p/v), xilano cianol 2% (P/V), EDTA 0'1 M pH 8.
- Tampón de electroforesis de proteínas 10x: Tris-base 30'3 g/l, glicina 144'2 g/l, SDS 10 g/l.
- Tampón de lisis de eritrocitos: NH_4Cl 0'15 M, KHCO_3 1 mM, EDTA 0'1 mM.
- Tampón de transferencia de proteínas 1x: Tris base 25 Mm, glicina 14'4 mM, metanol 15%.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,13 M, Na_2HPO_4 0,07 M, NaH_2PO_4 0,003 M pH 7,2.
- Tampón IHB : NaCl 0'14 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl_2 15 mM.
- Tampón SSC 20x : NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M pH 7'2.
- Tampón TAE 50x: Tris-HCl 2 M pH 7,2, EDTA 50 mM pH 8, bromuro de etidio 10 mg/ml, ácido acético hasta pH 7'2 y agua destilada hasta 1 l.
- Tampón TBE 10x : Tris-HCl 89 mM pH 8'3, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM.
- Tampón TBS 1x: Tris-ClH 10 mM, pH 7'5, NaCl 150 mM.
- Tampón TE : Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM.

- Tampon de lisis de células: 0'1 M Tris-HCl pH=8'0, 0'1% Triton X-100.
- Tampón de permeabilización de células: 0'02% Saponina en PBS 1x.

3. Soluciones.

- Mezcla clorofórmica: Cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1.
- Fenol :El fenol destilado se satura y equilibra con Tris-HCl 0,1 M pH 8. En el momento de utilizar se añade 8-hidroxiquinoleína hasta 0'1% y se almacena a 4°C.

4. Enzimas.

- Ribonucleasa pancreática o RNAsa A (Sigma).
- Deoxirribonucleasa de páncreas bovino (DNAsa I) (Sigma).
- Lisozima de clara de huevo (Sigma).
- Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer).
- ADN polimerasa I (fragmento Klenow) de *E. coli* (Boehringer).
- ADN ligasa del fago T4 (Boehringer).
- Polinucleótido kinasa del fago T4 (Boehringer).
- DNA Polimerasa de *Termus acuaticus* (Taq) (Boehringer).
- Proteína A-agarosa (Sigma).
- Proteínasa K (Boehringer).

Las enzimas de restricción empleadas son de las casas comerciales Boehringer, Promega y Pharmacia, principalmente.

5. Anticuerpos.

- Anti-mouse IgM acoplada a peroxidasa (Sigma).
- Anti-rabbit IgG acoplada a fosfatasa alcalina (Boehringer).
- Anti-mouse IgG acoplada a peroxidasa (Nordik).
- Anti-mouse IgG1 acoplada a peroxidasa (Nordik).
- Anti-mouse IgG2a acoplada a peroxidasa (Nordik).
- Anti-rabbit IgG acoplada a fosfatasa alcalina (Boehringer).
- Anti-mouse IgG+IgM-FITC (policlonal PharMingen).
- Anti-mouse IgG2a-FITC y -PE (clon R35-95, PharMingen).
- Anti-human Class I (clon W6/32). Sigma.
- Anti-mouse CD3 ϵ -FITC y -PE (clon 145-2C11, PharMingen).
- Anti-mouse CD4-FITC (clon GK1.5, PharMingen).
- Anti-mouse CD8-PE (clon 53-6.7, PharMingen).
- Anti-mouse IL-2-PE (clon S4B6, PharMingen).
- Anti-mouse IL-4-PE (clon BVD4-1D1, PharMingen).
- Anti-mouse IL-5-PE (clon, TRFK4, PharMingen).
- Anti-mouse IL-10-PE (clon JES5-16E3, PharMingen).
- Anti-mouse IL12-PE (clon 9A5, PharMingen).
- Anti-mouse IFN- γ -PE (clon XMG1.2, PharMingen).
- Anti-mouse TNF- α -PE (clon MP6-XT22, PharMingen).

6. Oligonucleótidos sintéticos.

Los estudios referentes a características termodinámicas y de estructura secundaria de oligonucleótidos se realizan con la ayuda del programa informático "Oligos 4". Los oligonucleótidos sintetizados son los siguientes:

- M13/pUC (-20): GTAAAACGACGGCCAGT
- M13 Reverse: GGAAACAGCTATGACCATG
- Intrón A: GGCGGTAGGGTATGTGTC

- P1BamH I 5': CTTGGATCCTTATGACGGTTTAC
- P1Xba I 3' : GTAGGTACCACTCCGGGCGCTG
- PAR1 5': CTTGGTACCTTATGACGGTTTA (*Kpn I* + ATG)
- PAR1 3': GTAGGTACCACTCCGGGCGCTG (*Kpn I*)
- P1TbBam5' : CAAGGATCCAAACATGATCGAGGTGCAAC
- P1TbXbaI3' :TCTCTAGAATTTGCCCTCTACCCACGACCG
- PAR2 5' : GCAAAGGTACCCAATGAGCTACAAGG
- PAR2 3' : CGTTGGTACCGCTGTGTGATCTGCTG

7. Péptidos sintéticos.

A partir de las secuencias de las proteínas PAR1 y PAR2 se diseñaron en principio 33 péptidos no solapantes con los que se cubría la secuencia completa de PAR1 y 30 péptidos no solapantes que igualmente cubrían la secuencia aminoacídica de PAR2 con una longitud media de 18 a 20 aminoácidos. (Fig1)

Asimismo y en base a los motivos definidos para la unión de péptidos a moléculas HLA de clase A2.1 (Rammensee y col., 1995) se sintetizaron 23 péptidos en el caso de la proteína PAR1 y 20 en el caso de PAR2, que contenían posibles motivos de unión A2 con una longitud de entre 10 y 12 aminoácidos cuya secuencia se detalla a continuación. (Fig 2)

PAR1

<u>MIVVYHEQFALVPPQYPRR</u> 18335	<u>AVQEAENHRALAALYELV</u> 18336	<u>ENAI ATAENYVAYTEGRL</u> 18337	<u>VPLSSRCSELLAASKELR</u> 18338
<u>ERYRHEAPCGWTEQKVMQH</u> 18339	<u>CEQEVTVEMAELLRPP</u> 18340	<u>LDVAGIRSILRTLQETRT</u> 18341	<u>QLPRGRFLLMRDNLKALK</u> 18342
<u>PHQPPDLARDLSDVCGAL</u> 18343	<u>YEIQYVDLMAELRAESEL</u> 18344	<u>DGERDKVQEKLDKDAIHL</u> 18345	<u>YERAVAKGDVVEVERAHR</u> 18346
<u>QLAARYEFVNACAKLMH</u> 18347	<u>QILGEDMASQESGFAAEM</u> 18348	<u>EALRRDA ADSISRFAEAL</u> 18349	<u>HERROAFRNDLHNCCKR</u> 18350
<u>LEEDGNHOKCLEVYNAEE</u> 18351	<u>RETAAQIQIVEQ KKKLV</u> 18352	<u>EELROKARELRDITLKOK</u> 18353	<u>EMVEAOVRAKRAEEERT</u> 18354
<u>AYNEFVNMEEQOKHRLLR</u> 18355	<u>CLAYFDGMEELTADLRSY</u> 18356	<u>VDEMVTIPQONLRQVLD</u> 18357	<u>QLNDIEAEVFMNAYGGFV</u> 18358
<u>SCCGELTVKKMHRDLTLE</u> 18359	<u>ROARLLEHN RDSAMESLD</u> 18360	<u>PNMSNYRLELDDIIEQMK</u> 18361	<u>GVSGVINALNATODAGEQ</u> 18362
<u>LFQSVKGVLAKEYERSGTP</u> 18363	<u>FVHPLOEYGIKSVEERN</u> 18364	<u>RFVDRSMHYVENEERKVL</u> 18365	<u>EKRNVLNRMROAVEEDEA</u> 18366
<u>ATESAIRNLNEEPAPEY*</u> 18367			

PAR2

<u>MSYKEASGAVGPADQQQP</u> 10932	<u>AVPEVTDVTLAARKQKIHNK</u> 10933	<u>LKTSCLSNEEFIQDLHVSDW</u> 10934	<u>SETQKQKLLAAHEKAQELLS</u> 10935
<u>SVEGGTKWNLTEAYDIKKLM</u> 10936	<u>RVCGLQLSVR ELYKPEDKPH</u> 10937	<u>FMEVVALKKTLLNELKQHHNK</u> 10938	<u>TRTVSFTGTI DNIAIAKLEKI</u> 10939
<u>EDELRRSQLDASEMAQVPVA</u> 10940	<u>VLKNLEECMNVTVVQTALLG</u> 10941	<u>NEEQIKAQLAAIEKAKEIRN</u> 10942	<u>VAIADGEMAI AEEQYYIKAQ</u> 10943
<u>LLEHLVELVA DKFRIIGQTE</u> 10944	<u>DENKPFGRIQDVQKKSQFET</u> 10945	<u>SAIKDAKRRLKQRCEDDLKN</u> 10946	<u>LHDAIQKADMEDAEAMKRFA</u> 10947
<u>TQKEKSEKFIQENLDRQDEA</u> 10948	<u>WRRIQELERVLQRLGTERFE</u> 10949	<u>EVKRRIEENDREEKRKVEYQ</u> 10950	<u>QFLDVCGQHKKLLELSVYNC</u> 10951
<u>DLAMRCIGMMEELVAEGCSA</u> 10952	<u>IKSRHDKTNEELGDLRLQVH</u> 10953	<u>QEYLEAFRRL YKTLGQLVYK</u> 10954	<u>KEKRLEEIDRNIRTTTHIQLE</u> 10955
<u>FAIETFDPNKXSDAKKEL</u> 10956	<u>YKLRAQVEEELMLKDKMAQ</u> 10957	<u>ALEMFGPTEDALNQAGIEFV</u> 10958	<u>HPAEVEEDGNLTRRSKMVEY</u> 10959
<u>RAHLAKQEEVKIAAEREELK</u> 10960	<u>RSKTLQSQYRGKTVQQITQ*</u> 10961		

Fig 6.-Secuencia aminoacídica de las proteínas PAR1 (superior) y PAR2 (parte inferior) y las series de péptidos sintetizados para cada una de ellas. Los péptidos PAR1 fueron sintetizados con histidina y glicina en ambos extremos con objeto de aumentar su estabilidad, por lo que la secuencia real de cada péptido sería la especificada y un par CG en cada extremo

PAR 1

MTVVYHEQFALVPPQYPRRAVQEAENHR 18397 18399
 ALAALYELVENAIATAENYVYAYTEGRLVPLSSRGSELLAASKELRRYRHEAPCGWYEQ
18396 18398
 KVMQHCEQEVTVEEMAELLRPPLDVAGIRSILRTLQETRTQLPRGRFLLMRDNL SALKPHQPPDLARDLARDLSDVCGALYEIQ
18400 18401
18404 18402
 YVDLMAELRAELS EL DGERDKVQEKLKDAIHL YERAVAKGDVVEVERAHRQLIAARYE FVNACAKLMHQILGEDMASQESGFA
18403 18405
 AEMEALRRDAADSISRFAEAL HERRQAFRN 18408 18409
18406 18407
 DLHNCDDKKRLEEDGNHQKCLEVYNAEERETA AQIGQIVEQKKLVEELRQKAREL
18411 18413
 RDITLKQKEMVEAQVRAKRAEEERVTA YNEFVNMEEQQKHRLLRCLAYFDGMEELTADLSY VDEMVTIPQQNLRQVLD
18410 18412
18415 18419
 QLNDIEAEVFMNAYGGFVSCCGELTVKMMHRLDTLERQARLLEHN RDSAMESLD PNMSNYRLELDDIIEQMKGVSQVINAL
18414 18416 18417 18418
18424
 NATQDAGEQLFQSVEKGV LAKYERSGTPFVHPLQEYGIKSVEERNR FVDRSMHYVENEERK VLEKRNVL NRMRQAVEEDEA
18421 18422 18423 18425
 ATESAIRNLNEEPAPEY*

PAR 2

MSYKEASGAVGPADQQQP AVPEVTDVTLAARKQKIHNLKKTSCLSNEEFIQDLHVSDWSETQKQKLLAAHEKAQELLS
12790 12815
12791 12794 12796
 SVEGGTKWNLTEA YDIKKLM RVCGLQLSVR ELYKPEDKPH FMEVVALKKTLNELKQHHNKTRTVSFTGTI DNAIAKLEKI
12792 12793 12795
12797 12799
 EDELRRSQLDASEMAQVPVA VLKNLEECMNVTVVQTALLGNEEQIKAQLAAIEKAKEIRNVAIADGEMAI AEEQYYIKAQ
12798 12800
12801
 LLEHLVELVA DKFRIIGQTEDENKPFGRIQDVQKKSQFQETSAIKDAKRRLKQRCEDDLKNLHDAIQKADMEDAEAMKRFA
12802 12803
 TQKEKSEKFIQENLDRQDEAWRRIQELERVLQRLGTERFEEVKRRIEENDREEKRKVEYQQFLDVCGQHKKLLELSVYNC
12805 12806 12808
 DLAMRCIGMMEELVAEGCSAIKSRHDKTNEELGDLRLQVHQEYLEAFRRLYKTLGQLVYK KEKRLLEEIDRNIRTTHIQLE
12804 12807 12809
12811 12813
 FAIETFDPNACKHSDAKKELYKLRAQVEEELEMLKDKMAQALEMFGPTEDALNQAGIEFVHPAEEVEDGNLTRRSKMVEY
12810 12812
 RAHLAKQEEVKIAAEREELKRSKTLQSQQYRGKTVQQITQ*
12814

Todos los péptidos se sintetizaron en el laboratorio del Dr. M. E. Patarroyo, utilizando la metodología de fase sólida (Merrifield, 1963) con las variaciones del sistema de síntesis múltiple en fase sólida (Houghten, 1985) y se purifican con éter etílico. La pureza se analiza por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna semipreparativa C18 en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo de 10-40%. Para verificar el proceso de síntesis se determina el tiempo de retención de cada péptido mediante HPLC utilizando como control un péptido de secuencia conocida. A continuación, la correcta síntesis de los péptidos se verifica mediante secuenciación automática utilizando un secuenciador en fase líquida Beckman 890M.

8. Medios de cultivo.

- Medio LB: Bactotripton 10 g/l (Sigma), extracto de levadura 5 g/l (Difco), NaCl 10 g/l, pH 7-7'2.
- Medio DMEM completo, para el cultivo de esplenocitos así como de las líneas celulares: Dulbeco's Modified Eagle Medium (Gibco) suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10% (Gibco), 50µM de β-mercaptoetanol (Sigma), 1 mM de piruvato sódico (Riedel-deHäen), 2 mM de Glutamina (Merck), 0'25 mM de asparragina (Merck), 0'5 mM de ácido aspártico, 150 U/ml de estreptomina (Merck) y 100 U/ml de penicilina (Laboratorios ERN) HEPES. En el caso de líneas celulares no se adiciona el hepes ni el piruvato.

9. Cepas bacterianas.

Todas las cepas bacterianas empleadas son de la especie *E. coli*:

- XL1-blue (Genotipo: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, F⁻proAB, Tn10(tet^R), LacI⁻ M15), para la transformación (Bullock y col, 1987) y propagación de los plásmidos.
- M15 (Nal^s Str^s rif^s lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺ pREP4) para la expresión de proteínas recombinantes.
- BL21

10. Cultivo de líneas celulares de mamífero.

Se ha trabajado con las siguientes líneas celulares:

- LLC-MK2: línea fibroblastoide de mono procedentes de riñón (Número ATCC CCL-7).
- COS-7: línea de fibroblastos de mono (Número ATCC
- Vero (Número ATCC
- EL4-A2/K^b: Procede de la línea EL4, linfoma T de la cepa C57BL/6 de ratón, de morfología linfoblastoide (Número ATCC TIB-39). En este caso, la línea está transfectada establemente con el gen quimérico HLA-A2/K^b, que contiene los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la molécula presentadora A2 humana, y el dominio $\alpha 3$ de la molécula H-2^b de ratón.
- Jurkat-A2/K^b: línea de timoma humano transfectada establemente con el gen quimérico HLA-A2/K^b.

Para todos los cultivos de las líneas celulares se utiliza el medio DMEM completo descrito en la sección "Materiales". Para el mantenimiento de las líneas transfectantes EL4-A2/K^b y Jurkat-A2/K^b el medio se suplementa con 500 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 (Gibco). Cada tres días el medio se renueva diluyendo el cultivo con medio fresco.

11. Cepas de ratones.

Los ratones de la cepa BALB/c (H2-K^d) y C57BL/6 (H2-K^b) se obtienen directamente de IFFA-CREDO (Saint Germain-sur-l'Abresch, France). Los ratones transgénicos C57BL/6-A2.1/K^b (B6-A2/K^b) (Vitiello y col., 1991), se criaron en las instalaciones del centro y fueron proporcionados por Dr. L. Sherman (Scripps Laboratories, San Diego, Ca) a través de Dr. P. Romero (Ludwing Institute for Cancer Research, Lausanne, Switzerland). Estos ratones transgénicos expresan el producto del gen quimérico HLA-A2.1/K^b, donde los

dominios α_1 y α_2 son iguales a los de la molécula HLA-A2.1 humana y los dominios α_3 , transmembrana y citoplasmático similares a la molécula murina H-2K^b (Fig 3). Todas las cepas de ratones se mantienen bajo las condiciones convencionales de limpieza. Para los experimentos usamos hembras de edad comprendida entre las 6 y las 10 semanas.

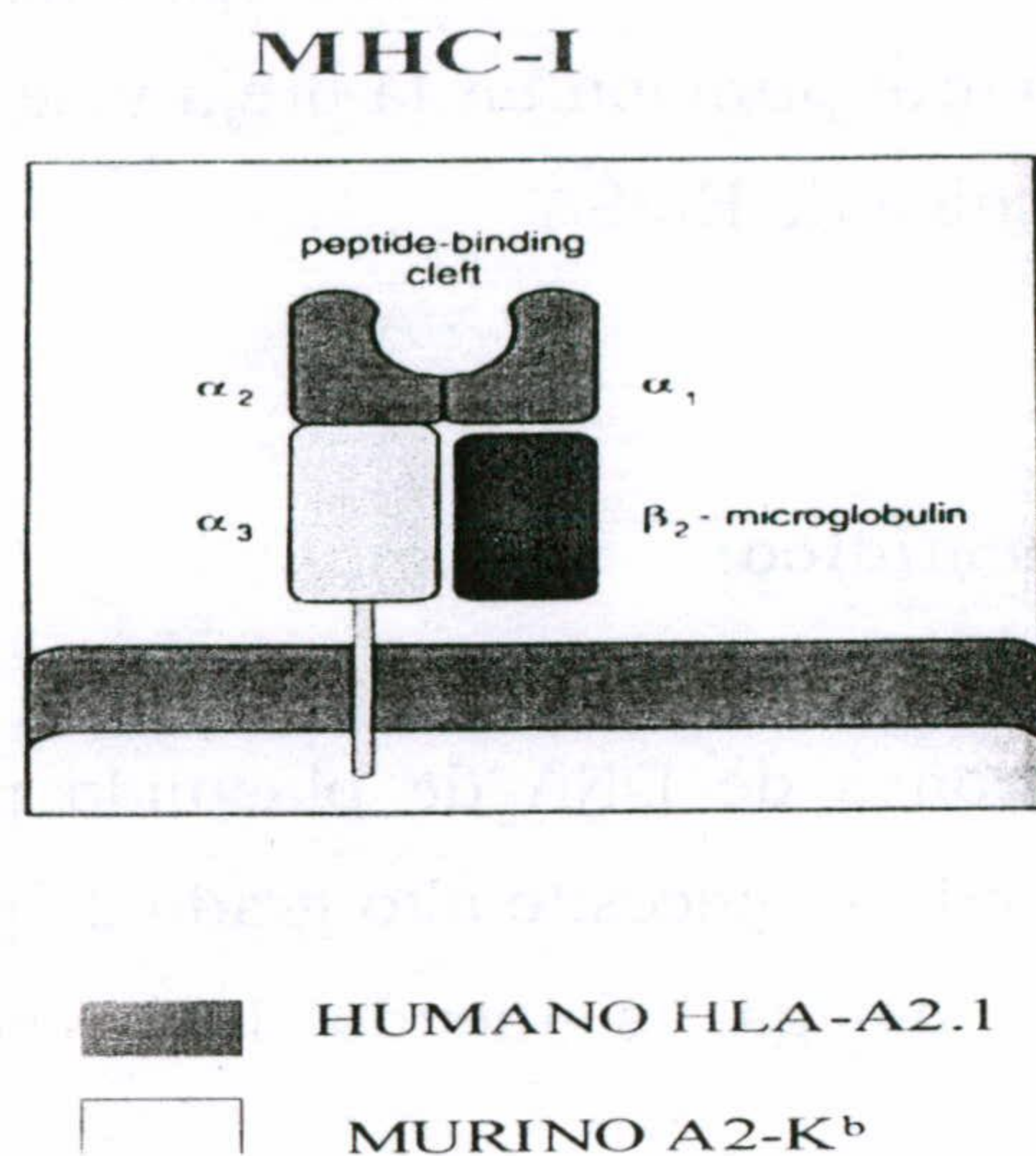


Fig HLA-I transgénicos

12. Inducción de la síntesis de anticuerpos en conejos.

Obtuvimos sueros hiperinmunes frente distintos péptidos de las proteínas PAR1 y PAR2 así como frente a las proteínas completas. En el caso de los anticuerpos policlonales frente a péptidos, para PAR1 se emplearon los péptidos número 10962, 10963 y 10965 y para PAR2 10959. El péptido se conjuga con KLH, usando proporciones molares de 40:1.

Con estos conjugados se inoculan respectivamente conejos machos de la cepa New Zeland, por vía intramuscular, con un total de 200 μ g por dosis y hasta 4 dosis, según el título de los anticuerpos obtenidos. El suero hiperinmune usado en los experimentos procede de la sangría de la oreja dos semanas después de la segunda o tercera dosis, enriquecido mediante una cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa (Pharmacia) acoplada con el referido péptido o proteína.

En el caso de anticuerpos frente a las proteínas completas se utilizaron 300µg de proteína purificada que se inoculó en una primera dosis con adyuvante de Freud incompleto y en subsiguientes con adyuvante completo siempre en proporción 1:1 (volumen:volumen) con el antígeno, en intervalos de 3 semanas.

Nuevamente se chequeó el nivel de anticuerpos de estos conejos dos semanas tras la 3^a dosis mediante punción en la oreja y se determinó el título de estos anticuerpos por la técnica de ELISA.

13. Purificación de DNA plasmídico.

En el caso de purificaciones de DNA de plásmido para reacciones de secuenciación u otros casos donde se necesite alto grado de pureza, se utiliza el kit "Wizard Minipreps" de Promega, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la purificación de DNA de los vectores recombinates pCMV4, pCMV4.PAR1, pCMV4.PAR2, pCMV4.PAR1.HSP70 y pCMV4.PAR2.HSP70, empleados como vectores vacuna, se ha utilizado el kit "Endofree Plasmid Gigakit" (Qiagen) siguiendo el protocolo de la casa comercial.

La concentración de ácidos nucleicos se determina midiendo la absorbancia a 260 nm, tomando como coeficiente de extinción $50 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para DNA, $40 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para RNA y $20 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para oligonucleótidos de cadena simple. Asimismo, la contaminación de proteínas en la muestra se determina según la relación $A_{260}:A_{280}$ y la contaminación de azúcares con la relación $A_{260}:A_{230}$.

14. Tratamiento del ADN con proteínas enzimáticas.

En este apartado se van a detallar únicamente los tratamientos con enzimas empleadas de manera general.

- Enzimas de restricción: Las digestiones del DNA con enzimas de restricción se llevan a cabo según las condiciones especificadas por el fabricante en cada caso (tampón de reacción y temperatura), siendo la relación unidades de

enzima/ μg de ADN a digerir generalmente mayor de 2, el volumen de reacción de 20 μl y el tiempo de incubación mínimo de 1 h.

- Fosfatasa alcalina: Se emplea para desfosforilar los extremos 5' de los plásmidos utilizados como vectores de clonaje con el fin de evitar su religamiento. La reacción se lleva a cabo durante 1 hora a 37°C, en el mismo tampón en el que se realiza la digestión del DNA. Las endonucleasas de restricción se inactivan previamente según las condiciones específicas de cada una. Una vez desfosforilado, el DNA se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior aislamiento del fragmento.
- Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*: Ha sido utilizada para rellenar los extremos 3' recesivos, creados por tratamiento con enzimas de restricción que producen extremos 5' protuberantes. Esta enzima es una cadena polipeptídica simple obtenida por proteólisis de la DNA polimerasa I de *E. coli* que conserva intactas la actividad polimerasa 5'→3' y exonucleasa 3'→5' pero carece de la actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa de *E. coli*. La reacción se lleva a cabo en el mismo tampón que se emplea en la digestión del ADN. Una vez inactivadas por calor las endonucleasas presentes, se añade una mezcla de deoxinucleótidos a una concentración de 2,5 mM cada uno y 1 U de enzima de Klenow. La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 30 min. Para la purificación del DNA seguimos el mismo procedimiento que en el apartado anterior.
- DNA ligasa del fago T4: Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-OH y 5'-P de DNA adyacentes. En las reacciones de ligación de fragmentos de DNA se emplea 1 U de enzima y el tampón de reacción suministrado por la casa comercial. La concentración de vector que se utiliza es de 50 ng, mientras que la de inserto se ajusta a una proporción molar de 2:1 o 1:1 (inserto-vector) según el tamaño del mismo. El volumen final de reacción es de 10 a 15 μl . La mezcla se incuba toda la noche a 16°C. Pasado este tiempo, los productos de la reacción se precipitan y se lavan, empleándose finalmente para transformar células competentes de *E. coli* mediante electroporación o por choque térmico en cuyo caso no es necesario precipitar y lavar el DNA.
- Polinucleótido kinasa del fago T4: Esta enzima cataliza la transferencia de grupos γ y fosfato del ATP a extremos 5'-OH de ADN de cadena simple o doble. Ha sido empleada en el marcaje radiactivo de los oligonucleótidos usados

como cebadores para reacciones como extensión de cebador o PCR. La fosforilación del extremo 5' de los oligonucleótidos se realiza usando [γ - ^{32}P]ATP (10 mCi/ml, 200 μCi totales), en presencia del tampón suministrado por la casa comercial, 10 mM ATP y 10 U de enzima, durante 1 hora a 37°C. El oligonucleótido marcado en 5' se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en Sephadex G-25.

15. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de amplificación mediante PCR, a excepción de las de secuenciación, se realizan en un termociclador Perkin-Elmer: GeneAmp PCR System 2400, usando las enzimas Taq DNA polimerasa o la mezcla de enzimas modificadas "Expand™ high fidelity system" de Boehringer (0'25 U/reacción). La mezcla de reacción tiene un volumen final de 100 μl , y en ella se incluyen entre 20-40 pmoles de cada cebador, tampón de reacción 1x, 0'1 mM de cada dNTP y 10-50 ng de ADN molde. Para la amplificación se utilizan siempre programas de 30 ciclos.

16. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

La separación de los fragmentos de DNA se realiza sobre geles de agarosa al 1-1'5% (p/v) con 100 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, en cubetas de desarrollo horizontal. Como tampón de carga de alta densidad utilizamos el descrito como de tipo II por Sambrook y col. (1989). Como tampón de electroforesis, TAE 1x de 0'1 mg/ml. Las condiciones de electroforesis fueron 7 V/cm durante 3 horas.

Los marcadores de peso molecular utilizados son DNA del fago Lambda gt11 digerido con *Hind*III (Daniels y col., 1983) o con *Bst*EII así como ADN del citado fago digerido con *Hae*III (Fuchs y col., 1978). Todos de la casa comercial Boehringer.

Para la visualización de los ácidos nucleicos con luz ultravioleta, se utiliza radiación con una longitud de onda de 366 nm. La fotografía del gel se realiza con una cámara Polaroid equipada con filtro rojo oscuro y naranja y película Polaroid 665 o bien en papel térmico en sistema "Gel Printer" (TDI).

La recuperación de los fragmentos de ADN desde el gel de agarosa se realiza mediante elución de la banda deseada y unión del ADN a un intercambiador aniónico en un soporte sólido, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial ("Quiaex gel extraction kit", de Quiagen).

17. Clones recombinantes existentes en el laboratorio.

- pCMV4.70: Utilizamos este clon existente en el laboratorio (Planelles et al 2001) para generar las fusiones PAR1-HSP70 y PAR2 HSP70.

18. Construcción de clones recombinantes.

La construcción de los clones empleados durante esta tesis doctoral tanto partiendo de clones existentes en el laboratorio como de nueva construcción se especifica como parte de los resultados de esta tesis.

19. Transformación de *E. coli* con los plásmidos de ADN recombinantes.

19.1. Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes.

Para la preparación de células electrocompetentes utilizamos el protocolo recomendado por el fabricante del electroporador (BTX). Las bacterias se crecen hasta una densidad óptica de 0'6-0'8 a 600 nm, y se recogen mediante centrifugación a 4000xg 15 min, y 4°C. A continuación, se realizan lavados con agua bidestilada esterilizada fría en las mismas condiciones: 1 volumen, 0'5 volúmenes dos veces, 0'02 volúmenes. Finalmente, el sedimento se resuspende en 0'002-0'003 volúmenes de glicerol al 10% frío y esterilizado por filtración. Las bacterias electrocompetentes se conservan en alícuotas a -70°C.

El DNA para electroporar debe estar resuspendido en agua bidestilada, y el volumen utilizado es de 1 µl. En una cubeta de electroporación se mezclan en frío 40 µl de bacterias resuspendidas en glicerol al 10% y 1 µl de ADN. Esta mezcla se somete a un pulso de 6 mseg a 12'25 Kv/cm. Inmediatamente después se añade 1 ml de medio SOC precalentado a 37°C, con el que se recogen

las células de la cubeta. La mezcla se mantiene a 37°C con agitación durante 1 h, y después 100-500 µl se siembran en LB-agar, con el antibiótico de selección adecuado. Las placas de LB-agar se incuban a 37°C durante 12-16h.

19.3.- Selección de colonias recombinantes de *E. coli*.

En plásmidos que portan el gen de resistencia a la ampicilina, como los originados a partir del pCMV4 ó del pQ, la selección de los transformantes se basó en el hecho de que solamente las células transformadas pueden crecer en un medio que contenga este antibiótico. Las colonias obtenidas se cultivan en medio LB líquido con ampicilina, con la finalidad de extraer el DNA plasmídico y verificar la presencia del inserto y la orientación del mismo mediante digestión del DNA plasmídico con enzimas de restricción y posterior secuenciación.

20. Secuenciación de ADN.

La secuencia de un fragmento de ADN se determina en base al método de Sanger (1977), a través de una reacción de PCR utilizando el "ADN sequencing kit" de Perkin Elmer y la enzima Taq DNA polimerasa (Boehringer). Los componentes de la reacción son: 1 µg de DNA, 3'2 pmoles de cebador y la mezcla de dNTPs con los terminadores marcados adecuados. Los fragmentos de DNA de cadena simple amplificados se separan mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida. La visualización de dichos productos, así como el análisis de resultados se realiza en un secuenciador automático 373 DNA Sequencer Stretch de Applied Biosystem.

21. Purificación de las proteínas recombinantes PAR1 y PAR2

Los resultados de la purificación de ambas proteínas así como el protocolo empleado se detallan en la sección de resultados. Tan sólo cabe mencionar que en el caso de PAR1 se utilizó el vector pQE y se utilizó como método de purificación una cromatografía de afinidad a níquel, mientras que en el caso de PAR2 el sistema empleado fue un clonaje independiente de ligación (LIC) en el vector pCAL, que incluía un péptido de unión a

calmodulina, por tanto su purificación se realizó mediante columna de afinidad calcio-calmodulina, siguiendo en ambos casos las recomendaciones del fabricante.

21.1.-Purificación de la proteína recombinante PAR1

1°.- Crecer O/N un preinóculo en LB ampicilina (100 mg/ml) y Kanamicina (25µg/ml en caso de usar la cepa M15) de 5ml por cada 200ml de cultivo final.

2°.- A partir de este preinóculo ponemos el cultivo para la purificación con un volumen final de 200ml o 400ml (LB con antibióticos) según la cantidad de proteína que se necesite (rendimiento aproximado 0.3 µg/ml de cultivo).

3°.- Aproximadamente a las 2 horas se mide la D.O. a 600nm para inducir a una D.O. entre 0.5 y 0.7. En este caso utilizamos 1mM de IPTG durante 1 hora.

4°.- Peletear el cultivo mediante centrifugación a 9500 r.p.m. durante 15 minutos. Este pellet se resuspende en proporción 40:1 de tampón fosfato pH=8 (NaHPO₄ 100mM Cl Na 50mM), 5ml de resuspensión por cada 200ml de cultivo.

5°.- Sonicar durante 3 minutos en condiciones estándar.

6°.- Centrifugar 15 min a 9500rpm. Separar el SN y tomar una alícuota para chequear las proteínas solubles. Este pellet se resuspende en tampón urea 8M (8M de urea, 0.01 M Tris y 0.1M NaHPO₄) y en este caso con 1 M de Cl Na (pH=8). Repetir este paso para una segunda solubilización y chequear ambas fracciones en gel de poliacrilamida al 10%.

7^a.- La primera solubilización que contendrá entre un 80-90% de la proteína se incuba con la resina que previamente se ha equilibrado en este mismo buffer de urea 8M a pH=8 durante 1 hora. El tiempo de pegado es de unas 2 horas aunque con 1h da buen resultado.

8°.- Montar la columna sobre un pie y comenzar los lavados con 15ml de este mismo tampón y ClNa 1M pH=8. Seguir lavando con 5ml de este buffer pero a pH=7. El pH de elución no está bien determinado, encontrándose entre pH6 y 5, así que a partir del pH=6 recogeremos fracciones de 1ml cada una. Se pasarán 5 ml de pH=6, 5 ml de pH=5 y por último 5 ml de pH=4.

9.- Chequear las distintas fracciones en gel de poliacrilamida y calcular la concentración por el método de Bradford.

21.2.-Purificación de la proteína recombinante PAR2

La cepa bacteriana empleada en este caso fue BL21. Se crece un preinóculo a partir de una colonia aislada de placa, O/N a 28°C en LB con 100µg/ml ampicilina y 34 µg/ml cloranfenicol. De este preinóculo hacemos una dilución 1/60 para poner un cultivo de 200ml. Este cultivo se crece a 28°C hasta alcanzar una D.O. a 600nm de 0,2. En este momento añadimos el agente inductor (IPTG 1mM) y dejamos crecer durante 5 horas más. Llegados a este punto se peletea el cultivo mediante centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Este pellet es resuspendido en proporción 20:1 respecto al volumen total del cultivo en un tampón con la siguiente composición: Tris 50mM, ClNa 150mM, β-ME 10mM, (AcO)₂Mg 1mM, Imidazol 1mM, Cl₂Ca 2mM, pH=8. Se procede ahora a la sonicación del cultivo en dos ciclos de 8 minutos con un intervalo de reposo de unos 10 minutos. Se centrifuga esta suspensión obteniéndose un pellet que contendrá las proteínas insolubles y un sobrenadante, como se ha comentado la proteína PAR2 se visualizó mediante un gel de SDS-PAGE en ambas fracciones, por tanto se detalla a continuación el proceso de purificación empleado sobre este extracto soluble y la solubilización y purificación de este pellet que contenía aproximadamente un 50% de la proteína total.

La fracción soluble fue incubada con la resina O/N a 4°C y durante 3 horas más a temperatura ambiente. Se monta esta mezcla sobre una columna y se recoge este eluido. Añadimos ahora 4 ml del tampón de unión con Cl₂Ca para lavar todo aquello que no se haya adherido a la resina. Comenzamos ahora la elución utilizando un tampón que contiene Tris 50mM, β-ME 10mM, EGTA 2mM, pH: 8. En este proceso de elución incubamos la resina con 3 ml del tampón en agitación durante 1 hora con el fin de separar la mayor cantidad de proteína de la resina. Recogemos ahora fracciones de 1 ml que se chequean mediante un gel desnaturalizante al 10%. Esta proteína purificada fue dializada frente a tampón fosfato salino durante toda la noche (12-16 horas).

En el caso del pellet obtenido del mismo cultivo, en primer lugar se procede a su solubilización empleando un tampón que contiene Tris 50mM, ClNa 150mM, β-ME 10mM, (AcO)₂Mg 1mM, Imidazol 1mM, Cl₂Ca2mM, pero en este caso añadimos urea hasta una concentración final de 8M, nuevamente a pH=8. La proporción de resuspensión empleada fue de 50:1 respecto al

volumen total del cultivo. Con este extracto se realizó un nuevo protocolo de purificación incluyendo en este caso la urea. Básicamente el procedimiento empleado fue el mismo que en el extracto soluble inicial, con la diferencia de que se incluyó urea a una concentración de 8M en todos los tampones. De esta forma se obtuvo la proteína PAR2 desnaturalizada por lo que posteriormente fue sometida a una diálisis durante unas 4 horas frente a tampón fosfato con urea 4M y durante toda la noche (12-16 horas) en tampón fosfato.

- Para la determinación de la concentración de proteínas en las diferentes muestras se utiliza el método de Bradford (1976) (Bio-Rad). En cada determinación se prepara una curva patrón de concentración, tomando como proteína de referencia la albúmina.

22. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida: SDS-PAGE.

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida empleamos el sistema Mini-Protean III Cell (Bio-Rad). La concentración de los geles variaba en función del tamaño de la proteína que se quería discriminar. Por ello, usamos geles de un rango de concentración de 8-10%, usando el protocolo descrito por Sambrook y col.(1989). A las muestras se les añade 1 volumen de tampón de Laemmli y se hierven 5 min antes de cargarlas en el gel. Una vez finalizada la electroforesis se utiliza el método Fairbanks de tinción rápida (REF). En este método se emplean un total de 4 soluciones: la primera de ellas contiene isopropanol al 25%, ácido acético al 10% y azul coomassie 0.05%. El gel se introduce en esta solución en un recipiente ventilado, y se calienta en el microondas a máxima potencia durante unos dos minutos (hasta ebullición). Se deja enfriar en agitación a temperatura ambiente unos 5 minutos. Retiramos esta solución y lavamos con agua. Se añade ahora una solución con isopropanol al 10%, y ácido acético al 10%, en la que se incluye un 0.005% de azul coomassie. Volvemos a calentar en el microondas hasta ebullición. Retirar la solución lavar y añadir la tercera solución que contiene sólo ácido acético (10%) y azul coomassie (0.002%). Calentar en microondas y dejar enfriar. Lavar con agua y añadir la última solución que contiene un 10% de ácido

acético y no incluye azul coomassie. Nuevamente calentamos en el microondas. Con esta solución en frío se puede dejar unos 15 minutos hasta O/N, también se incluye en el recipiente una esponja con el fin de retirar los restos de colorante para desteñir por completo el gel. Una vez finalizado el proceso de tinción, el gel se seca a vacío entre papel celofán (Bio-Rad).

En aquellos casos en los que transferimos el gel a membranas, se procede directamente a la transferencia justo después de la electroforesis, obviando el proceso de fijación.

Como marcadores de peso molecular se utilizan los siguientes:

- “Prestained protein MWM low range” (Bio-rad): 101000, 83000, 50600, 35500, 29100, 20900 Da.
- “Protein MWM mid range” (Promega): 97400, 66200, 55000, 42700, 40000, 31000, 21500 y 14400 Da.

Los pesos moleculares pueden variar ligeramente, según el lote del marcador.

23. “Western blot”. Inmunodetección de proteínas fijadas en membranas.

Para transferir proteínas desde geles de acrilamida hasta membranas, se utiliza el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad, y la membrana Immobilon-P (Amersham), usando tampón de transferencia 1x, y transfiriendo durante 2 h a 70 V.

La membrana a la que se transfieren las proteínas se bloquea entre 1 y 15 h con solución de bloqueo (leche desnatada 5%, Tween-20 1% en TBS 1x), y seguidamente se lava con solución de lavado (Tween-20 1% en TBS 1x), tres veces durante 10 min. La incubación con el primer anticuerpo a la dilución adecuada se realiza en solución de bloqueo durante 2h, después de la cual se vuelve a lavar tres veces con la misma solución. A continuación se procede a la incubación con el conjugado del segundo anticuerpo (anti-ratón o anti-conejo) acoplado a fosfatasa alcalina, durante 2 h. Lavar nuevamente tres veces e incubar con la solución de substratos cromogénicos (NaCl 0'1 M, Cl₂Mg 5 mM, Tris-Cl 0'1 M pH 9'5, NBT 0'33% (Boehringer), BCIP 0'165% (Sigma)) durante 10-20 min, hasta que el color alcanza la intensidad deseada.

La reacción se detiene con abundante agua bidestilada, y la membrana se conserva seca entre papel plástico.

24. Expresión de proteínas recombinantes en células eucariotas por los vectores recombinantes de pCVM4.

Analizamos la expresión de las proteínas PAR1, PAR2, PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70 mediante transfección transitoria de células COS-7 con los distintos plásmidos y posterior inmunodetección en los extractos celulares. Para llevar a cabo la transfección, las células COS-7 se incuban durante 6 horas en presencia de Lipofectina (Gibco BRL) con 2 µg de ADN de cada uno de los vectores. A continuación las células transfectadas son lisadas a distintos tiempos con objeto de determinar el tiempo de máxima expresión, con tampón de lisis (0'1 M Tris-HCl pH 8'0, 0'1% Triton X-100). Los extractos celulares (un total de 40 µg de cada uno de ellos) se someten a una electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y se transfieren a una membrana PVDF (Millipore) empleando el sistema Miniprotean (Bio-Rad). Realizamos análisis de Western Blot según la metodología estándar descrita anteriormente (Towbin y col., 1979), utilizando un antisuero de conejo anti-PAR1, o anti-PAR2 (1/10000 ambos) y un segundo anticuerpo, anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) a una dilución 1:5000.

25. Protocolo de inmunización de ratones con plásmidos de ADN.

Grupos de 3 a 6 ratones BALB/c, C57BL/6 y B6-A2/K^b se inyectaron vía intramuscular con 100 µg de uno de los siguientes plásmidos de DNA: pCMV4 (plásmido control), pCMV4.PAR1 (plásmido portador del gen PAR1), pCMV4.PAR2 (plásmido portador del gen PAR2), pCMV4.1.70 (plásmido que contiene los genes fusionados *PAR1-HSP70*) y pCMV4.2.70 (plásmido que contiene los genes fusionados *PAR2-HSP70*). Cada ratón recibe el DNA disuelto en 100 µl de solución de cloruro sódico al 0'9% estéril (Sigma), 50 µl en el

músculo tibial anterior de cada pata. Se incluyen dos grupos de ratones control, por una parte unos de ellos serán vacunados con el plásmido vacío (sin inserto) y el otro grupo control se inocula solamente con la solución salina. Cada ratón se inmuniza 4 veces, con un intervalo de 3 semanas entre las dosis. Dos semanas tras la última inmunización los animales son sacrificados por inhalación de CO₂ y se extraen los bazo y nódulos linfáticos. Con objeto de aclarar el protocolo de inmunización y los ensayos realizados, se adjunta un apartado final en el que se resumen las inmunizaciones y el tiempo en que se realizan los ensayos (página 66).

26. Procesamiento de órganos linfoides.

Tras la extracción estéril, el bazo y/o los nódulos linfáticos (inguinales, mesentéricos y axilares) de los ratones a analizar, se homogenizan en PBS al 1% de suero bovino fetal inactivado (SBFi) en una placa de Petri y usando portaobjetos esmerilados o el émbolo de una jeringa estéril. A continuación las células se lavan y se resuspenden en tampón de lisis de eritrocitos incubándose a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido este tiempo añadimos PBS 1% SBFi para parar la reacción y pasamos la suspensión por un filtro de nylon (Falcon) para quitar los agregados. Tras lavar de nuevo, se resuspenden las células en medio DMEM completo y se contabilizan las células viables por tinción con el colorante azul Trypan y empleando una cámara de Neubauer (Brand).

27. Detección de Anticuerpos.

Los niveles de anticuerpos (IgG, IgG1, IgG2a, Ig M ó IgG2b) específicos frente a la proteínas PAR1 y PAR2 de *T. cruzi* o frente a los péptidos que recorren la secuencia aminoacídica de dichas proteínas, se determinaron en los sueros de ratones BALB/c y B6-A2/K^b inmunizados con plásmidos de ADN. Para ello, los ratones se sangran en los días 0, 21, 42, 56, 63, 77, 91, 105, 119 y 126. Las muestras sanguíneas de 5 ratones por grupo fueron procesadas y almacenadas a -70°C hasta ser analizadas.

Los niveles de anticuerpos (IgG, IgG1, IgG2a) específicos frente a las proteínas paraflagelares de *T. cruzi* fueron determinados en los sueros de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados. Para ello los animales fueron sangrados a lo largo de la infección los días 0, 5, 11, 18 y dos meses postinfección (fase crónica de la enfermedad). Las muestras sanguíneas fueron procesadas y almacenadas a -70°C hasta ser analizadas.

27.1. Anticuerpos frente a proteínas: ELISA.

En las determinaciones de títulos de anticuerpos frente a las proteínas recombinantes se utiliza la técnica de ELISA, fijando en cada pocillo de la placa (Nunc) 0.5 μg de proteína, disuelta en 100 μl de solución de $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 10 mM, pH 9.6. La placa se incuba a 37°C durante 1 h y se mantiene a 4°C durante toda la noche. A continuación lavamos dos veces con PBS-Tween 0.05%. El bloqueo se realiza con leche desnatada en polvo al 5% en PBS durante 2 h, y después de desecharla y realizar 2 lavados, se añaden los sueros diluidos en esta misma solución. Los sueros se incubaron durante 2 h a 37°C , en un volumen de 100 μl por pocillo. Después de lavar las placas de cuatro a seis veces con PBS-Tween 0.05% se añaden 100 μl de una solución del segundo anticuerpo acoplado con peroxidasa en PBS-Tween 0.05%-leche desnatada 5%, durante 1 h a 37°C . Se realiza cuatro lavados con PBS-Tween 0.05%, y los pocillos se incuban con 100 μl de la solución sustrato (5 ml de tetrametilbenzidina (KPL), 5 ml de peróxido de hidrógeno (KPL)) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se determina la densidad óptica a 620 nm, mediante un lector de placas. Si se utiliza como revelador OPD (ortofenildiamina, Sigma), disuelto en tampón citrato pH 5, se detiene la reacción con ácido sulfúrico 2N y se realiza la medida de densidad óptica en este caso a una longitud de onda de 492 nm. En ambos casos siempre se incluye un pocillo en blanco, es decir que llevará fijado el antígeno y sufre todo el proceso en paralelo con las muestras de forma que nos indicará el valor basal o de fondo.

27.2. Anticuerpos frente a péptidos: FAST-ELISA

Para evaluar la respuesta frente a los péptidos sintéticos de las proteínas PAR1 y PAR2 utilizamos la técnica de FAST ELISA ("Falcon Assay Screening Test", "Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay" (Patarroyo y col., 1991).

Las bolitas o "lids" de las placas (Falcon ELISA plates, Falcon) se cubren con 100µl de una solución de péptido 10 µg/ml en PBS y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación, o en el caso de péptidos con histidina y glicina en sus extremos (CG) se incubarán toda la noche con agitación. A continuación, los "lids" se lavan con PBS-0'5% tween-20 (v/v), se enjuagan con agua desionizada y se secan a temperatura ambiente (al menos durante una hora). Posteriormente, incubamos los "lids" con 100 µl de cada suero diluido en PBS-tween 0'5% (v/v) y 5% de leche desnatada (p/v), durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Después de un lavado con PBS 0'5% Tween y un enjuague con agua desionizada, los "lids" son incubados durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con 100 µl del conjugado anti-inmunoglobulina acoplado a peroxidasa y diluido en PBS Tween 0'5%. Finalmente, los "lids" se lavan con PBS 0'5% Tween, se enjuagan con agua desionizada y se incuban con 100 µl de la solución sustrato (5 ml de tetrametilbenzidina, 5 ml de peróxido de hidrógeno) durante 15 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido este tiempo, sacamos los "lids" de los pocillos y determinamos la densidad óptica a 620 nm, mediante un lector de placas.

28. Inmunodetección de proteínas de la superficie celular mediante citometría de flujo.

Las células en las que se quiere analizar la expresión superficial de proteínas son resuspendidas en medio completo. En una placa de 96 pocillos y fondo en V se añaden entre 2×10^5 y 10^6 células/pocillo, manteniendo la placa en hielo durante todo el proceso de tinción. Las células se lavan con PBS y se resuspenden en 50 µl de Fc block durante 10 min. Tras un lavado con PBS, incubamos en primer lugar las células con los anticuerpos monoclonales que no están marcados con fluorocromos, en un volumen de 50 µl. Transcurridos 20 min, realizamos dos lavados con PBS e incubamos las células con los

anticuerpos (primarios o secundarios) marcados con algún fluorocromo (FITC, PE) cubriendo la placa con papel de aluminio durante 20 min. A continuación, las células se lavan dos veces con PBS, se resuspenden en 300 µl de PBS y se analizan en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). La población celular muerta se excluye por marcaje con yoduro de propidio. Cuando interesa posponer el análisis, las células pueden conservarse fijándolas con paraformaldehído al 2% y manteniéndolas a 4°C. El análisis posterior de los datos adquiridos se realiza utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson) y el programa WinMDI 2.8 (J. Trotter. Scripps Laboratoires, San Diego, CA).

29. Estimulación de linfocitos *in vitro*.

Linfocitos procedentes de los nódulos linfáticos de ratones son estimulados *in vitro* con un mitógeno no específico para analizar a continuación la producción de citoquinas a nivel intracelular. Igualmente se estimularán con el antígeno de interés, en este caso con las proteínas PAR1 y PAR2. Los nódulos linfáticos se extraen y procesan hasta tener una suspensión de células única en medio completo. En una placa de 24 pocillos añadimos 5 x 10⁶ células/pocillo en 2 ml de medio junto a 20 ng/ml de 12,13-dibutirato forbol (PDBu) (Sigma) y 1 µM ionóforo de Calcio A23187s (Sigma). El PDBu en los pocillos problema será sustituido por nuestros antígenos a una concentración de 4µg/ml Durante las 3 últimas horas de incubación, que se completa a las 8 horas, se añade a los pocillos Brefeldina A (Sigma) a 10 µg/ml, para bloquear el transporte de proteínas del aparato de Golgi. Posteriormente las células son lavadas con PBS y sometidas a un tratamiento para detectar citoquinas intracelulares.

30. Determinación de citoquinas.

30.1. A nivel intracelular mediante citometría de flujo.

Alícuotas de 5x10⁵-10⁶ células/pocillo son repartidas en una placa de 96 pocillos y fondo en V (Falcon). Tras un lavado con PBS las células se fijan con

paraformaldehído (PFA) al 4% durante 5 min , se lavan de nuevo con PBS y se resuspenden en tampón de permeabilización (saponina al 0'2% (Sigma) en PBS). Transcurridos 10 min , las células se lavan dos veces y se incuban con anticuerpos anti-citoquinas marcados con fluorocromos en un volumen de 50 μ l de tampón de permeabilización durante 20 min. Por último, lavamos otra vez y resuspendemos las células en PBS, dejándolas preparadas para el análisis en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). La población celular muerta se excluye por marcaje con yoduro de propidio. El análisis posterior de los datos adquiridos se realiza utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson) y el programa WinMDI 2.8 (J. Trotter. Scripps Laboratoires, San Diego, CA)

Cuando es necesario realizar dobles marcajes y detectar junto a las citoquinas intracelulares moléculas de la superficie, se lleva a cabo en primer lugar la tinción de marcadores superficiales siguiendo el método descrito anteriormente (apartado 28).

30.2. En el sobrenadante de cultivos celulares mediante ELISA.

Para determinar los niveles de las citoquinas de ratón TNF- α e IL12, presentes en el sobrenadante de cultivos celulares utilizamos el kit "OptEIA™" de la casa comercial Pharmingen. El procedimiento a seguir, descrito a continuación, es el especificado por los fabricantes.

El anticuerpo de captura diluido, anti-TNF- α ó anti-IL12, se añade en una placa flexible de 96 pocillos (Nunc) y se incuba durante toda la noche a 4 °C. Como tampón para diluir, fosfato sódico 0' 2 M a un pH 6'5. Como tampón para todos los lavados se utiliza Tween 20 al 0'05% en PBS . Tras realizar 3 lavados, los pocillos se rellenan con 100 μ l de solución de bloqueo, PBS con SBF al 10%. La placa se mantiene 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, lavamos tres veces la placa y depositamos en los pocillos los estándares así como las muestras problema disueltas en un volumen de 100 μ l/pocillo. Cada determinación se hace por duplicado y para cada muestra evaluamos dos diluciones. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente y 5 lavados posteriores, añadimos en cada pocillo 100 μ l de solución detectora, que contiene el anticuerpo monoclonal de ratón (TNF- α o IL12)

biotinilado y la enzima peroxida conjugada con avidina, todo ello disuelto en PBS con SBF al 10%. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente seguida de 7 lavados, añadimos a cada pocillo 100 µl de solución substrato, consistente en tetrametilbenzidina (TBM) y peróxido de hidrogeno. Incubamos 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y a continuación se añaden 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2N para detener la reacción. Por último, medimos la densidad óptica a 620 nm en un lector de ELISA.

31. Ensayo de linfoproliferación.

Para los ensayos de proliferación celular, dos semanas tras la última inmunización las células del bazo de los ratones vacunados con DNA así como de los ratones control son cultivadas por triplicado en placas de 96 pocillos y fondo redondo ($4 \cdot 10^5$ células/pocillo) en presencia o ausencia de distintas concentraciones de antígeno (PAR1 o PAR2), péptidos o Concanavalina A (mitógeno). El volumen final es de 200 µl/pocillo y el medio utilizado, DMEM completo (apartado 8). Las placas se incuban durante 72 horas a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, añadimos 0'5 µCi de [³H-metil] timinida por pocillo y prolongamos la incubación a 37°C durante 8 horas más. A continuación se recogen las células en un *harvester* (Inotech) y el DNA se inmoviliza sobre una membrana de fibra de vidrio (Wallac). La radiactividad retenida en el filtro se mide en un contador de centelleo líquido (Wallac 1450 microbeta counter). Los resultados se expresan como índice de estimulación, calculado a partir de la formula:

Índice de estimulación = $\frac{\text{cpm (cultivo estimulado)} - \text{cpm (cultivo sin estimular)}}{\text{cpm (cultivo sin estimular)}}$.

32. Ensayos de unión y estabilidad de péptidos A2.

Se sintetizaron un total de 23 y 20 péptidos en base a las secuencias de las proteínas PAR1 y PAR2 respectivamente, y a los motivos de unión de moléculas de histocompatibilidad de clase I. Para determinar la afinidad por estos motivos y cómo de estable era la unión, utilizamos las células T2, una línea de linfocitos de ratón que presenta una deficiencia en el gen de la proteína transportadora de antígeno (TAP) (Valmori et al 1998). Estas células expresan bajos niveles de moléculas de clase I con excepción de HLA-A*0201.

Las células fueron incubadas en presencia de cada uno de los péptidos, utilizando como control interno el péptido de la envuelta del virus de la hepatitis B (HB-ENV), descrito como un péptido de alta afinidad a motivos A2. Para determinar esta unión se empleó el anticuerpo W62/32 que reconoce moléculas de clase I, y un segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón) asociado a FITC.

Con objeto de determinar la estabilidad de esta unión, se recogieron alícuotas a distintos tiempos (4,8,12 horas) de estos cultivos.

33. Análisis de actividad citotóxica en esplenocitos de ratones inmunizados con DNA.

33.1. Estimulación de los esplenocitos *in vitro*.

Para cada grupo de ratones inoculados con plásmidos de ADN, se extrae el bazo entre 2 y 10 semanas tras la última inmunización, se homogeniza y las células se resuspenden en medio DMEM completo (apartado 8). Un total de 5×10^6 esplenocitos/pocillo son incubados en placas de 24 pocillos junto a $5-10 \times 10^5$ células EL4-A2/K^b previamente tratadas con 50 µg/ml de mitomicina C (Sigma) durante 60 minutos a 37°C y pulsadas con 50 µg/ml de cada uno de los péptidos A2 de las proteínas PARs (apartado 7). En el día 3, el medio de los cultivos se renueva añadiendo al medio fresco 10 U/mL de rmlL-2 (R & D Systems). Semanalmente los cultivos son reestimulados utilizando como células presentadoras de antígenos células EL4-A2/K^b tratadas con 50 µg/ml de mitomicina C y pulsadas con 50 µg/ml de péptido durante dos horas. Cada 3 días el medio de los cultivos se sustituye añadiendo medio nuevo suplementado con 10 U/ml de rmlL2. El análisis fenotípico de la población celular se lleva a cabo tras dos ciclos de reestimulación *in vitro*. Para ello se determina la expresión en las células en cultivo de las moléculas superficiales CD4 y CD8, según el método descrito (apartado 28).

En el caso de utilizar las proteínas PARs completas, las células EL4-A2/K^b o Jurkat según el caso fueron transfectadas 48 horas antes de realizar estas estimulaciones mediante electroporación. Se utilizó un electroporador BTX, con cubetas de 4mm que contenían un total de 20×10^6 células y 20 µg

del plásmido (pCMV4-PAR1, PAR2, PAR1.HSP70 ó PAR2.HSP70). Estas células fueron sometidas a un gradiente de ficoll, con objeto de eliminar todas las células muertas del cultivo y tratadas con mitomicina al igual que las pulsadas con péptidos. El resto del ensayo se realizó como se ha indicado para las células pulsadas con péptidos. La proporción de estas células siempre fue como mínimo un 10% con respecto a las efectoras.

33.2. Ensayo de liberación de ^{51}Cr .

La cuantificación de la actividad citotóxica se determina el día 6 post última estimulación (dependiendo del caso se suelen hacer 2 ó 3 estimulaciones) mediante el ensayo clásico de liberación de ^{51}Cr (Schoenberger y col., 1998). Las células diana EL4-A2/ K^b se incuban con los diferentes péptidos (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 2 horas a 5% CO_2 y 37°C. Después de lavarlas, 2-3 x 10⁶ de estas células diana EL4-A2/ K^b pulsadas con los péptidos se marcan radiactivamente con 200 μCi de Na^{51}Cr (Amersham) durante 1 hora a 37°C. En el caso de las células transfectadas con los distintos plásmidos es necesario retirar todas las células muertas del cultivo antes de realizar el marcaje, previa electroporación 48 horas antes. El marcaje se hace igual que en las células pulsadas con péptidos. A continuación, se lavan dos veces y se reparten en placas de 96 pocillos y fondo redondo, junto a diferentes cantidades de esplenocitos efectoras, que han sido previamente estimulados *in vitro* durante 21 días y procedentes de los ratones inmunizados. Antes de hacer este ensayo se deben eliminar las células muertas de estos cultivos que se han ido estimulando. Normalmente se utiliza una cantidad fija de 2000 células diana en cada pocillo frente a distintas proporciones de células efectoras, en general las proporciones empleadas son 100:1, 50:1 y 25:1 (células efectoras:células diana) en un volumen final de 200 μl . El ensayo se realiza en placas de fondo en V con el fin favorecer el contacto entre células y facilitar la recogida del sobrenadante. Las determinaciones se realizan por triplicado y tras 5 horas de incubación a 37 °C en atmósfera de CO_2 , medimos la radiactividad liberada en los sobrenadantes usando un contador de centelleo líquido Microbeta 1450 (Wallac). La lisis específica se calcula usando la siguiente formula: % lisis específica = [cpm (liberación experimental) - cpm (liberación espontánea) /

cpm (liberación total) - cpm (liberación espontánea)] x 100. La liberación espontánea representa el número de cuentas obtenidas cuando las células diana son incubadas en medio de cultivo sin células efectoras y la liberación total representa el número de cuentas obtenidas después de tratar las células diana con CIH 1M. Experimentos donde la lisis espontánea es mayor del 20% respecto a la lisis total se eliminan.

34. Obtención de formas tripomastigotes de *T. cruzi*.

Todos los estudios descritos en este trabajo han sido realizados en la cepa Y de *T. cruzi* (Silva y Nussenzweig, 1953).

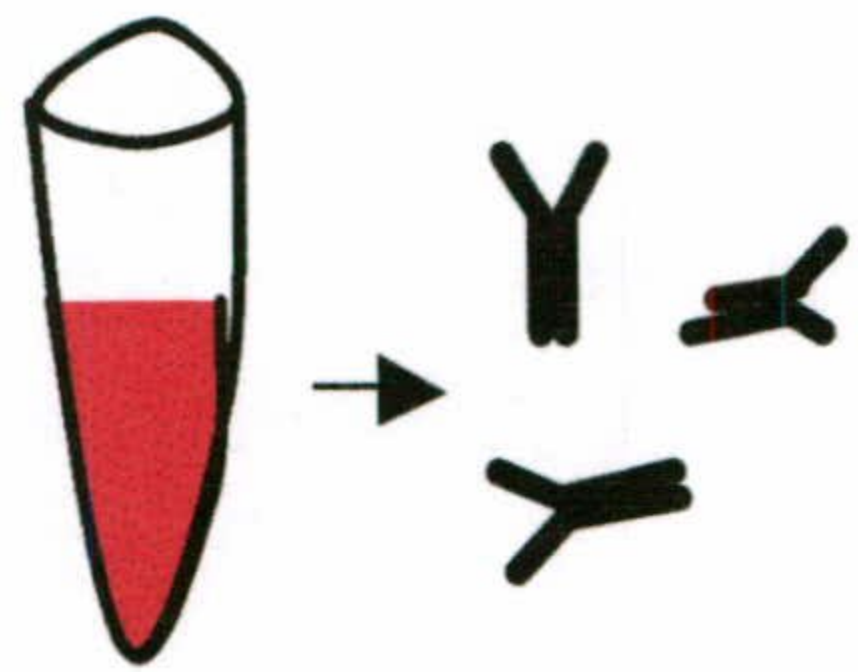
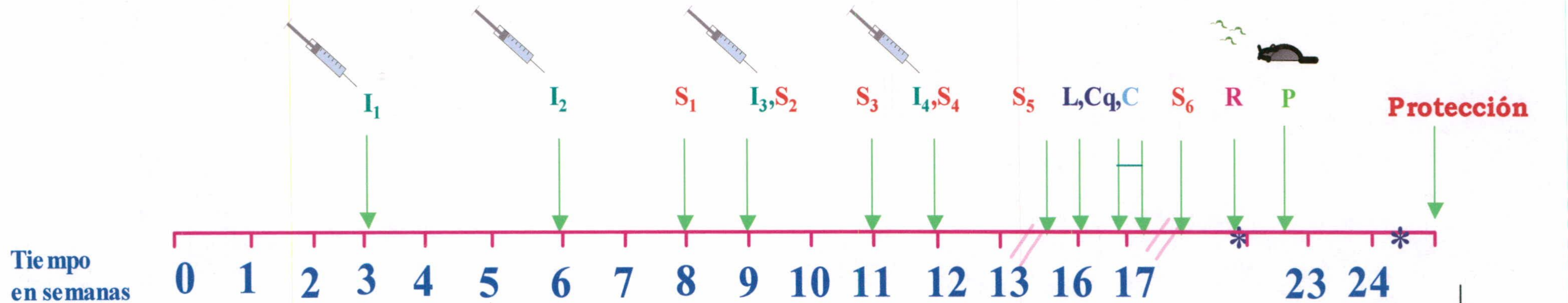
La obtención de formas tripomastigotes *in vitro* se realiza infectando líneas celulares epiteliales LLC-MK₂ (Andrews y Colli, 1982) o células vero. Las células, cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado crecen en monocapa a 37°C y 5% de CO₂. Alcanzada la semiconfluencia los cultivos se infectan con una proporción de tripomastigotes:célula de 3:1. Al partir del cuarto día de incubación se empiezan a recoger del sobrenadante las formas tripomastigotes del parásito y se lavan 3 veces con solución salina PBS.

La obtención *in vivo* de tripomastigotes de *T. cruzi* altamente infectivos, se realiza a partir de ratones BALB/c infectados previamente con parásitos. En una primera infección se inoculan vía intraperitoneal 2000 tripomastigotes/ratón procedentes de cultivo y resuspendidos en PBS. Aproximadamente dos semanas después de la infección los ratones se sangran, las muestras sanguíneas se centrifugan 5 minutos a 2000 rpm y posteriormente se incuban en reposo 2-4 h a 37°C. Los tripomastigotes presentes en el sobrenadante son contabilizados en cámara de Neubauer y utilizados para una nueva infección. De esta manera se mantienen ratones infectados haciendo pases bisemanales.

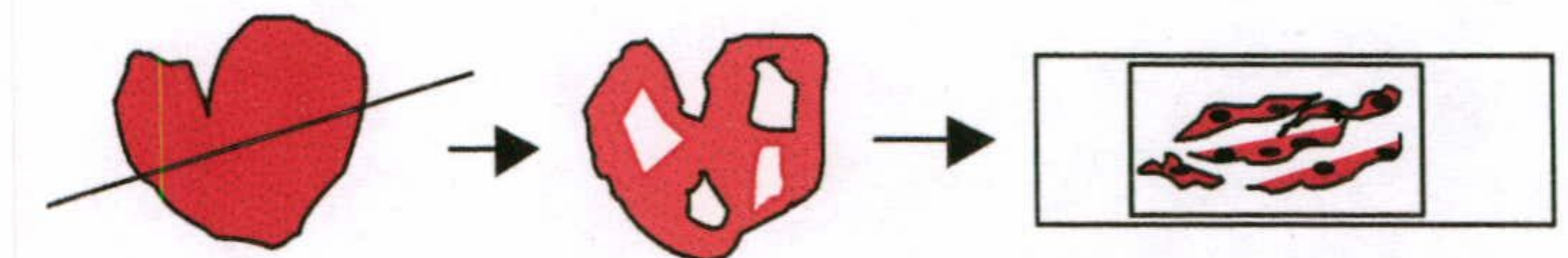
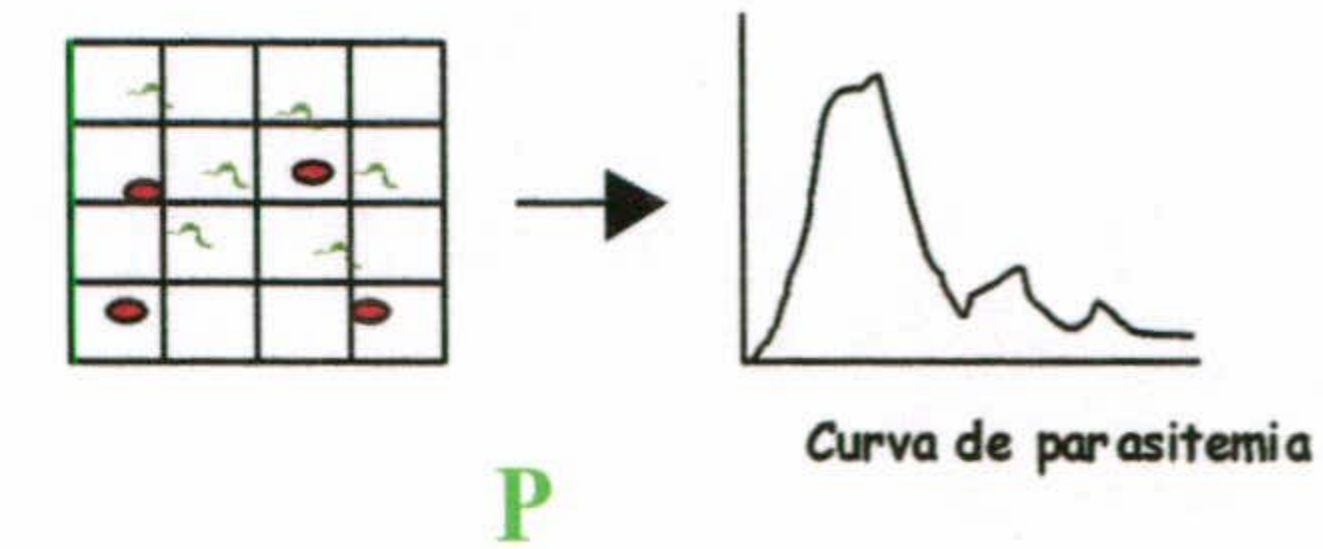
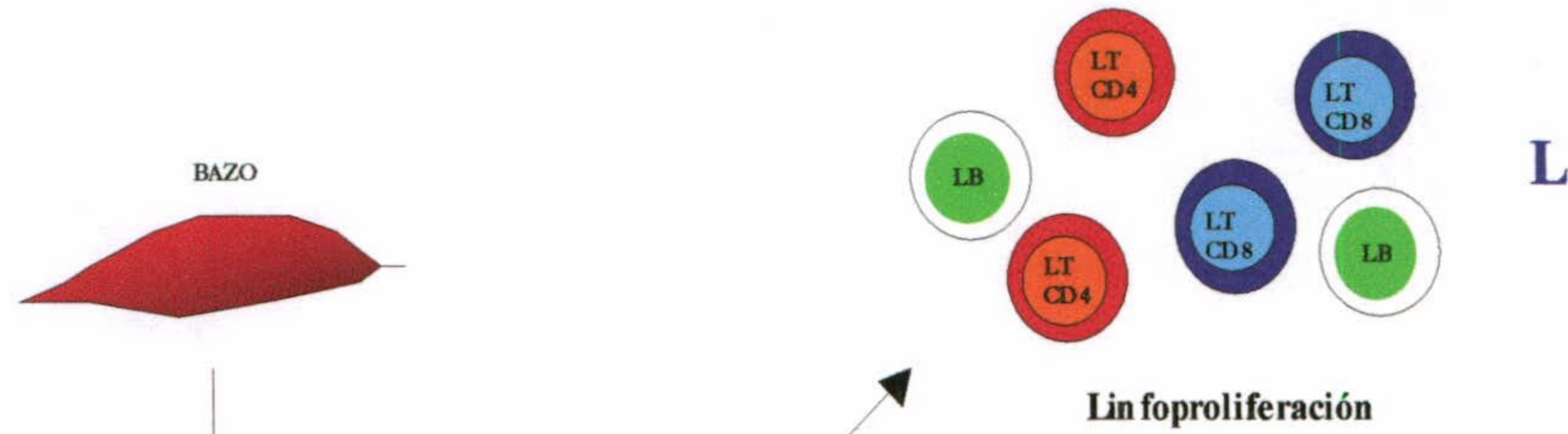
Con el fin de atenuar esta cepa, estos tripomastigotes obtenidos de ratón se pasan dos o tres veces por cultivo, es decir, se realizan 2 infecciones sucesivas de una monocapa de células Vero o LLC-MK₂. De esta forma la inoculación de un ratón de la cepa BALB/c con 2000 parásitos procedentes de esta segunda monocapa, vía intraperitoneal no supone la muerte del mismo, permitiéndonos realizar estudios en fase crónica.

Ensayos de inmunización con vacunas de DNAPAR1, PAR2, PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70

Cepas: BALB/c, C57BL/6, transgénicos A2
 Controles: pCMV4 y PBS



S Determinación Ab (IgM, IgG, IgG₁, IgG_{2a}).



Inclusión en resina y cortes ultrafinos para tinción con hematoxilina-eosina

Visualización mediante microscopía óptica. Valoración de daños en función de la inflamación

Protección

I: Inmunización 100 µg de DNA

S: Obtención de suero. Determinación Ab (IgM, IgG, IgG₁, IgG_{2a}).

L: Linfoproliferación con células de bazo (PAR1, PAR2 y péptidos).

Cq: Determinación *in situ* en nodulos linfáticos de INFγ, IL4, IL10, IL5.

C: Detección de CTL frente a PAR1 y PAR2 péptidos A2 contenidos en las mismas.

R: Reto con formas infectivas del parásito (vía intraperitoneal)

P: Parasitemia.

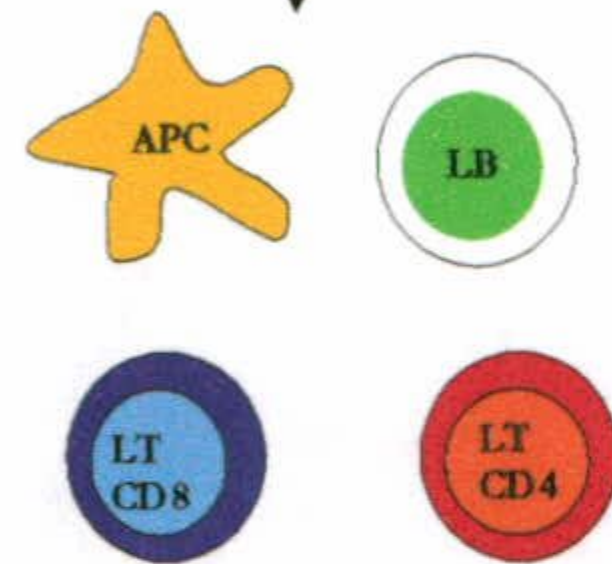
Protección: histología de corazones de ratones vacunados en fase crónica.

Péptidos o células transfectadas (PARs)

CTLs
C

citoquinas
Cq

Anígeno



Objetivos



12/12/12

OBJETIVOS:

1°.- Caracterización inmunológica de las proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma .cruzi* en el contexto de una vacuna genética. Papel de dichas proteínas en infección natural.

2°.- Estudio de la capacidad adyuvante y/o inmunoestimuladora de la HSP70 de *T. cruzi*.

3°.- Búsqueda de análogos de PAR1 en otros tripanosomátidos.



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for ensuring the integrity and reliability of financial data. This section also outlines the various methods and tools used to collect and analyze financial information, highlighting the role of technology in modern accounting practices.

The second part of the document focuses on the application of these principles in a real-world context. It provides a detailed analysis of a specific case study, illustrating how the concepts discussed in the first part are applied to solve a complex financial problem. This section includes a thorough breakdown of the data and a clear explanation of the reasoning behind the final conclusions.

In conclusion, the document underscores the significance of a systematic and disciplined approach to financial record-keeping. It encourages practitioners to stay updated with the latest developments in the field and to continuously refine their skills to meet the evolving demands of the industry.

Resultados



2019-2020

4.1.-Clonaje, expresión y purificación de las proteínas PAR1 y PAR2.

4.1.1.-Obtención de la proteína recombinante PAR1 de *T. cruzi*

Para obtener la secuencia que codifica para dicha proteína, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI. Con esta secuencia se diseñaron 2 oligonucleótidos (detallados en materiales y métodos) y a partir del DNA genómico del parásito *T. cruzi* cepa Y se amplificó mediante PCR un fragmento de 1,8 kb. Este fragmento fue digerido con las enzimas que se habían incluido en los oligonucleótidos (*Bam*HI y *Xba*I) y clonado en el vector de expresión procariota de la serie pQE32. Este vector incluye en el extremo amino una cola de 6 histidinas que permite la posterior purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel. El esquema de clonaje se detalla en la siguiente figura:

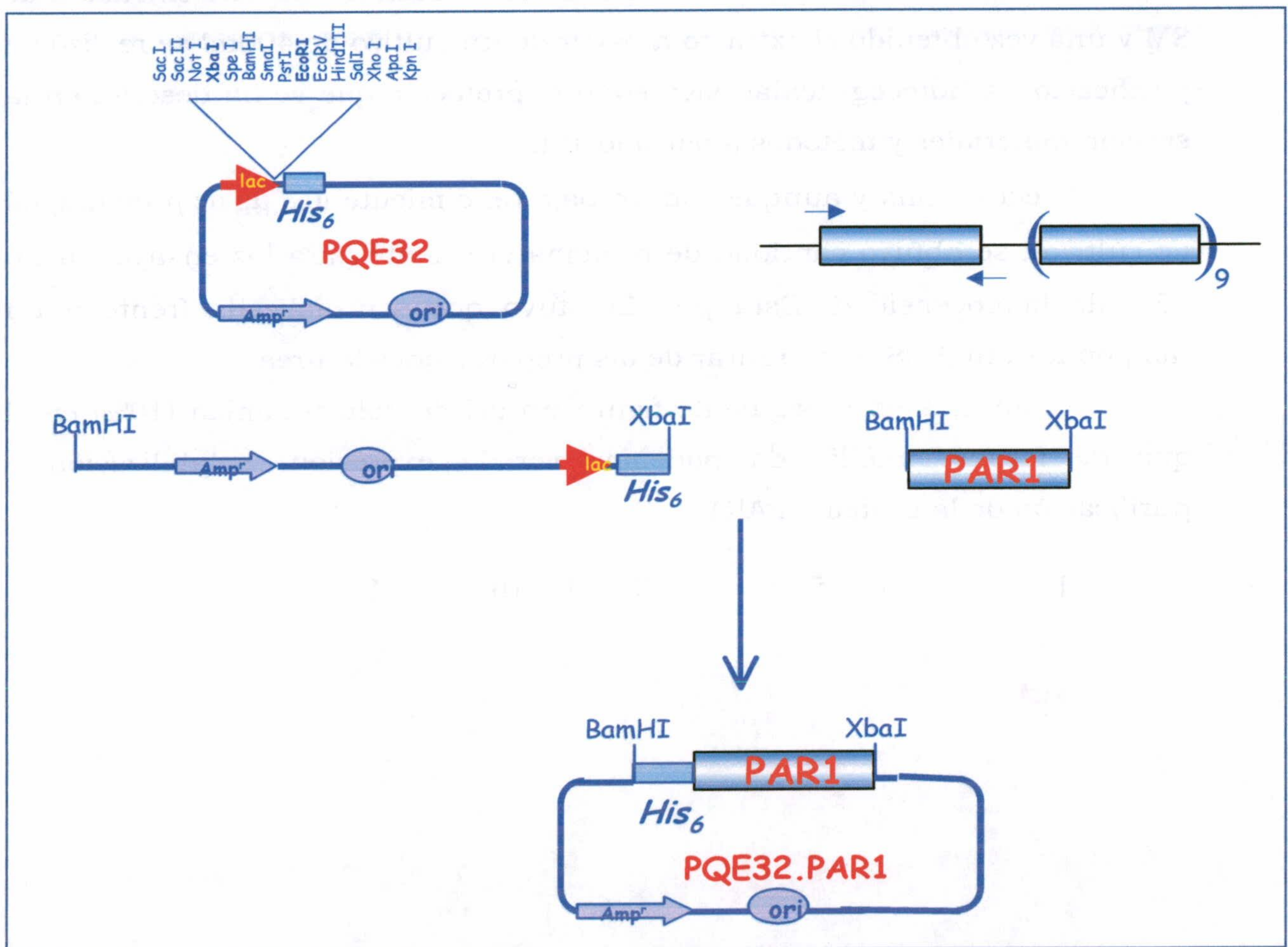


Fig 10.- Clonaje de la secuencia de PAR1 en el vector de expresión pQE32. Se incluye en el extremo amino de la proteína una secuencia de 6 histidinas consecutivas (His₆) que facilita la purificación mediante una columna de afinidad a níquel.

El fragmento clonado fue secuenciado en ambas cadenas, no observándose ningún cambio significativo con respecto a la secuencia obtenida en la base de datos correspondiente a la cepa *Esmeraldo*.

Se procedió al análisis de expresión de esta proteína, mediante la adición de IPTG (agente inductor de este sistema) en la cepa M15, comprobándose que la proteína se expresaba a niveles elevados con una concentración de 1mM siendo suficiente un crecimiento del cultivo de unas 2 horas en presencia de este inductor. Más tarde se comprobó la solubilidad de PAR1 en los distintos tampones recomendados por el fabricante, resultando ser una proteína insoluble. De esta forma se recurrió a distintos agentes solubilizantes, detergentes principalmente y urea en concentraciones crecientes. Entre estos agentes se seleccionó la urea a una concentración de 8M y una vez obtenido el extracto a partir de un cultivo de 400ml se realizó su purificación a homeogeneidad siguiendo el protocolo que se ha descrito en la sección materiales y métodos (apartado 19).

De esta forma y aunque con un bajo rendimiento (0.3 μ g de proteína/ml de cultivo), se obtuvo cantidad de proteína suficiente para los ensayos, a un 85% de homogeneidad. Esta proteína tuvo que ser dializada frente a un tampón fosfato (PBS) para retirar de las preparaciones la urea.

Se muestra en la siguiente figura un gel de poliacrilamida (10%) en el que de forma simplificada podemos ver la expresión, solubilización y purificación de la proteína PAR1.

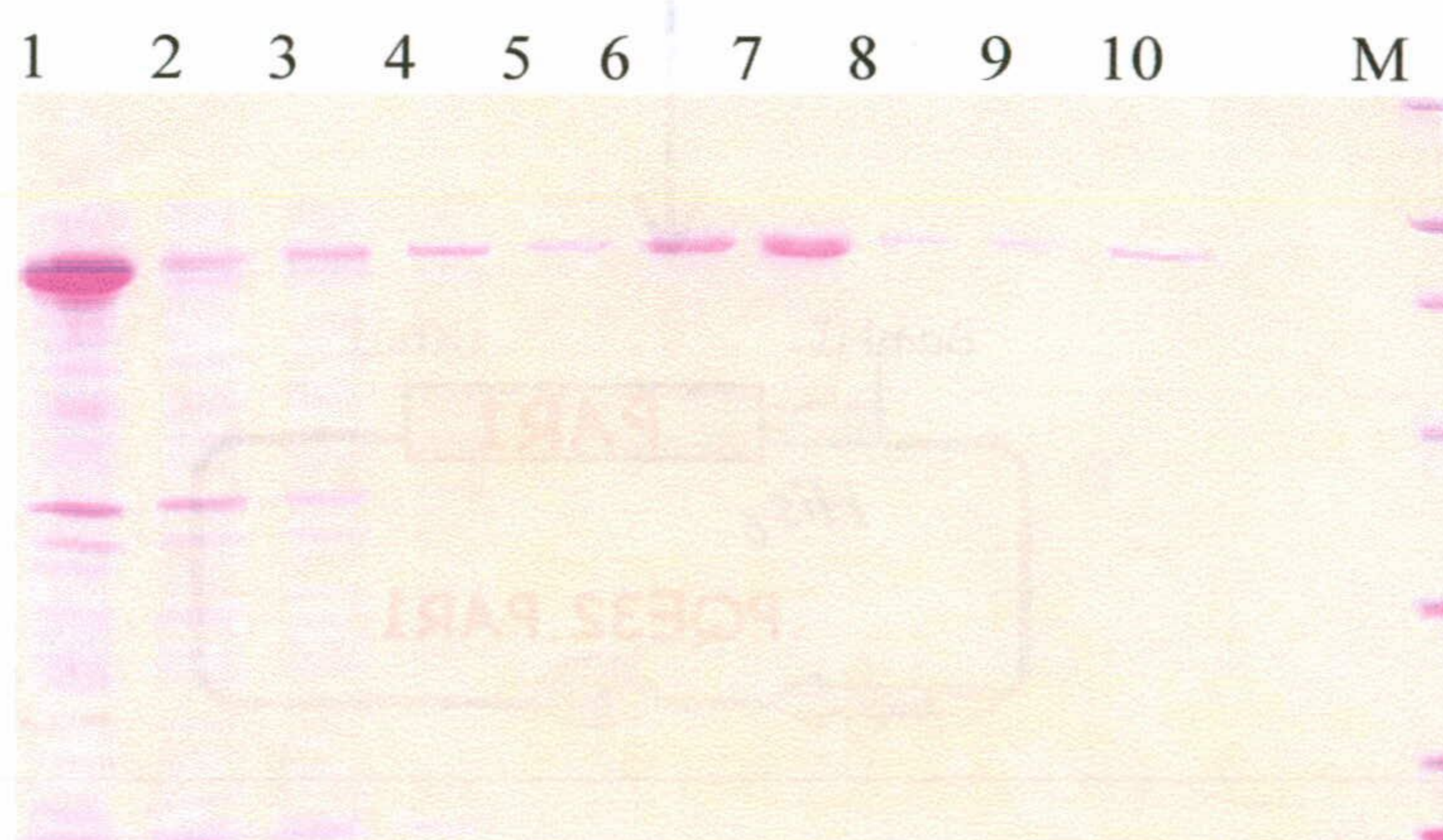


Fig11.-Gel de PAR1 : A la izquierda vemos el marcador de peso molecular (M). Carril 1: solubilización con urea 8M. Carril 2,3,4: Lavados a pH=8 Carril 5: Lavado a pH=7. Carril 6 y 7: Lavados a pH=6

4.1.2.-Obtención de la proteína recombinante paraflagelar PAR2 de *T. cruzi*.

La estrategia para obtener la secuencia de la proteína PAR2 fue similar a la empleada para PAR1. Ambas proteínas estaban descritas en la literatura para la cepa *Esmeraldo* por lo que obtuvimos su secuencia de la base de datos del NCBI. Con esta secuencia teórica se diseñaron dos oligonucleótidos que incluían el ATG iniciador y el terminador, pero en este caso se utilizó un sistema de clonaje y purificación llamado "LIC cloning". Este sistema utiliza un proceso de clonaje independiente de ligación el vector pCAL-n-EK. El vector incluye un péptido de unión a calmodulina que se fusiona a el extremo amino de la proteína permitiendo su purificación, utilizando una resina con afinidad por la calmodulina. Se crea una unión entre la secuencia que codifica para la proteína de interés y el sitio de reconocimiento específico de la enteroquinasa (EK). La secuencia de reconocimiento de la EK (consistente en 4 aspárticos seguidos de una lisina (Asp)₄-(Lys)) se encuentra entre el péptido de unión a calmodulina (CBP) y el extremo amino de la proteína de interés. Se detalla el sistema completo en la figura 12.

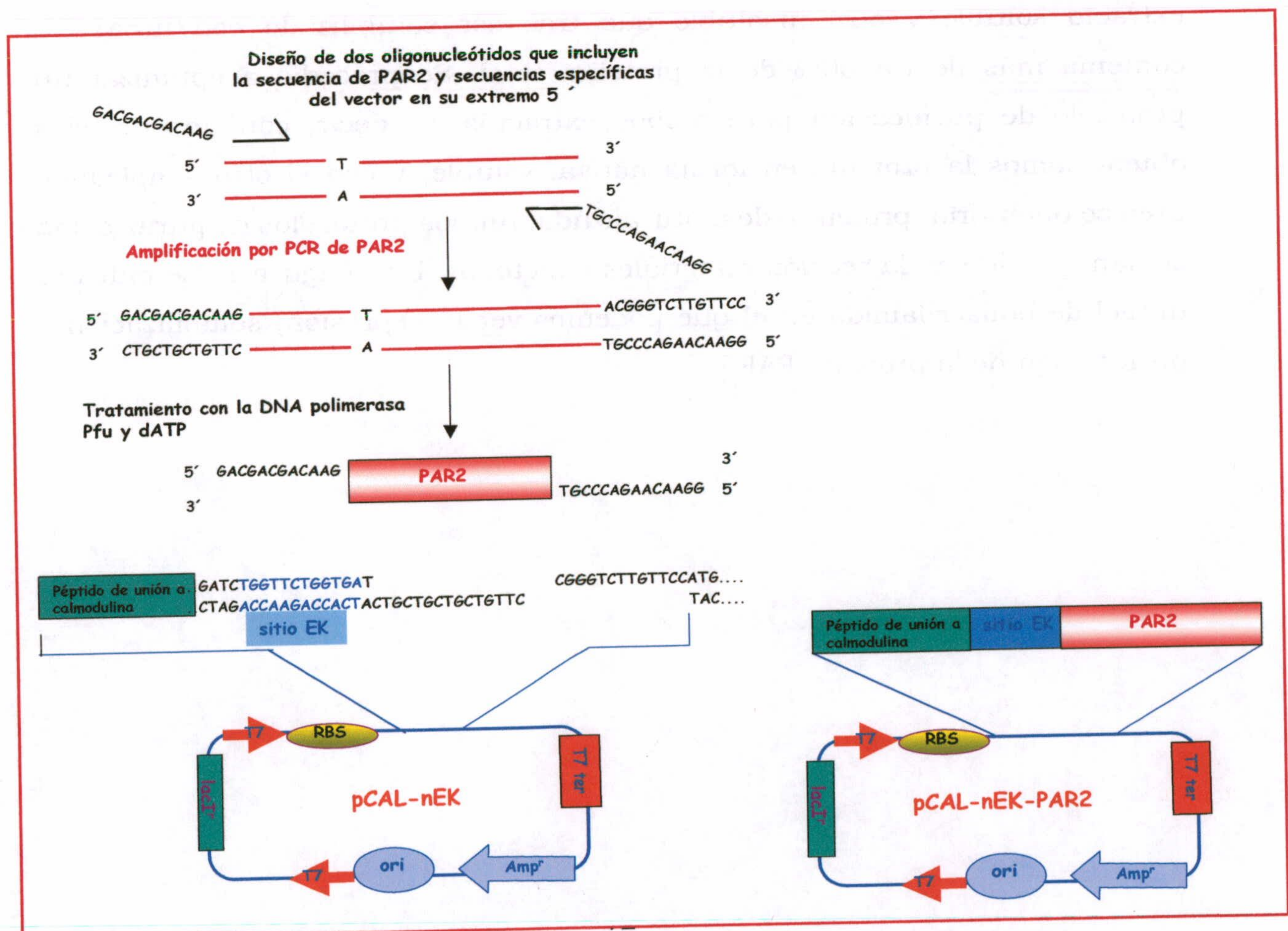


Figura 12.-Clonaje y expresión de la proteína PAR2 en el vector pCAL-n-EK (Se detalla el esquema de este vector que incluye el péptido de unión a calmodulina, sitio de reconocimiento de la enteroquinasa y además está diseñado para un clonaje independiente de ligación. Se diseñó unos cebadores que incluyen secuencias específicas del vector en su extremo 5' de forma que una vez amplificado el gen de interés, se trata con una polimerasa y dATP y por simple emparejamiento de bases se obtiene el vector con el inserto. En nuestro caso el plásmido pCAL-n-EK-PAR2.

El fragmento clonado se secuenció observándose ciertos cambios en secuencia de nucleótidos con respecto a la PAR2 de la cepa *Esmeraldo*. Una vez secuenciado este plásmido se optimizó la expresión de la proteína recombinante PAR2, con el empleo de concentraciones crecientes del agente inductor (IPTG) y distintos tiempos de inducción. Llegados a este punto se comprobó la solubilidad de esta proteína en distintos tampones. En este caso se consiguió parte de la proteína en forma soluble aunque la mayoría quedaba en cuerpos de inclusión, que se solubilizaron nuevamente empleando urea a altas concentraciones (8M). De este modo para cada cultivo se obtenía un extracto soluble y otro insoluble que tras ser solubilizado con urea 8M, contenía más de un 50% de la proteína total. Se procedió a optimizar un protocolo de purificación para ambos extractos, es decir, con uno de ellos obtendríamos la proteína en forma nativa, soluble, y con el otro, empleando urea se obtendría proteína desnaturada. Ambos protocolos de purificación se han incluido en la sección materiales y métodos. En la figura 13 se muestra un gel de poliacrilamida en el que podemos ver la expresión, solubilización y purificación de la proteína PAR2.

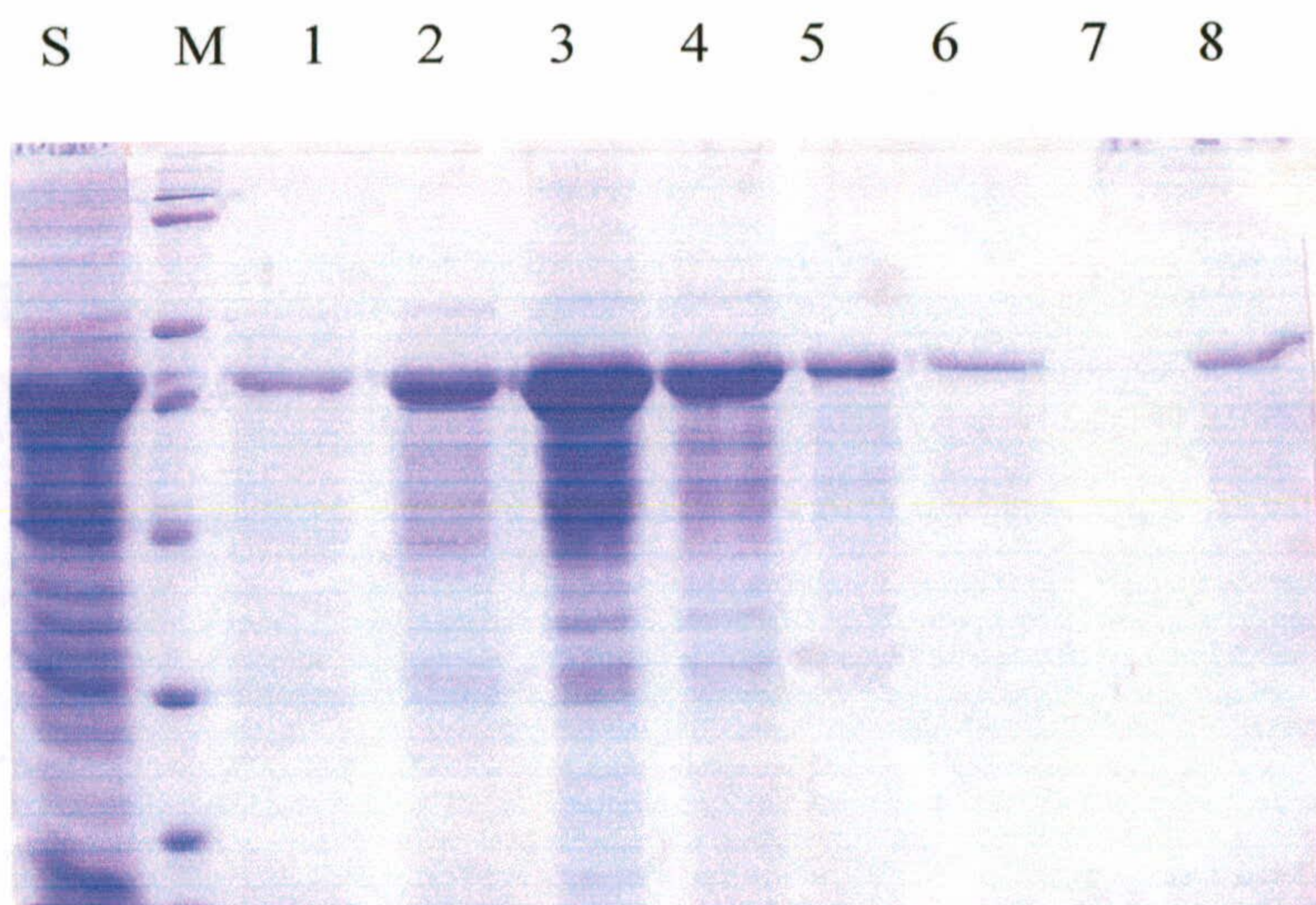


Fig13.-Gel de PAR2 : Expresión, solubilización, purificación. S: solubilización en tampón fosfato. M: marcador de proteínas. 1: Lavados a pH8; 2:Lavados a pH7; 3: lavados a pH=6; 4: pH5; 5,6,7,8 :Eluciones a pH4

Estas proteínas purificadas fueron dializadas y pasadas por un filtro de 0,22 μm para su esterilización y posterior utilización como antígeno en diversos experimentos realizados en esta tesis, básicamente en ensayos de ELISA y linfoproliferación.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
13 NOV. 2003
DEPARTAMENTO DE DOCTORADO

4.2.-Obtención de anticuerpos policlonales anti-PAR1 y anti-PAR2.

Como se comenta en la sección materiales y métodos se obtuvieron dos tipos de anticuerpos frente a cada una de estas proteínas. Por una parte se utilizaron las proteínas completas en la inmunización y por otra algunos de los péptidos contenidos en las mismas.

Tras la sangría realizada 3 semanas tras la tercera inoculación, tanto con los péptidos como con la proteína , se realizaron las correspondientes ELISAS para determinar el título de estos anticuerpos. Asimismo se realizaron ensayos de western blot, en los que pudimos comprobar que estos anticuerpos reconocían de forma específica estas proteínas, cosa que no hacía el suero preinmune de estos animales.



... of the

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

4.2.-Antigenicidad de las proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en infección natural.

4.2.1.- Reconocimiento de las proteínas PAR1 y PAR2 por sueros de pacientes chagásicos.

Con el objeto de determinar si las proteínas recombinantes PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* eran reconocidas por sueros de pacientes chagásicos, se determinaron los niveles de anticuerpos frente a ambas proteínas en sueros de pacientes chagásicos (un total de 10) de distintas zonas geográficas, más concretamente de Colombia y Venezuela. Como controles se incluyen 6 sueros de individuos sanos. La determinación de los niveles de anticuerpos específicos tipo IgG frente a estas proteínas se realizó mediante la técnica de ELISA y el resultado obtenido se muestra en la figura 14:

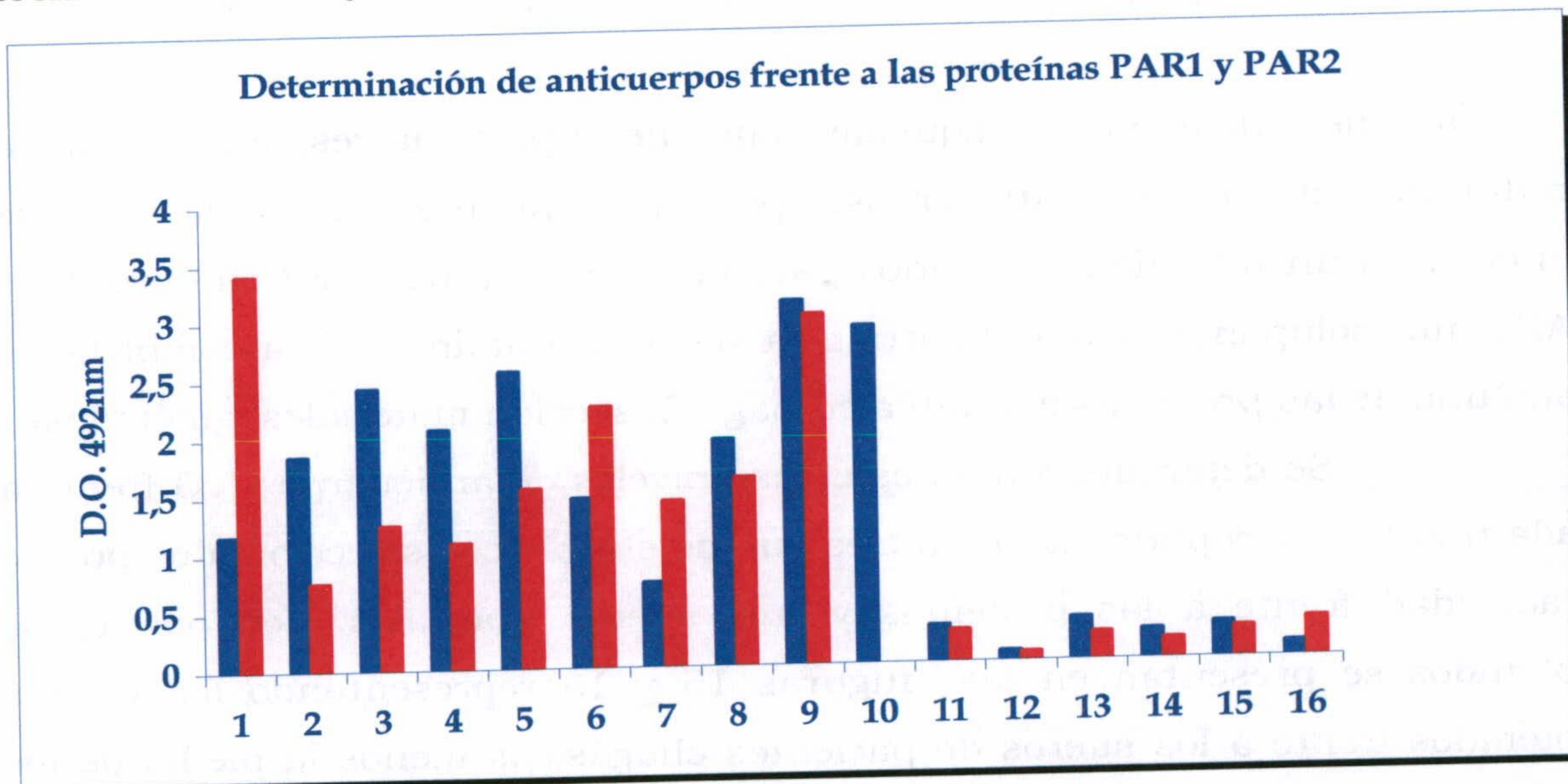


Figura 14.-Determinación de niveles de Ig G frente a la proteína PAR1 (barras azules) y PAR2 (barras rojas) en sueros de pacientes chagásicos (números del 1 al 10) y en sueros de individuos sanos (sueros del 11 al 16). Todos los sueros fueron ensayados a una dilución de 1/800.

Como se observa en la figura 14, tanto la proteína recombinante PAR1 como PAR2 son reconocidas por sueros de pacientes chagásicos, con valores de densidad óptica (D.O.) entre 1 y 3,5 según el paciente. Por el contrario en los sueros de individuos sanos, no se detectan anticuerpos de tipo IgG frente a ninguna de las dos proteínas, con valores de D.O. en ningún caso superiores

a 0,3 . Del análisis de los resultados obtenidos también se deduce que ambas proteínas no son reconocidas por igual, existiendo variaciones en los niveles de anticuerpos frente a cada una de ellas dependiendo del paciente. Así, un 70% de pacientes presenta mayor nivel de anticuerpos frente a la proteína PAR1 que frente a la PAR2. En algunos casos con valores muy diferenciales como es el caso del suero número 5 con valores de D.O. de 2.5 frente a PAR1 y 1.4 frente a PAR2. Sin embargo el suero del paciente P1 muestra un comportamiento muy diferente con valores de D.O. de 1 frente a la proteína PAR1 y en torno a 3 frente a la PAR2. Igualmente los sueros de los pacientes P6 y P7 muestran mayor nivel de anticuerpos frente a la proteína PAR2 que frente a PAR1.

4.2.2.-Análisis de los determinantes antigénicos contenidos en las proteínas PAR1 y PAR2.

Al objeto de delimitar aquellas zonas de la proteína responsables de la producción de estos anticuerpos, posibles epítopes antigénicos, se sintetizaron un total de 30 péptidos para la proteína PAR1 y 33 en el caso de PAR2, no solapantes y que recorrían la secuencia aminoacídica completa de cada una de las proteínas (ver tabla en pag 42, sección materiales y métodos).

Se determinaron en este caso niveles de anticuerpos IgG frente a cada uno de los péptidos frente a tres sueros chagásicos seleccionados por su reactividad frente a las proteínas y tres sueros normales. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 15 y 16 representando los valores obtenidos frente a los sueros de pacientes chagásicos menos la media de los valores obtenidos con los sueros normales más dos veces la desviación estándar.

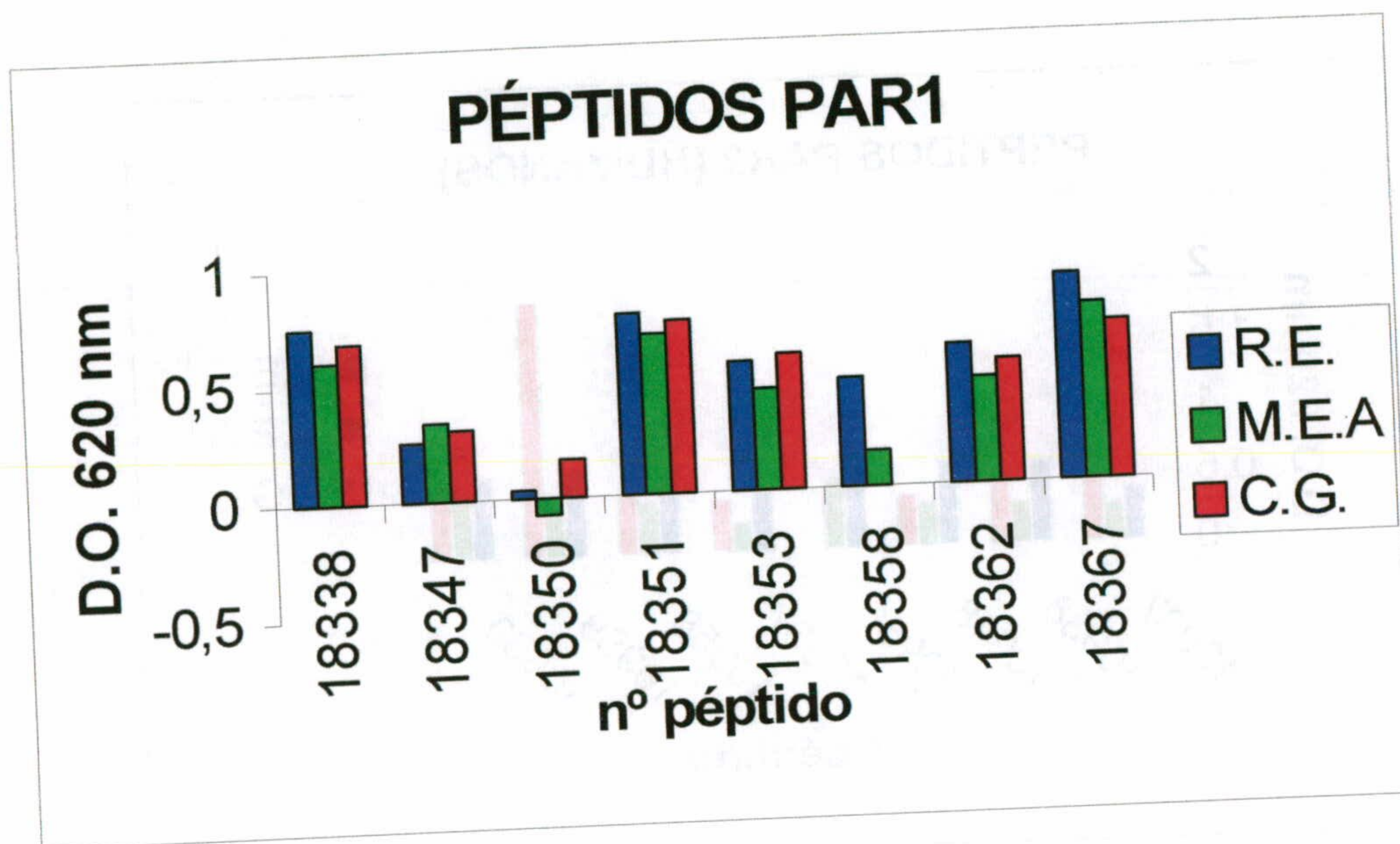


Figura 15: Resultados obtenidos mediante FAST-ELISA para determinación de Ig G en sueros de pacientes chagásicos (RE, MEA, CG) a una dilución 1/100, en el gráfico se presentan los valores de estos sueros - (valor medio de dos sueros normales + 2*desviación estándar), frente a los péptidos contenidos en la proteína PAR. No se muestran la totalidad de los péptidos ensayados (30) sólo aquellos que dieron valores de D.O. mayor que los sueros normales.

Como se puede comprobar en la figura 15, en el caso de PAR1 se localizaron 5 epítopes B, los péptidos 18338, 18351, 18353, 18362 y 18367. Estos péptidos corresponden a las regiones central, amino y carboxilo de la proteína.

En el gráfico 16 se muestran los resultados obtenidos frente a los péptidos de la proteína PAR2. Podemos comprobar en este caso que no existe ningún epítoto claramente reconocido por estos sueros. En la figura se representan los valores obtenidos para 3 sueros chagásicos, a los que se restó el valor medio de dos sueros normales más dos veces la desviación estándar.

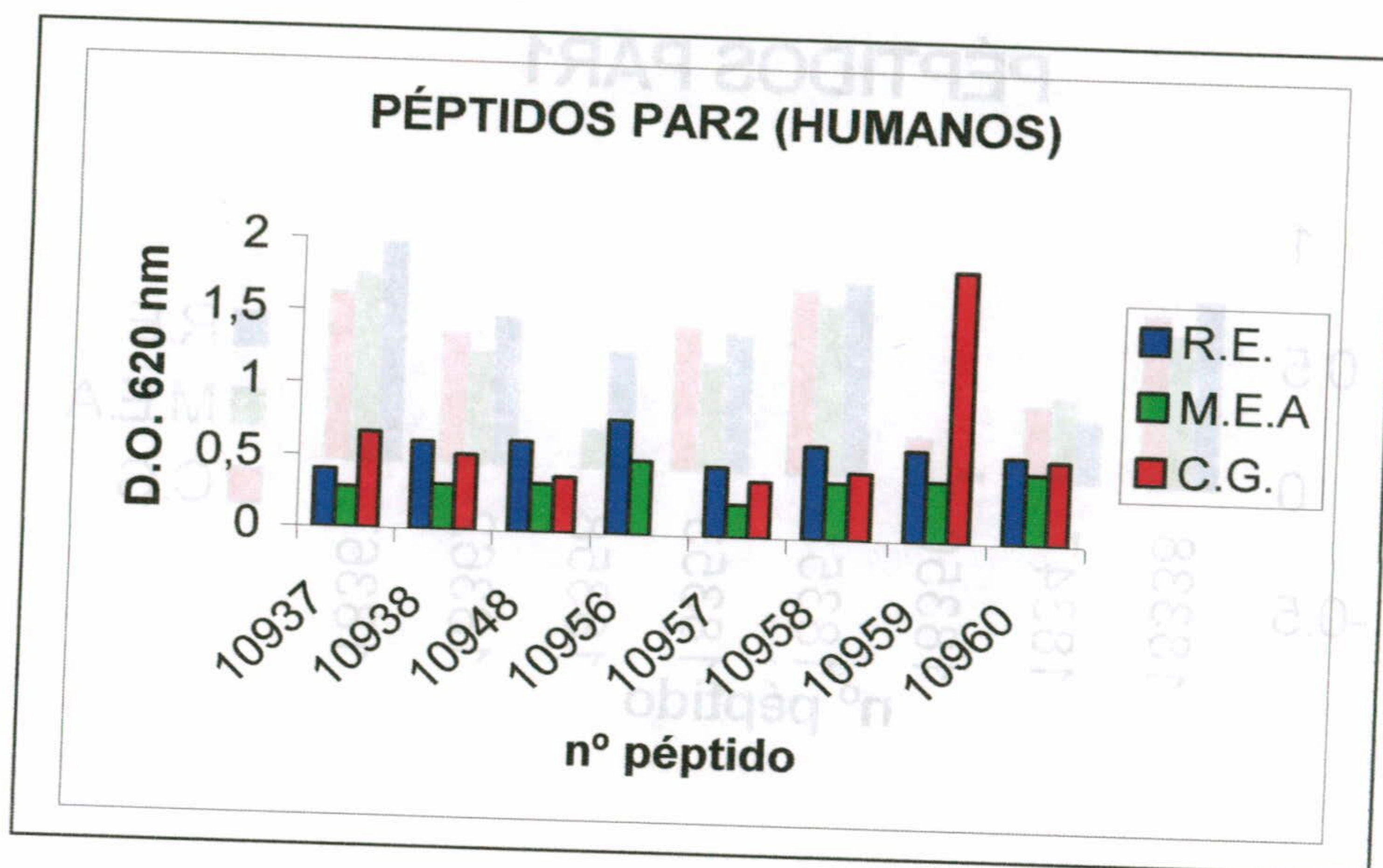


Fig 16.- Valores de Ig G frente a péptidos de la proteína PAR2. Resultados obtenidos mediante FAST-ELISA para determinación de Ig G en sueros de pacientes chagásicos (RE, MEA, CG) a una dilución 1/100, en el gráfico se presentan los valores de estos sueros – valor medio de dos sueros normales + 2 *desviación estándar, frente a los péptidos contenidos en la proteína PAR2. No se muestran la totalidad de los péptidos ensayados (33) sólo aquellos que dieron valores de D.O. mayor que los sueros normales.

En general comprobamos que los valores de D.O. obtenidos para los péptidos de PAR2 son más bajos que en el caso de PAR1. No podemos decir que existan epítopes B claros. Resulta llamativo el valor obtenido para uno de los sueros chagásicos (C.G.) frente al péptido 10959, sin embargo el resto son bastante homogéneos y nos indicarían un reconocimiento conformacional de la proteína.

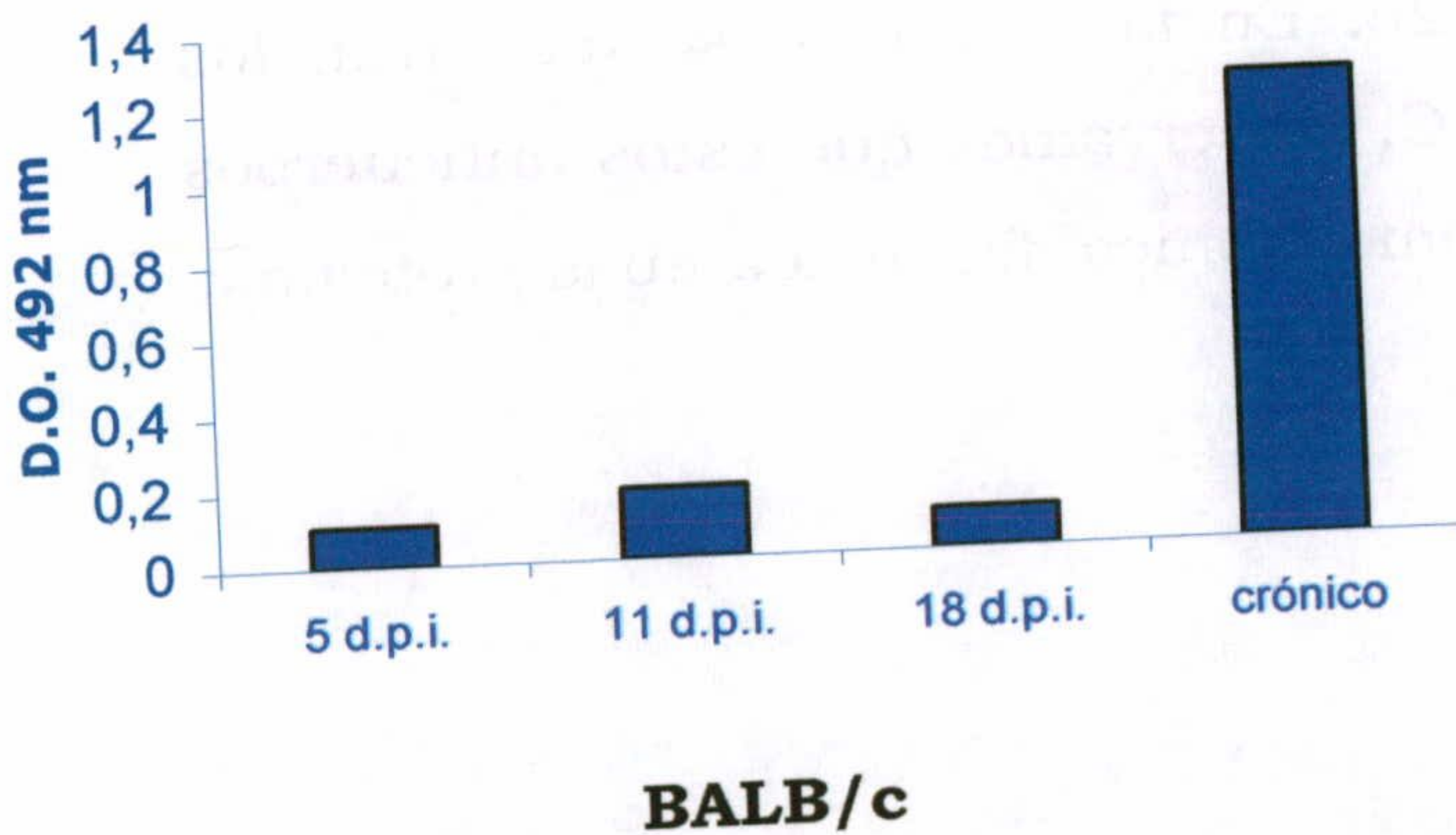
4.3.- Antigenicidad de las proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en infección experimental murina.

4.3.1.- Reconocimiento de las proteínas PAR1 y PAR2 por sueros de ratones infectados.

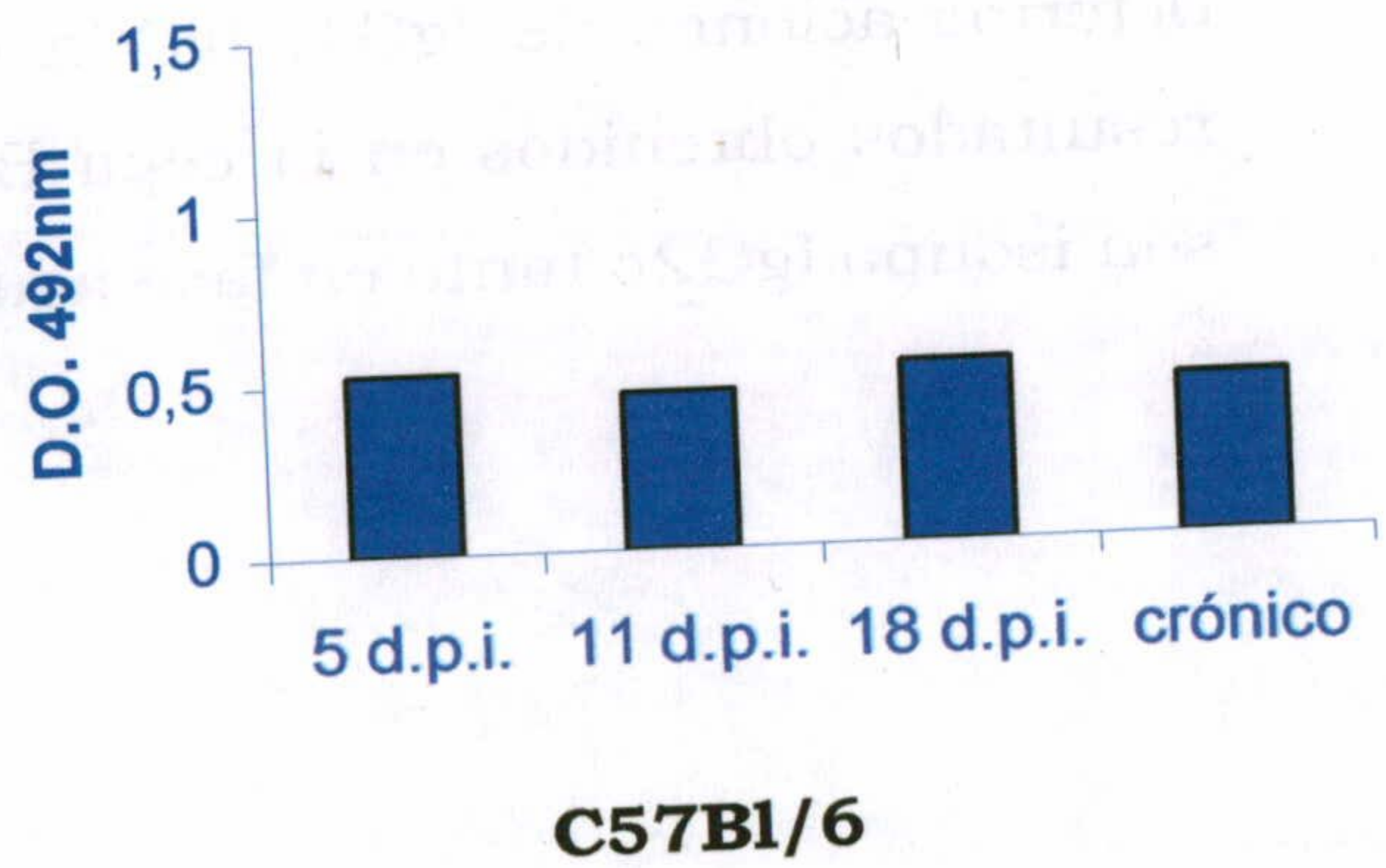
Dado que el modelo empleado para el estudio de la inmunogenicidad de estas proteínas en esta tesis doctoral es el murino, necesitábamos conocer la respuesta humoral frente a ambas proteínas en este modelo, antes de comenzar los ensayos de vacunación y comprobar que los resultados obtenidos en el modelo murino serían extrapolables a lo que sucede en humanos. Así, se infectaron ratones de las cepas C57Bl/6 descritos como modelo de resistencia a la infección por *T. cruzi*, y ratones de la cepa BALB/c como modelo de susceptibilidad.

Grupos de 3 ratones fueron infectados intraperitonealmente con formas tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y. Se realizó un seguimiento de la parasitemia de estos ratones mediante conteo en cámara de Neubauer de las formas tripomastigotes presentes en el suero de dichos ratones. Tres meses postinfección se realizó una nueva punción ocular para obtención de suero de forma que se analizaron niveles de Ig G en fase aguda y crónica, frente a las proteínas PARs en ambas cepas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17.

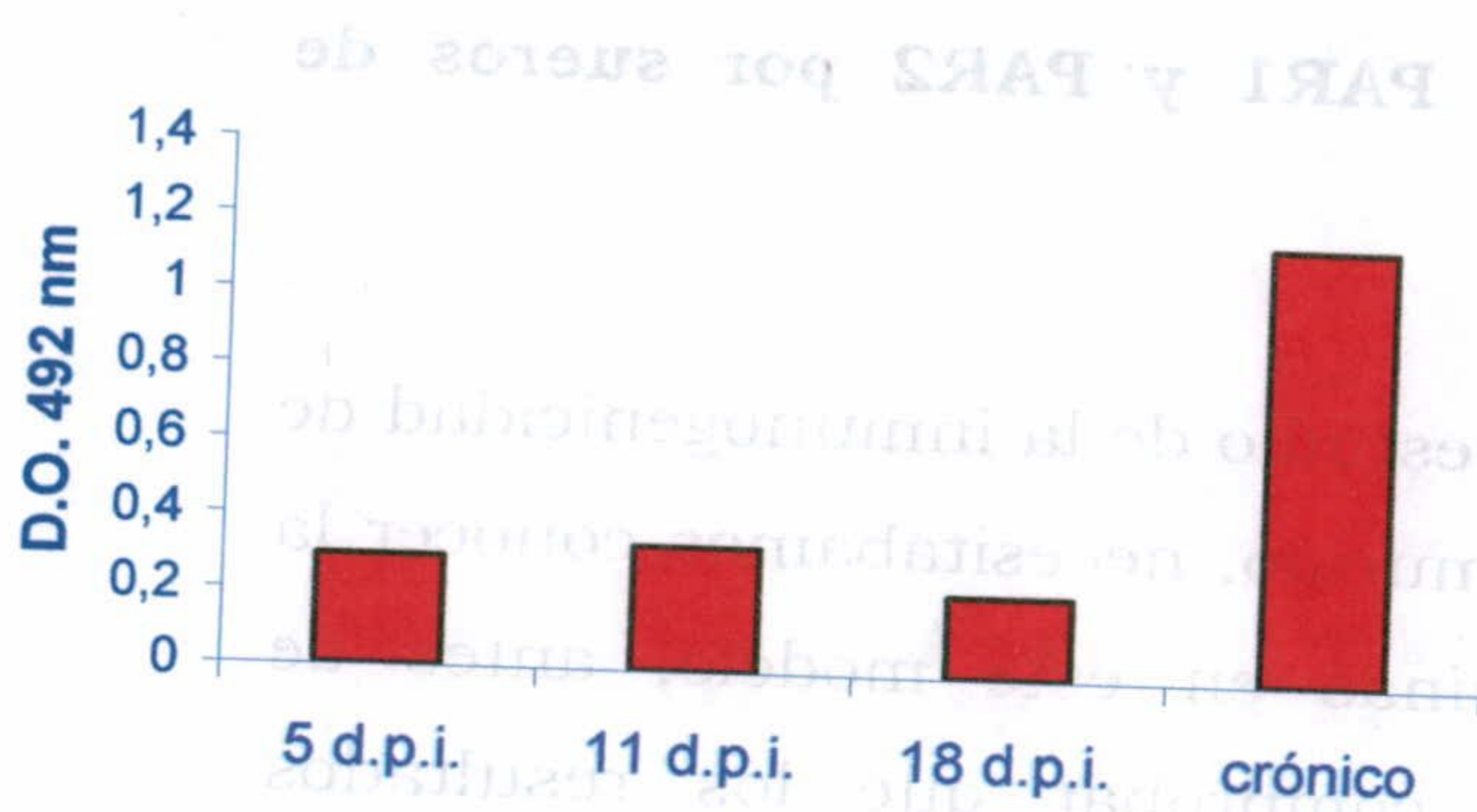
A.1.



A.2.



B.1.



B.2.

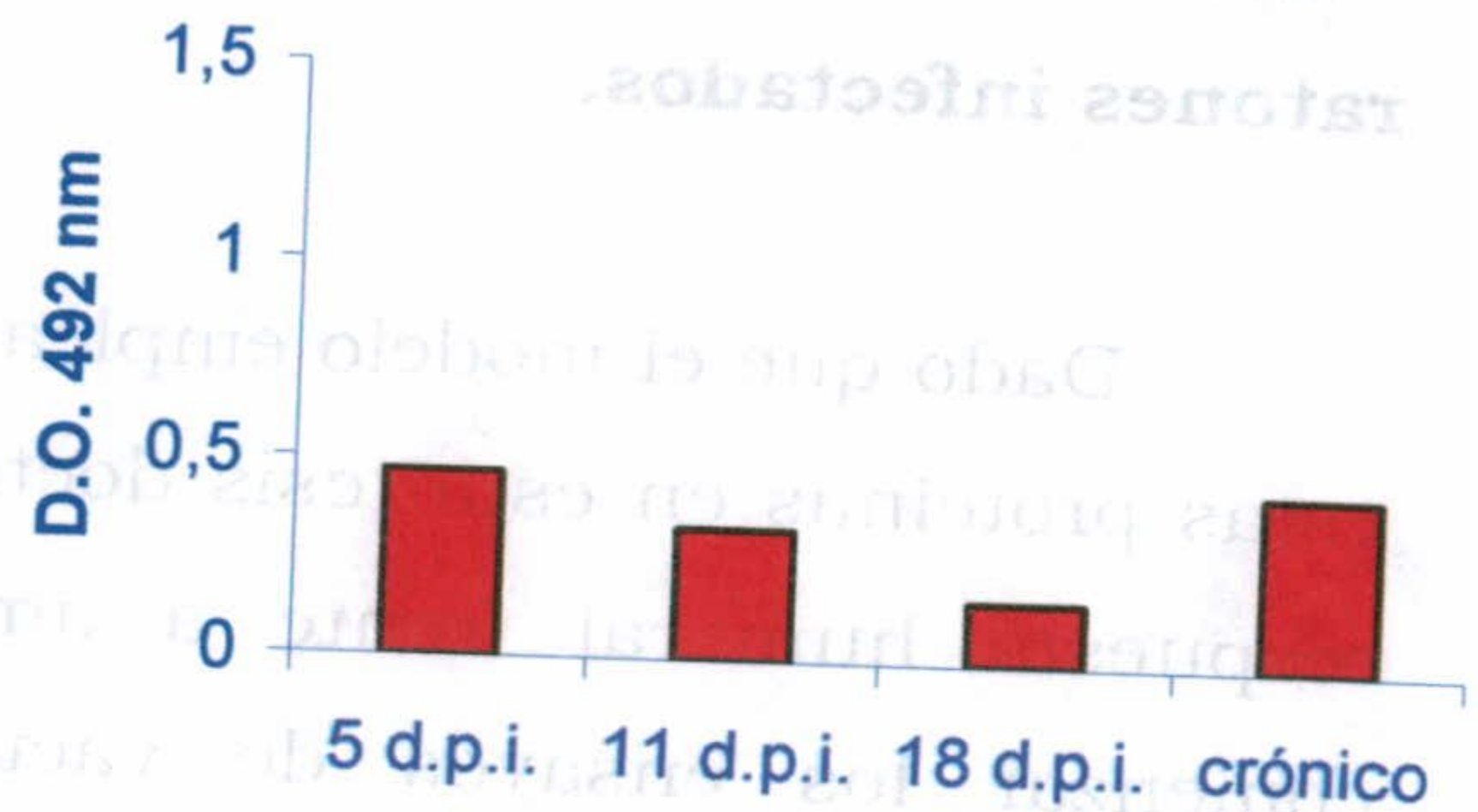


Figura 17.- Determinación de niveles de Ig G frente a las proteínas PAR1 (barras azules) y PAR2 (barras rojas) en ratones de las cepas BALB/c (paneles de la izquierda A1 y B1) y C57 Bl/6 (A.2 y B.2) infectados. Se representa un seguimiento de la fase aguda con sangrías los días 5, 11 y 18 post infección (d.p.i.) y el análisis de los sueros de fase crónica.

En este caso se observa un comportamiento similar frente a las proteínas PAR1 y PAR2. Comprobamos que en la cepa BALB/c los niveles de Ig G no son muy elevados durante la fase aguda (hasta 18 días postinfección) y aumentan de forma considerable en la fase crónica. Por el contrario en la cepa C57BL/6 los niveles de IgG tanto frente a PAR1 como frente a PAR2, son más o menos similares en las dos fases, no existiendo un cambio importante entre las fases agudas y crónica de la enfermedad.

A la vista de estos resultados, nos planteamos determinar el isotipo de estos anticuerpos, durante la infección experimental. Se realizaron determinaciones de IgG1, IgG2a e IgG2b. En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos en la cepa BALB/C. Observamos que estos anticuerpos son isotipo IgG2b tanto en fase aguda como crónica, frente a ambas proteínas:

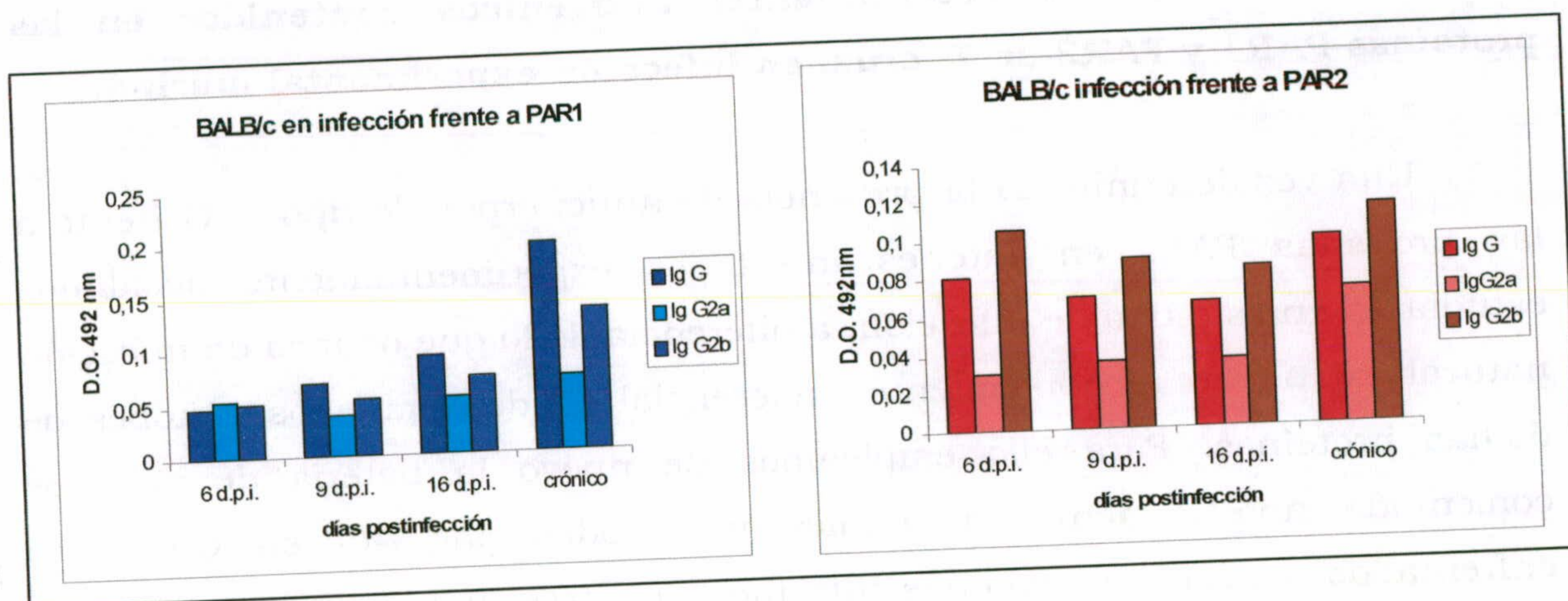


Fig18.- Determinación del isotipo de anticuerpos Ig G frente a la PAR1 (en azul) y a la PAR2 (en rojo) durante la infección en la cepa BALB/c . Se muestran en los gráficos niveles de IgG, IgG2a e IgG2b. Los sueros fueron ensayados a una dilución de 1/100.

Los resultados obtenidos en la cepa C57BL/6 fueron muy similares a estos y se muestran en la figura 19. Comprobamos que al igual que ocurrió en BALB/c estos anticuerpos IgG generados durante la infección frente a las proteínas PARs, tanto frente a PAR1 como a PAR2, eran fundamentalmente del isotipo IgG2b.

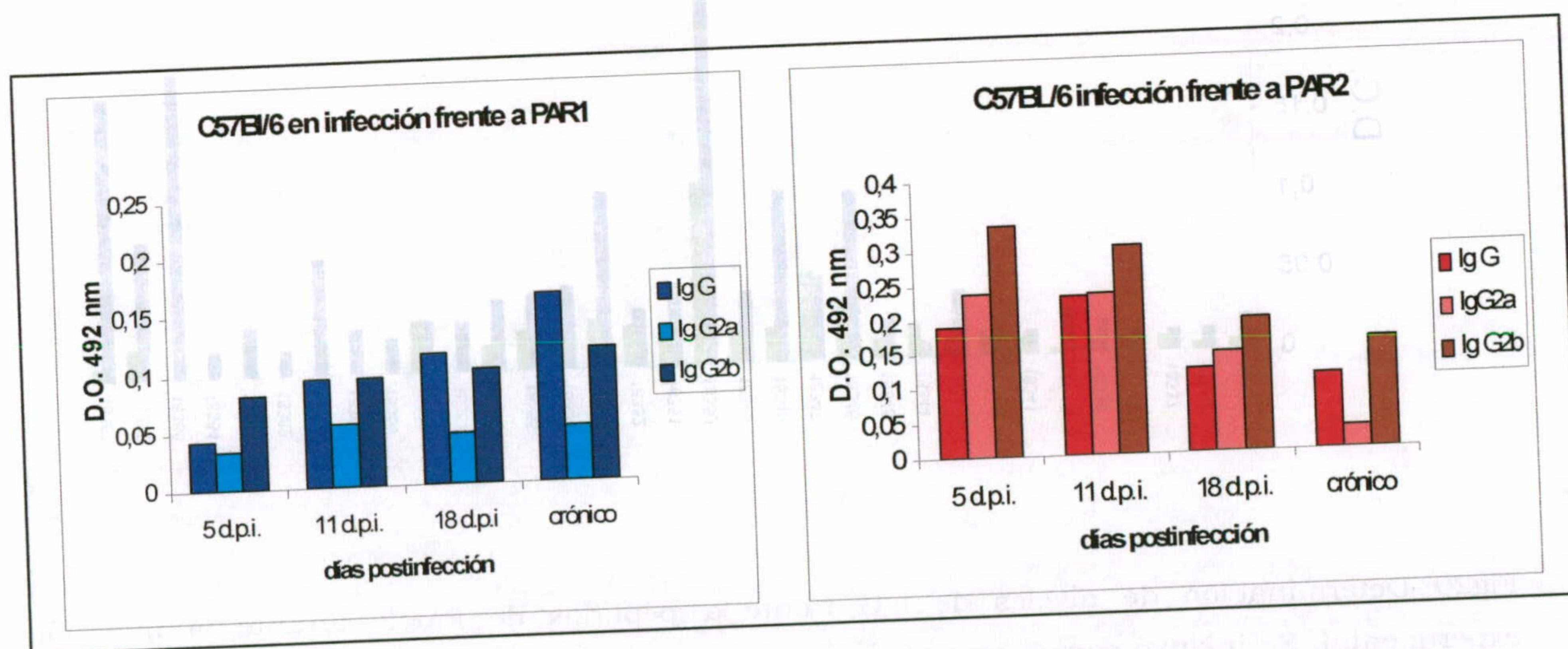


Fig 19.- Determinación del isotipo de anticuerpos Ig G frente a la PAR1 (en azul) y a la PAR2 (en rojo) durante la infección en la cepa C57BL/6 . Se muestran en los gráficos niveles de IgG, IgG2a e IgG2b. Los sueros fueron ensayados a una dilución de 1/100.

4.3.2.- Análisis de los determinantes antigénicos contenidos en las proteínas PAR1 y PAR2 de *T. cruzi* en infección experimental murina.

Una vez determinada la presencia de anticuerpos de tipo Ig G frente a las proteínas PARs en ratones infectados experimentalmente decidimos estudiar si en este tipo de infección, a diferencia de lo que ocurría en infección natural existía un reconocimiento preferencial de determinados epítopes de dichas proteínas. Para ello empleamos de nuevo la batería de péptidos comentada anteriormente (materiales y métodos pag 46) en este caso enfrentados a sueros de ratones infectados en fase aguda. En esta ocasión para simplificar el estudio utilizamos una sola cepa, los ratones BALB/c. En las figuras 20 y 21 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de FAST-ELISA :

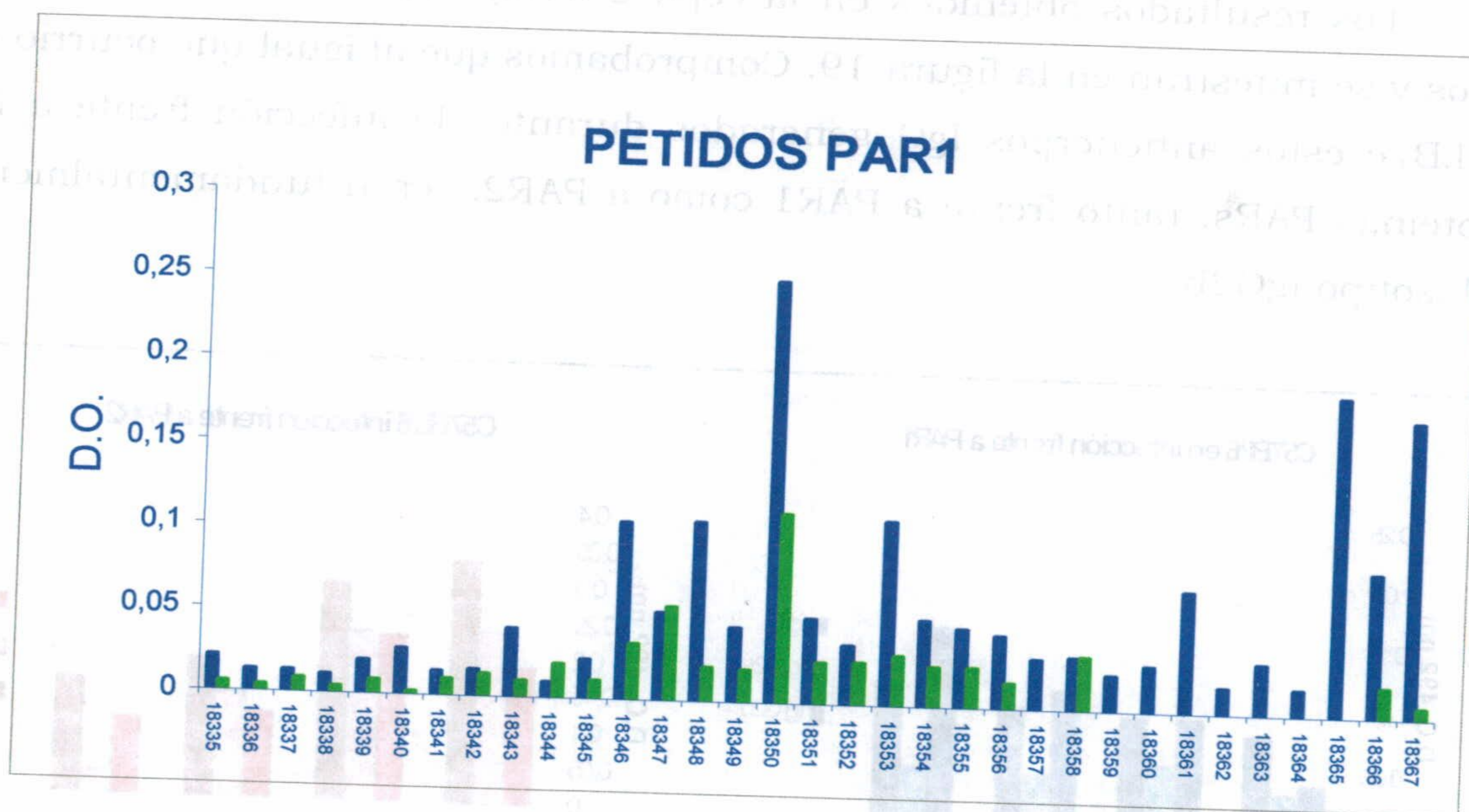


Fig20.-Determinación de niveles de IgG frente a péptidos de PAR1 durante la infección experimental. Se incluyó como control negativo el suero de un ratón no infectado (en verde) y como suero problema (en azul) empleamos una mezcla de 3 sueros de ratones en fase aguda de la infección (14 días postinfección).

A la vista de estos resultados podemos decir, que a pesar de no obtenerse valores de D.O. muy elevados, sí se observan ciertos epítopes que son reconocidos de forma preferencial durante la fase aguda de la infección,

concretamente el péptido 18350 localizado en la zona central de la proteína si parece ser un epítipo B, y en la región carboxilo terminal localizamos otros tres péptidos que podemos considerar positivos, el 18365, 18366 y el 18367.

Con estos mismos sueros de ratones en fase aguda (14 días postinfección) se realizó una ELISA (FAST-ELISA), frente a los péptidos de PAR2, incluyendo igualmente un suero control, de un ratón no infectado para poder discriminar posibles reacciones inespecíficas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21.

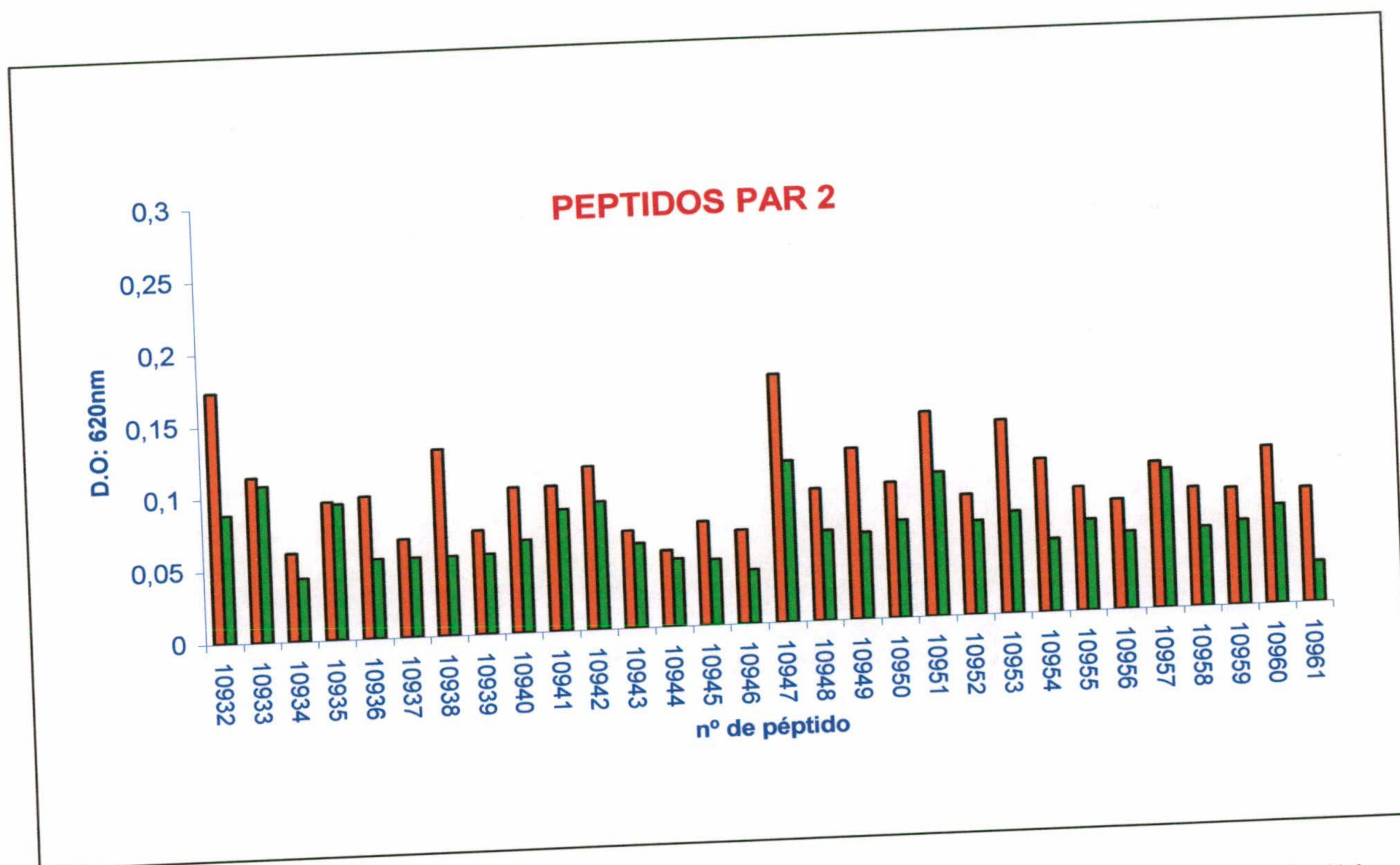


Fig 21.-Reconocimiento de péptidos de PAR2 por sueros de ratones infectados en fase aguda (14 días postinfección). Se realizó una mezcla del suero de 3 ratones infectados (barras en rojo) y se incluyó como control el suero de un ratón que no había sido infectado (barras en verde). Los sueros fueron ensayados a una dilución de 1/100.

Como se observa en la figura 21 en el caso de la proteína PAR2 no podemos decir que existan epítipoes B. Los valores obtenidos son bajos y muy similares a los que se obtienen frente a el suero control. Por tanto, no parece que exista un reconocimiento preferencial de determinados epítipoes de PAR2 durante la infección, al menos durante la fase aguda.

concentración de péptido 18250 localizado en la zona control de la proteína se parece ser un epítopo B, y en la región carboxilo terminal localizamos tres péptidos que podrían estar en contacto con el 18305, 18306 y el 18307.

Con estos mismos sueros de animales vacunados (14 días postinfección) se realizó una ELISA (EAST-EAST) entre los péptidos de P/R2, incluyendo igualmente un suero control de un ratón no infectado para poder discriminar posibles reacciones inespecíficas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.



El resultado de la prueba de ELISA con sueros de ratones control y de ratones infectados con el virus de la rabia en diferentes días postinfección (14 días) se muestra en la figura 3. Los resultados obtenidos son los que se muestran en la tabla 3. Como se puede observar, los resultados de la prueba de ELISA son similares a los obtenidos en la prueba de Western blot.

Como se puede observar en la figura 3, el caso de la proteína PAR2 en ratones de la zona control y en ratones infectados son bajos y similares a los que se obtienen también en el suero control. Por tanto, no parece haber un reconocimiento preferencial de determinados epítopos de PAR2 durante la infección, si bien durante la fase aguda.

4.4.- Diseño de una vacuna genética basada en la utilización de los genes PAR1 y PAR2 de *T. cruzi*. Papel inmunomodulador de la proteína HSP70.

Con objeto de determinar la capacidad de estas proteínas para generar una respuesta inmune protectora frente a la infección por *T. cruzi*, decidimos utilizarlas en forma de vacuna genética. Como se ha comentado en la introducción, este tipo de vacunas presenta una serie de ventajas con respecto a las vacunas proteicas clásicas. Además dado el papel inmunomodulador propuesto para la proteína HSP70 de *T. cruzi*, se generaron dos construcciones adicionales, en las que en forma de proteína de fusión se incluirían los genes de las proteínas PARs y el de la proteína HSP70. Esto nos permitiría comprobar la respuesta generada por estas proteínas aisladas y además estudiar el posible papel adyuvante de la proteína HSP70.

Como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, se realizarían 4 inyecciones vía intramuscular con cada una de las construcciones, incluyendo dos grupos control. En todos los ensayos un grupo de ratones se inoculó con solución salina y otro con el vector vacío, ya que se ha descrito que este vector *per se* tiene un efecto estimulador del sistema inmune.

4.4.1.- Construcción de vectores vacuna de DNA.

Para comenzar los ensayos de inmunización necesitábamos clonar estos genes en un vector de expresión eucariota. Se seleccionó el vector pCMV4 derivado del pcDNA3.1. Partimos de los clones obtenidos previamente en vectores de expresión procariota. Sobre ellos se realizó una amplificación por PCR de ambos genes, en esta ocasión para eliminar el terminador de la secuencia, de forma que nos permitiese generar las fusiones PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70. Por otra parte se utilizó el vector pCMV4.11-HSP70 del que se eliminó mediante digestión el gen de la KMP11 para incluir por un lado el gen PAR1 y por otro PAR2. El proceso de clonaje se resume en la siguiente figura (Fig 20).

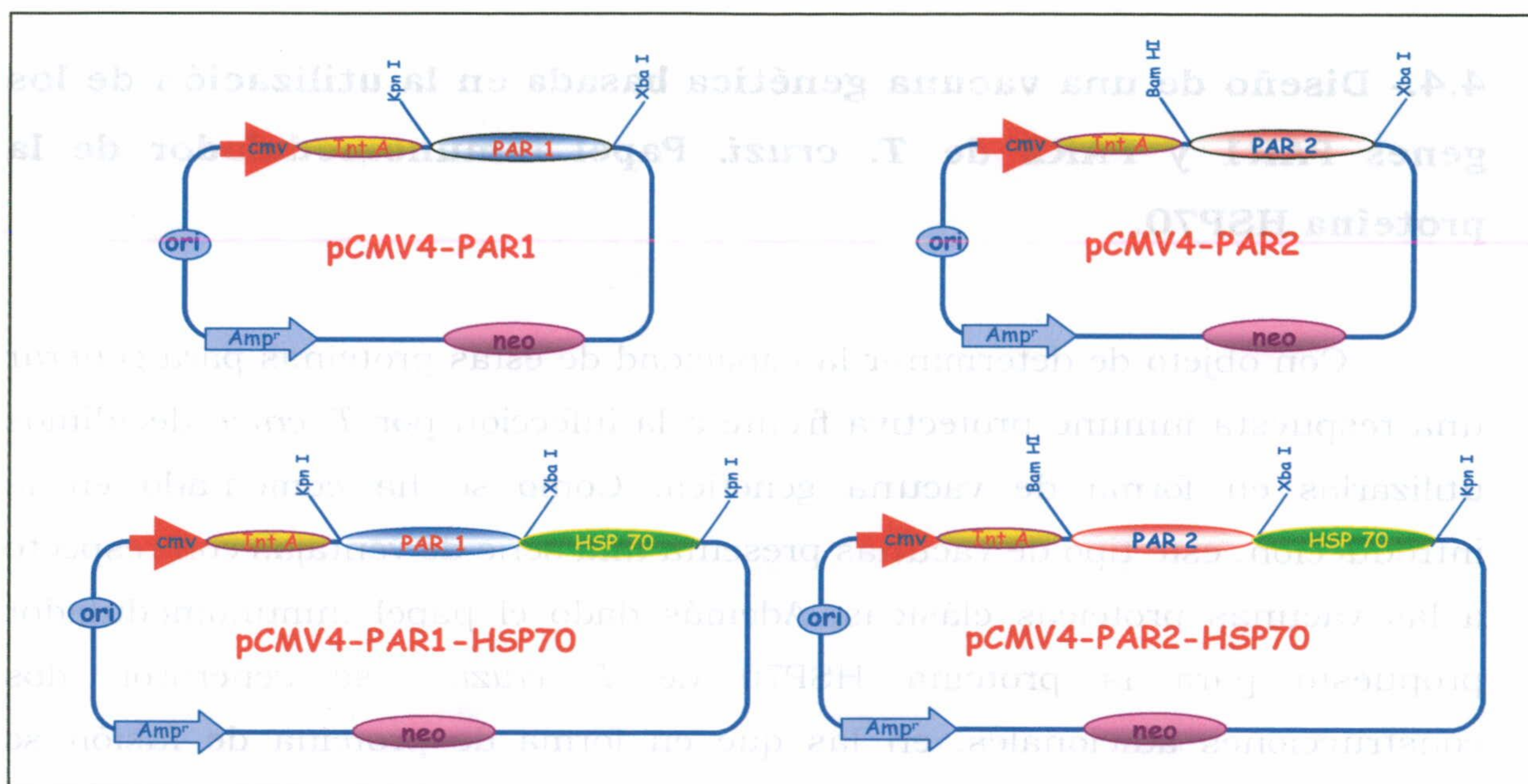


Fig 20.- Constructos de las proteínas PAR1, PAR2, PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70 en el vector pCMV4.

Estos vectores recombinantes fueron secuenciados para comprobar que contenían las secuencias codificantes para las proteínas PARs y en el caso de los clones PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70, para corroborar que ambas secuencias se encontraban en fase.

4.4.2.-Expresión de los genes PAR1 y PAR2 tanto aislados como fusionados al gen de la HSP70 (PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70) en células de mamífero.

Con el fin de cerciorarnos de que los cuatro constructos eran capaces de expresar correctamente las proteínas en células eucariotas, se realizó una transfección transitoria utilizando lipofectina en células COS-7 (línea fibroblastoide de mono). Estas células en estado de semiconfluencia fueron transfectadas con 1µg de DNA en cada pocillo en placas de 24 pocillos (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por transfección). Se recogieron los cultivos a distintos tiempos (24, 48 y 60 horas) con objeto de determinar el tiempo de máxima expresión y se realizó un gel de proteínas al 10% en el que se cargó un total de 40µg de cada uno de los extractos. Este gel se transfirió a una membrana de PDVF, que fue incubada con los dos anticuerpos policlonales (anti-PAR1 y anti-PAR2) obtenidos en conejo. Se incluyó como control un carril en el que se cargaron extractos de células transfectadas con el vector vacío.

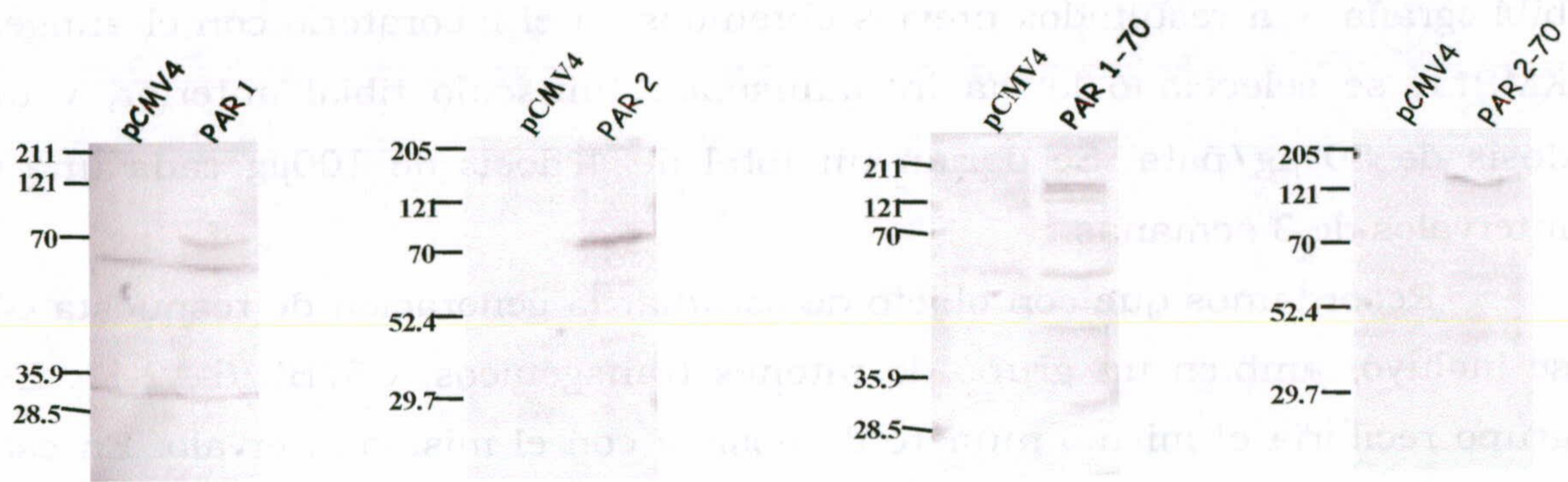


Fig 21.- Chequeo de la expresión de los constructos en células cos-7. Westerblot de extractos de células transfectadas con el vector vacío (pCMV4) y con cada una de las proteínas. Tiempo seleccionado 60 horas. Se omiten los otros dos tiempos siendo la expresión similar aunque menor a 24 y a 48 horas. En las membranas de PAR1 y PAR1-HSP70 se empleó un anticuerpo de conejo anti-PAR1 a una dilución 1/1000. En el caso de PAR2 y PAR2.HSP70 se utilizó un anticuerpo antipeptido de PAR2 a esta misma dilución. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-Ig G de conejo a la dilución recomendada por el fabricante 1/5000.

Llegados a este punto procedimos a purificar estas 4 construcciones así como el vector vacío, pCMV4, que sería empleado como control negativo en los ensayos de vacunación. La purificación de los plásmidos libres de endotoxinas como se comentó en el apartado correspondiente de materiales y métodos se realizó con un kit comercial (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se resuspendió el DNA resultante en solución salina estéril, determinándose su concentración mediante espectrofotometría (D.O. 260nm) y finalmente todos ellos se dejaron en una solución que contenía 1µg de plásmido/ml.

4.4.3.-Vacunación con el DNA que codifica para las proteínas PARs y las fusiones PARs-HSP70. Modelo experimental.

Como ya se ha mencionado, en los ensayos de vacunación empleamos ratones de dos cepas distintas: C57BL/6 como modelo de resistencia a la infección por *T. cruzi* y BALB/c como modelo de susceptibilidad. De forma general en cada uno de los ensayos se incluía un mínimo de 4 ratones por grupo, y un total de 6 grupos. Por una parte como controles un grupo de ratones inoculados con solución salina, y otro de ratones inoculados con el vector vacío pCMV4. Los otros 4 grupos correspondían a cada una de las

construcciones (PAR1, PAR2, PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70). En base a la bibliografía, y a resultados previos obtenidos en el laboratorio con el antígeno KMP11, se seleccionó la vía intramuscular, músculo tibial anterior, y una dosis de 50 µg/pata. Se darían un total de 4 dosis de 100µg cada una en intervalos de 3 semanas.

Recordamos que con objeto de estudiar la generación de respuesta CTL se incluyó también un grupo de ratones transgénicos, C57BL/6-A2-K^b. Este grupo recibiría el mismo número de dosis y con el mismo intervalo. En estos ratones la presentación de péptidos en moléculas de clase I sería similar a la que tiene lugar en humanos (las hélices α1 y α2 de esta molécula son humanas) y la transducción de señales al interior celular, se produce mediante la hélice α3 murina. De esta forma los resultados obtenidos con este modelo sería extrapolables a lo que ocurre en humanos siendo el A*0201 es uno de los más frecuentes en pacientes de Chagas. Para evaluar la antigenicidad de las proteínas PARs empleadas como vacuna genética, se realizó un estudio tanto de respuesta humoral como de respuesta celular.

4.4.3.1.-Respuesta humoral inducida por las proteínas PARs en vacunas DNA. Análisis de determinantes antigénicos.

Como se ha descrito anteriormente, estas proteínas son altamente antigénicas. Así, hemos comprobado que tanto en infección natural (pacientes con chagas crónico) como en la infección experimental en modelo murino, se generan en el huésped altos niveles de anticuerpos frente a ambas proteínas. Ahora nuestro interés era estudiar la capacidad inmunogénica de las proteínas determinando la producción de anticuerpos frente a las mismas tras la inmunización de ratones con los vectores conteniendo los genes codificantes para las mismas.

Así, los ratones inmunizados fueron sometidos a una serie de sangrías a lo largo de todo el proceso. Estas sangrías se realizaron tras cada una de las inoculaciones con objeto de realizar un seguimiento de los niveles de anticuerpos si los hubiese, tras cada una de las dosis, y a largo plazo, 10 semanas tras la última dosis, para determinar la duración de los mismos.

4.4.3.1.1.-Respuesta humoral frente a la proteína PAR1 y PAR1-HSP70.

Los niveles de anticuerpos, tanto Ig M como IgG fueron evaluados en ambas cepas, BALB/c y C57BL/6 para comprobar si existía diferencia dependiendo del haplotipo. Estas determinaciones se realizaron mediante la técnica de ELISA y para ello se empleó una mezcla de sueros de 4 ratones de cada grupo. Aunque este ensayo se repitió tres veces con cada una de las cepas se muestran a continuación los gráficos correspondientes a uno de estos ensayos, siendo bastante similares en todos los casos para los ratones de un mismo grupo.

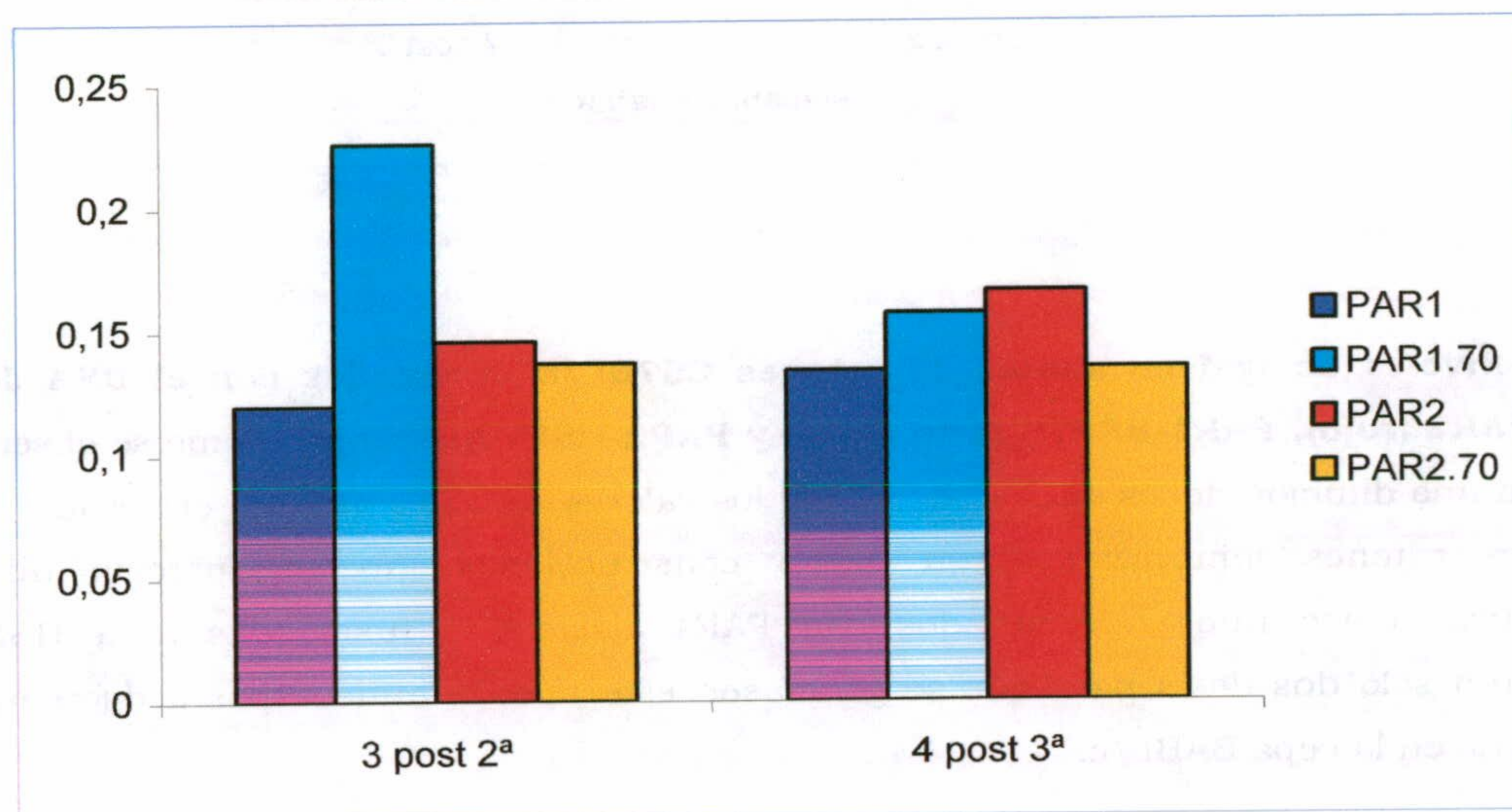


Fig22.-Niveles de IgM en sueros de ratones BALB/c vacunados con el DNA de PAR1 (azul), PAR2 (rojo), PAR1-HSP70 (azul claro) y PAR2-HSP70(naranja). Como se observa en el gráfico, a una dilución de 1/100 se obtuvieron valores de D.O.a 492 nm en torno a 0.2 para todos los ratones inmunizados con las 4 construcciones. No se aprecian diferencias significativas entre ratones vacunados con PARs aisladas o fusionadas a la HSP70. Cabe mencionar que se necesitaron al menos tres dosis para que se generasen este tipo de anticuerpos.

A pesar de no ser valores muy elevados estos anticuerpos de tipo IgM podrían ser indicativos de una activación de linfocitos T.

En aproximadamente los mismos puntos de tiempo, a lo largo del ensayo, se realizó la determinación de niveles de Ig M en sueros de ratones

C57BL/6 y asimismo en los ratones transgénicos C57BL/6-A2-K^b. Entre ambos no se apreciaron diferencias significativas en el nivel de anticuerpos generados por lo que sólo se muestra un gráfico indicativo de la cepa C57BL/6.

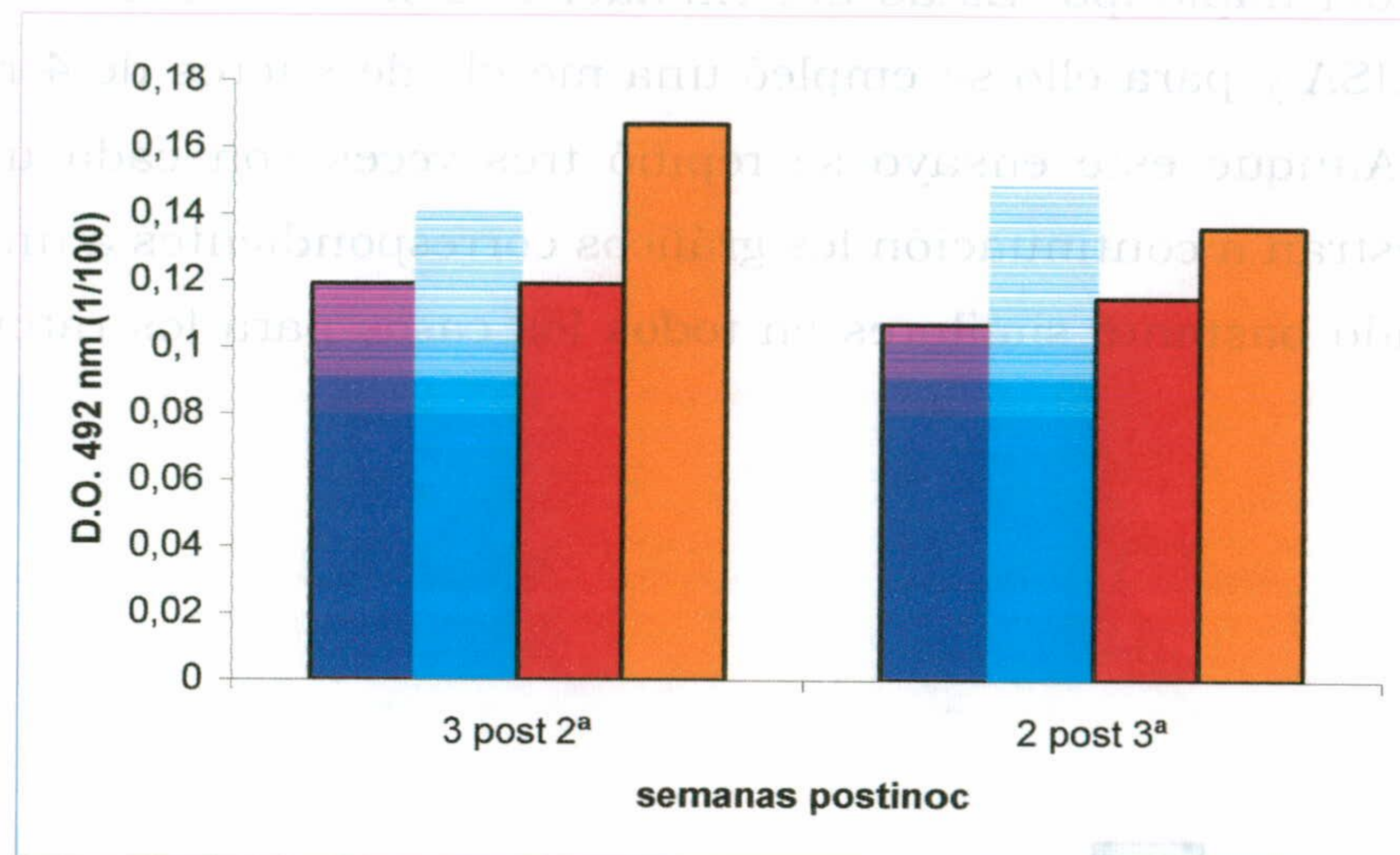


Fig 23.-Niveles de IgM en sueros de ratones C57BL/6 vacunados con el DNA de PAR1 (azul), PAR2 (rojo), PAR1-HSP70 (azul claro) y PAR2-HSP70(naranja). Como se observa en el gráfico, a una dilución de los sueros de 1/100 los valores de D.O.a 492 nm en torno a 0.2 para todos los ratones inmunizados con las 4 construcciones. No se aprecian diferencias significativas entre ratones vacunados con PARs aisladas o fusionadas a la HSP70. Se necesitaron sólo dos dosis para que se generasen este tipo de anticuerpos a diferencia de lo que ocurrió en la cepa BALB/c.

Tanto en ratones BALB/c como en C57BL/6 los niveles de inmuoglobulina IgM se observan tras dos dosis de DNA, siendo muy similares y en general unos niveles bajos. Estos anticuerpos tipo IgM serían indicativos de una activación de linfocitos T tras la inmunización con las proteínas PARs en forma de DNA.

Se procedió entonces a analizar los niveles de anticuerpos IgG en estos ratones inmunizados en distintos puntos de tiempo a lo largo del experimento. Igual que en el caso anterior se determinaron tanto en ratones BALB/c como en C57BL/6. Los resultados se muestran en los siguientes gráficos:

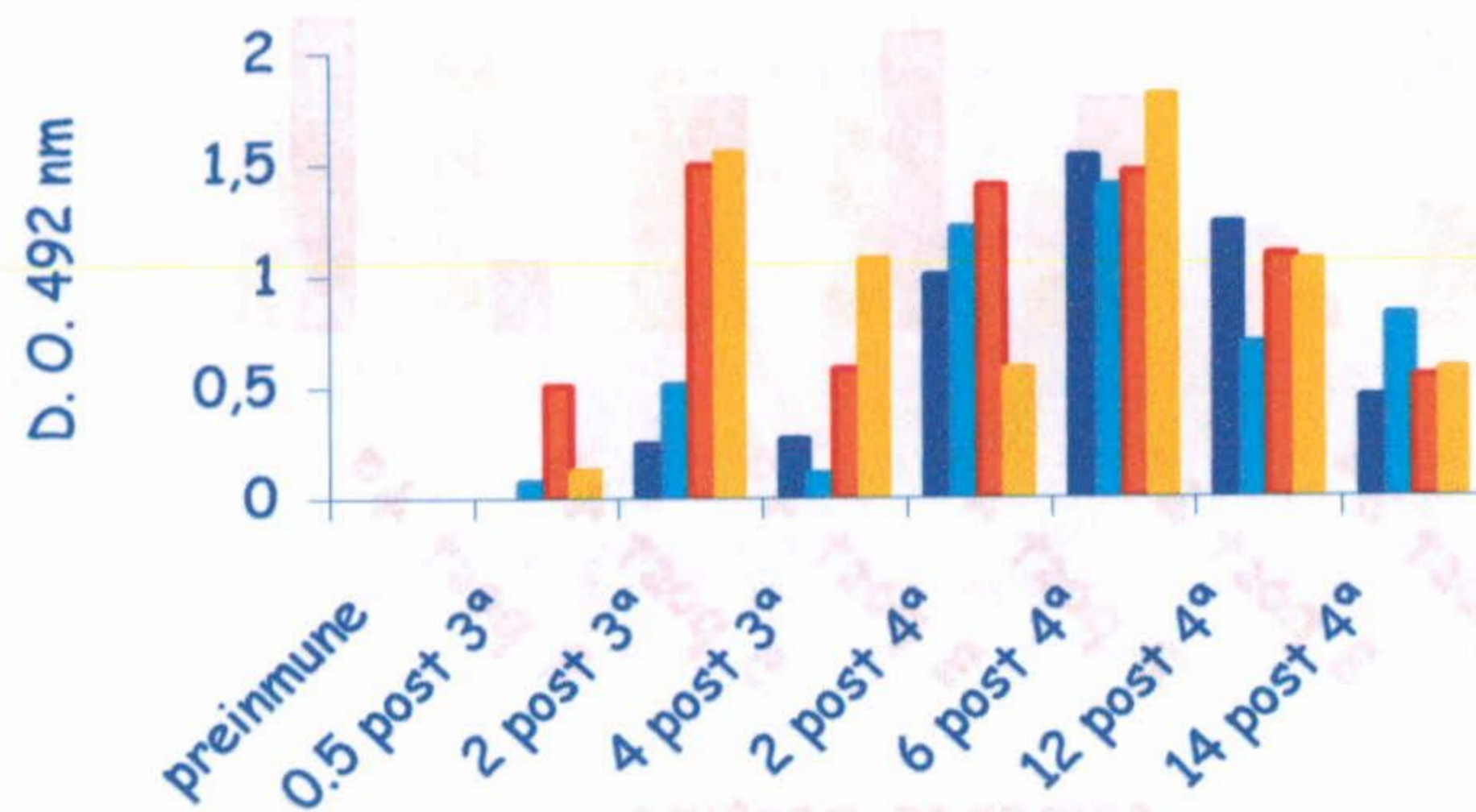


Fig24.-**Determinación de Ig G en ratones BALB/c vacunados con DNA de PAR1 (azul oscuro), PAR1-HSP70 (azul claro), PAR2 (verde) y PAR2-HSP70(rojo).** La aparición de anticuerpos frente a ambas proteínas se produjo tras tres dosis de DNA. En este caso los sueros fueron ensayados a una dilución de 1/800.

En esta cepa, ratones BALB/c, como se puede observar en el gráfico, para una misma dilución, los anticuerpos IgG frente a la proteína PAR2 alcanzan mayores niveles que los generados frente a la proteína PAR1 en tan sólo dos semanas tras la 3ª dosis. También podemos comprobar que no existe una diferencia clara en la producción de IgG entre ratones vacunados con el DNA de las PARs aisladas (tanto PAR1 como PAR2) y los que fueron vacunados con los plásmidos que incluían la HSP70.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los ratones C57BL/6:

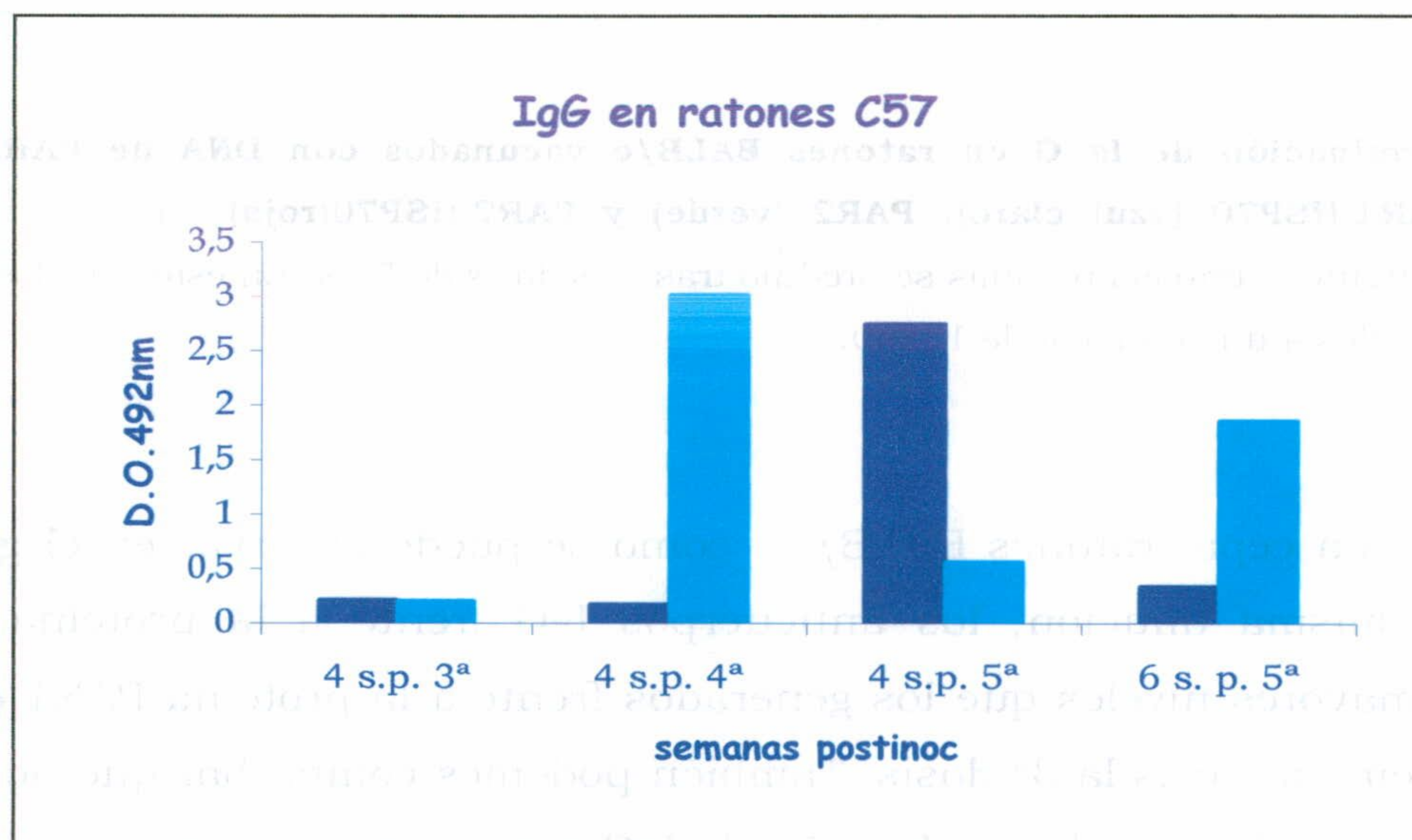
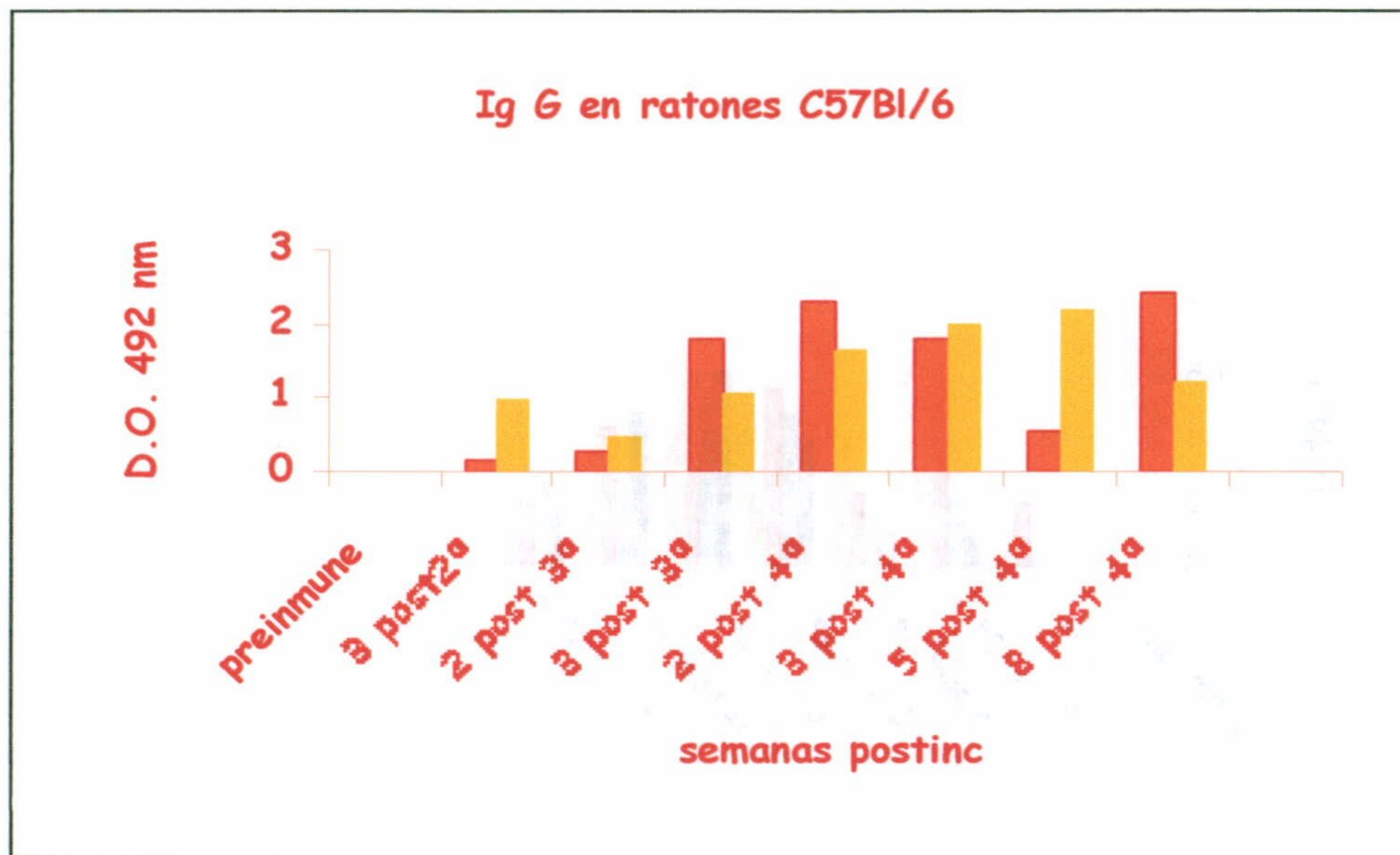


Fig 25.-Niveles de Ig G en ratones C57BL/6 inoculados con DNA de PAR1(azul oscuro), PAR1-HSP70 (azul claro), PAR2 (rojo) y PAR2-HSP70 (naranja). En el caso de niveles de anticuerpos frente a la proteína PAR1 los sueros fueron ensayados a una dilución de 1/400, sin embargo en el caso de PAR2, los sueros tanto de ratones inoculados con PAR2 aislada (en rojo), como con PAR2-HSP70 (naranja), la dilución empleada fue de 1/800.

En los ratones C57BL/6 al igual que ocurría en los BABL/c, los anticuerpos IgG generados tras la vacunación son mayores en los grupos de PAR2 que en los de PAR1. A diferencia de la cepa anterior observamos ligeros niveles de anticuerpos tras dos dosis de DNA, en ratones inmunizados con DNA PAR2-HSP70, e incluso en los que recibieron el gen PAR2 aislado. Ambos se mantienen también a largo plazo. Sin embargo, los grupos inoculados con el gen PAR1, presentaron niveles más bajos de anticuerpos como se observa en el gráfico. También cabe reseñar que en esta ocasión sí se aprecian diferencias entre el grupo de ratones que recibió el gen PAR1 aislado y aquellos que recibieron la fusión PAR1-HSP70. Además los niveles de IgG frente a esta proteína son claramente más bajos, que los observados en la cepa BABL/c, siendo necesarias las 4 dosis para obtener unos valores similares a los obtenidos en la otra cepa con sólo 3 dosis.

Determinamos ahora el isotipo de anticuerpos IgG frente a las PARs generados tras las inmunizaciones en la cepa C57BL/6. Estos resultados se muestran en las siguientes figuras:

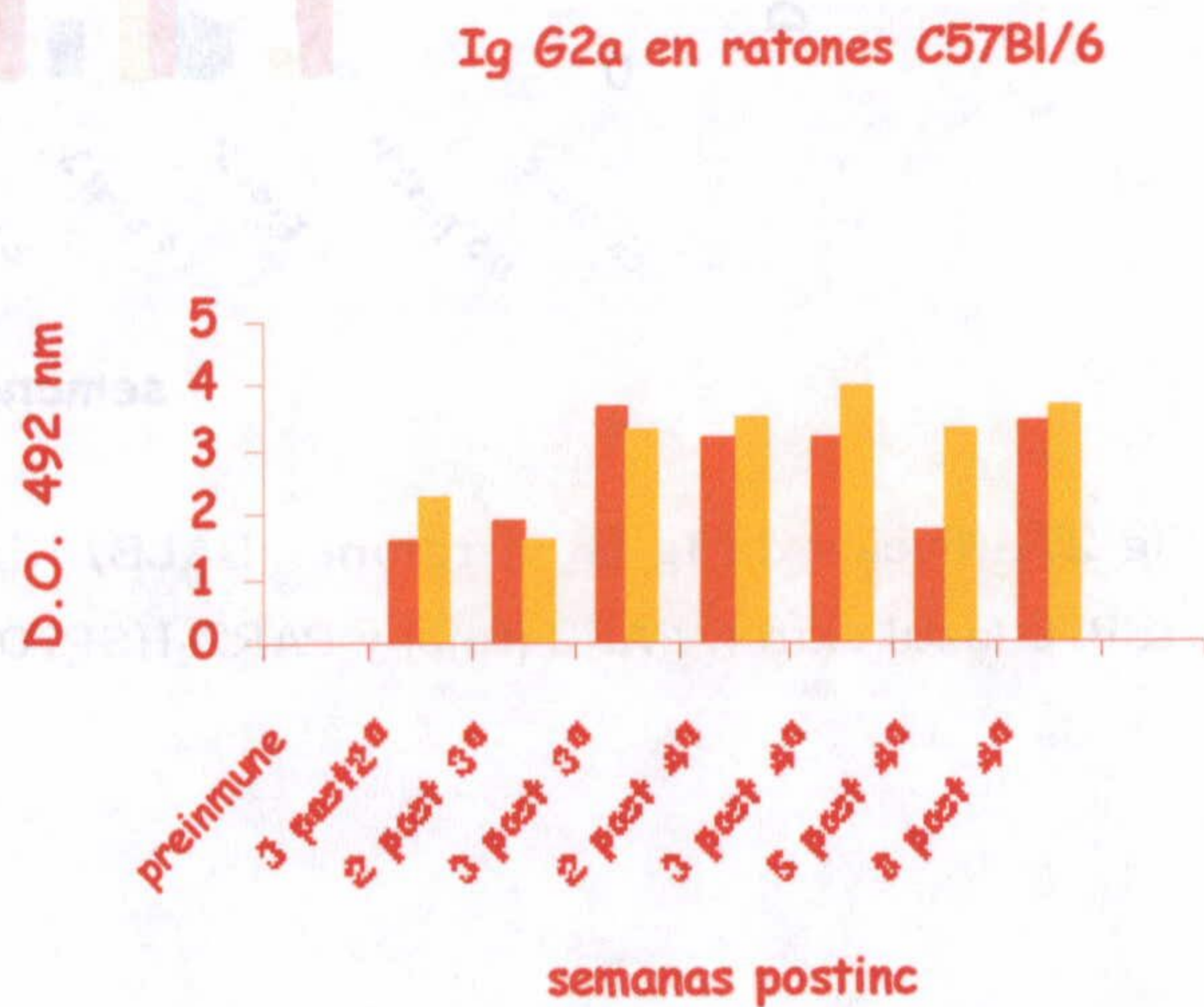
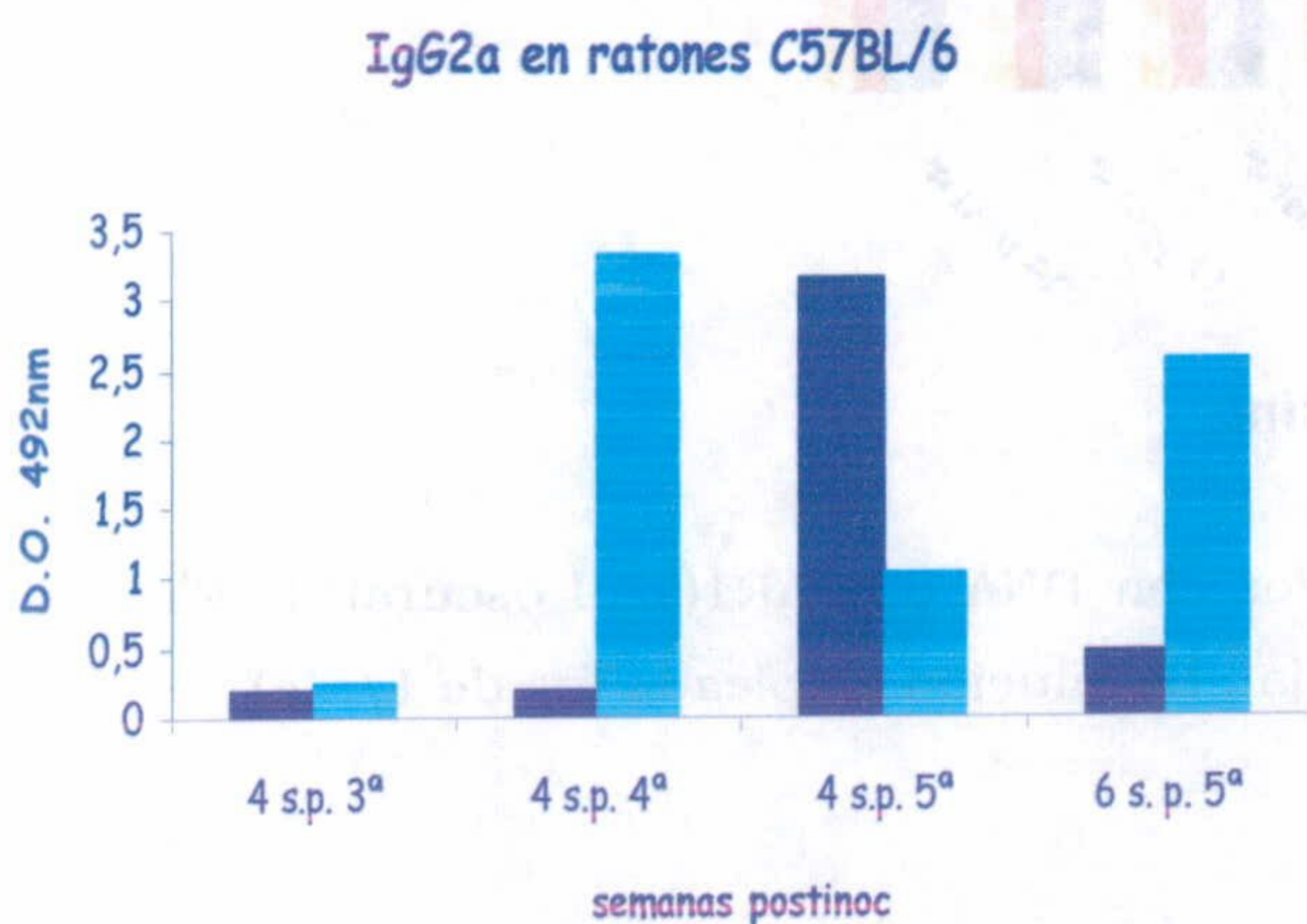
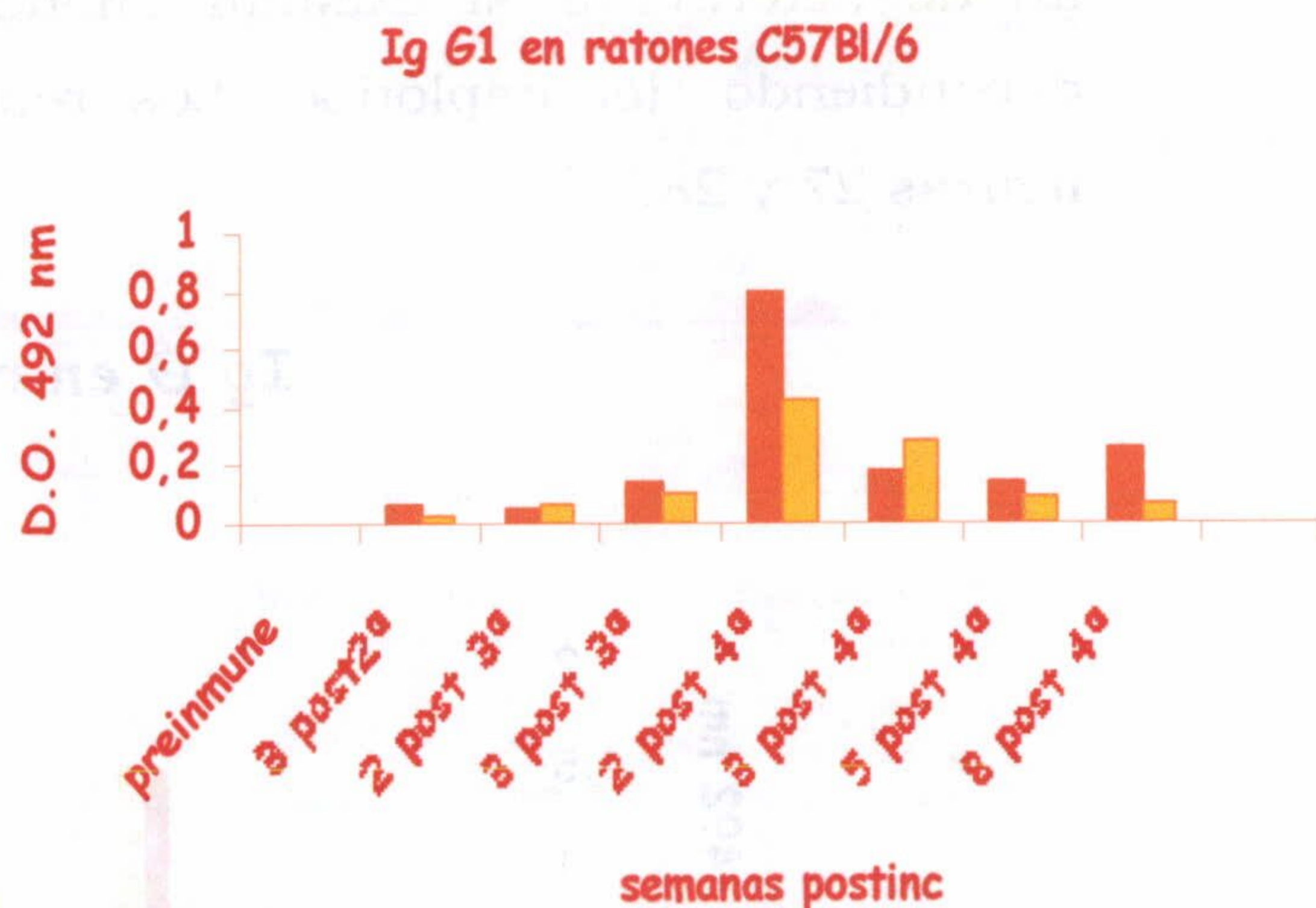
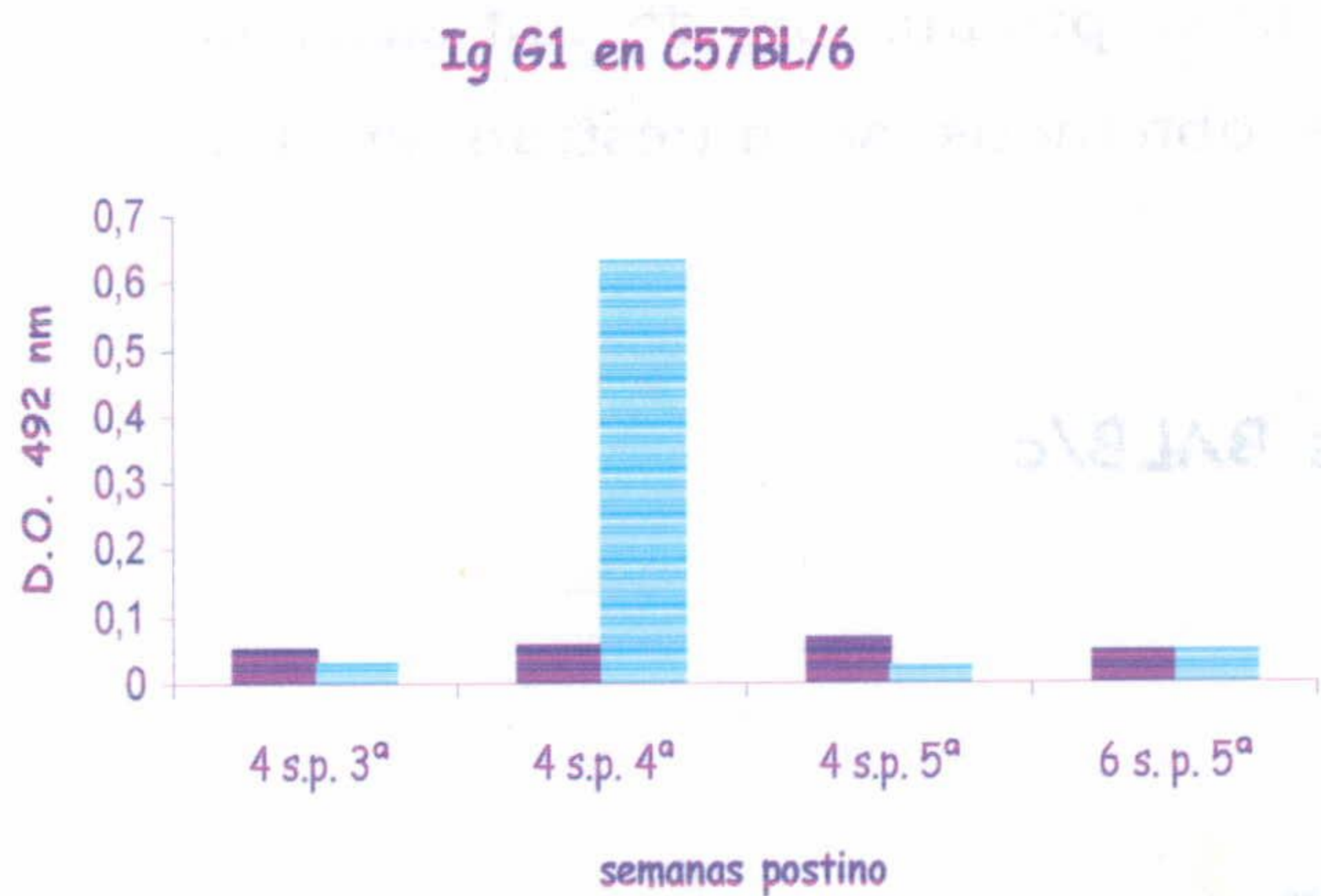


Fig 26.-Determinación de los niveles de Ig G1 e Ig G2a en ratones C57BL/6 vacunados con DNA PARs. Igual que en la determinación de IgG, los sueros de aquellos ratones que recibieron PAR1(en azul oscuro) y PAR1-HSP70 (azul claro) fueron ensayados a una dilución de 1/400 frente a la proteína PAR1, mientras que los inoculados con los genes PAR2 (en rojo) y PAR2-HSP70 (en naranja) se ensayaron a 1/800. Estos resultados son representativos de 2 ensayos de vacunación independientes.

Como se observa en los gráficos de la figura 26, los anticuerpos IgG generados frente a las PARs tras la inoculación con estas proteínas en forma de DNA, son fundamentalmente del isotipo IgG2a, asociado a protección en la enfermedad de Chagas. Además cabe mencionar, que el nivel de anticuerpos de este tipo es mayor en el caso de la inmunización con el gen PAR2 o con PAR2-HSP70, aunque el patrón es similar en el caso de PAR1, con producción mayoritaria de anticuerpos isotipo IgG2a. Comprobamos también que en el caso de PAR1, la unión al gen de la HSP70 adelanta la aparición de estos anticuerpos aunque no tiene ningún efecto sobre el isotipo de los mismos.

Se ensayaron ahora los sueros de los ratones de la cepa BALB/c con el fin de determinar si existían diferencias en la producción de anticuerpos dependiendo del haplotipo. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 27 y 28.

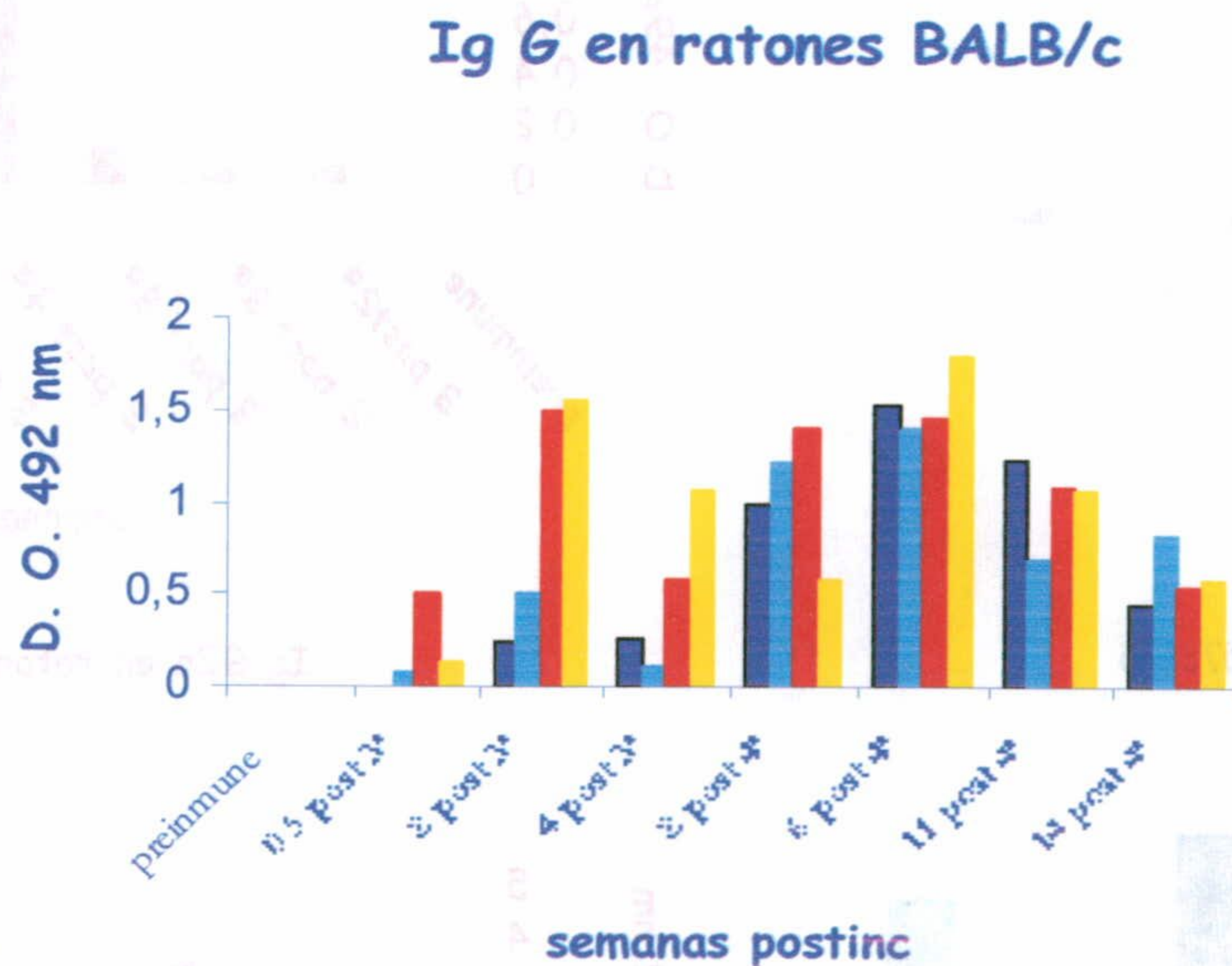


Fig 27.-Niveles de Ig G en ratones BALB/c inoculados con DNA de PAR1(azul oscuro), PAR1-HSP70 (azul claro), PAR2 (rojo) y PAR2-HSP70 (naranja). La dilución empleada fue de 1/800.

Como podemos ver en este gráfico (fig27) al igual que sucedió en la cepa C57BL/6, fueron necesarias al menos tres dosis para que aparecieran niveles de anticuerpos IgG en los ratones inoculados. En general estos niveles son algo superiores a los que se determinaron en la cepa C57BL/6. Procedimos ahora a realizar el tipaje de estos anticuerpos determinando niveles de IgG1 e IgG2a. Los resultados obtenidos se muestran en los siguientes gráficos:

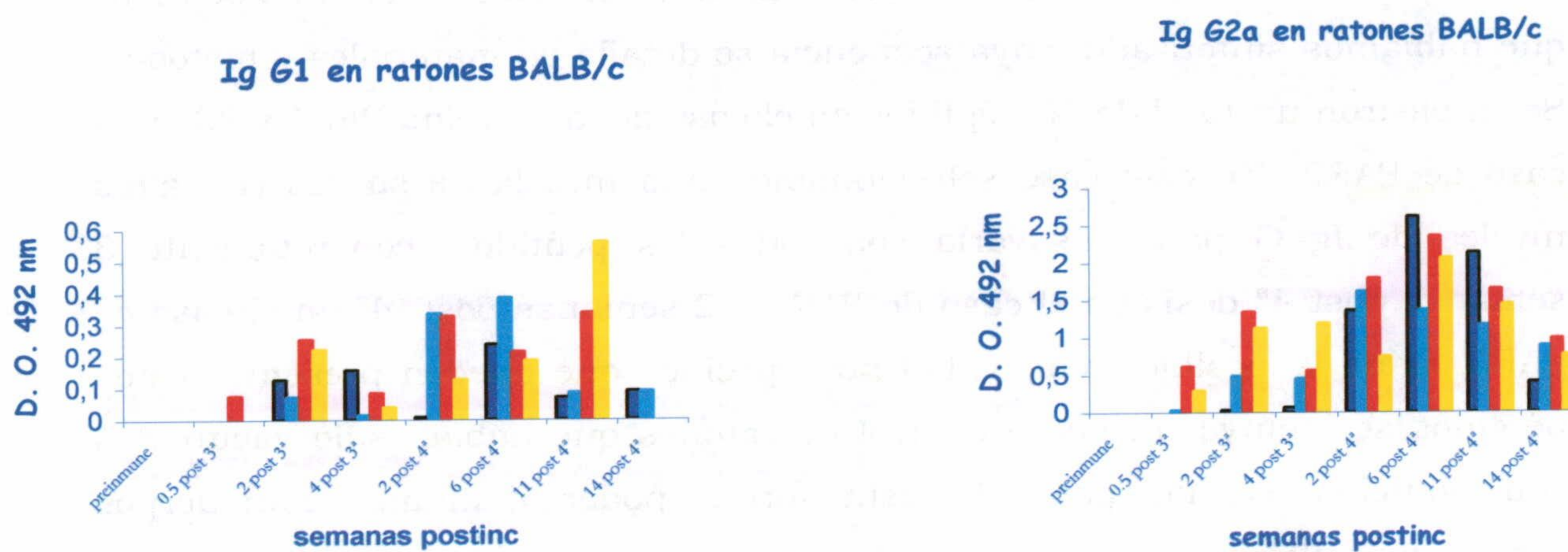


Fig 28.-Niveles de IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c. Valores de D.O. obtenidos a una dilución de los sueros de 1/800, para IgG2a frente a las proteínas PAR1, azul oscuro (PAR1) y azul claro (inoculados con PAR1-HSP70) y frente a PAR2, en rojo inoculados con PAR2 y en naranja con PAR2-HSP70

Al igual que sucediera en la cepa C57BL/6 estos anticuerpos frente a las proteínas PARs inducidos tras la inoculación con los plásmidos que codifican para las mismas, tanto aisladas como fusionadas a la HSP70 generó altos niveles de anticuerpos isotipo IgG2a en todos los casos. Con sólo observar la escala de estos dos gráficos de la figura 28 comprobamos la superproducción de IgG2a frente a IgG1. Nuevamente comprobamos que el nivel de anticuerpos es mayor en el caso de PAR2 2 semanas tras la tercera dosis, aunque a lo largo del ensayo, los niveles se hacen comparables. En el caso de PAR1

4.4.3.1.2.-Análisis de determinantes antigénicos.

Llegados a este punto nos preguntamos si estos anticuerpos, principalmente tipo IgG2a, se habrían generado frente a las proteínas PARs completas o frente a determinados epítopes contenidos en las misma. Para delimitar qué regiones de la proteínas eran más antigénicas y con la idea de localizar posibles epítopes B ensayamos estas mezclas de sueros de ratones inoculados, mediante la técnica de FAST-ELISA, frente a los distintos péptidos que habíamos sintetizado, cuya secuencia se detalla en materiales y métodos. Se emplearon un total de 30 péptidos en el caso de la proteína PAR1 y 33 en el caso de PAR2. En este caso seleccionamos una mezcla de sueros con altos niveles de Ig G para ensayarla con todos los péptidos, concretamente 3 semanas post 4^a dosis en el caso de PAR1 y 2 semanas post 4^a en el caso de PAR2. Dada la posible reactividad no específica que pueden presentar estos péptidos se incluyó un suero control de ratones que habían sido vacunados con solución salina, para de esta forma poder distinguir anticuerpos específicos anti-péptido. Los resultados se muestran a continuación:

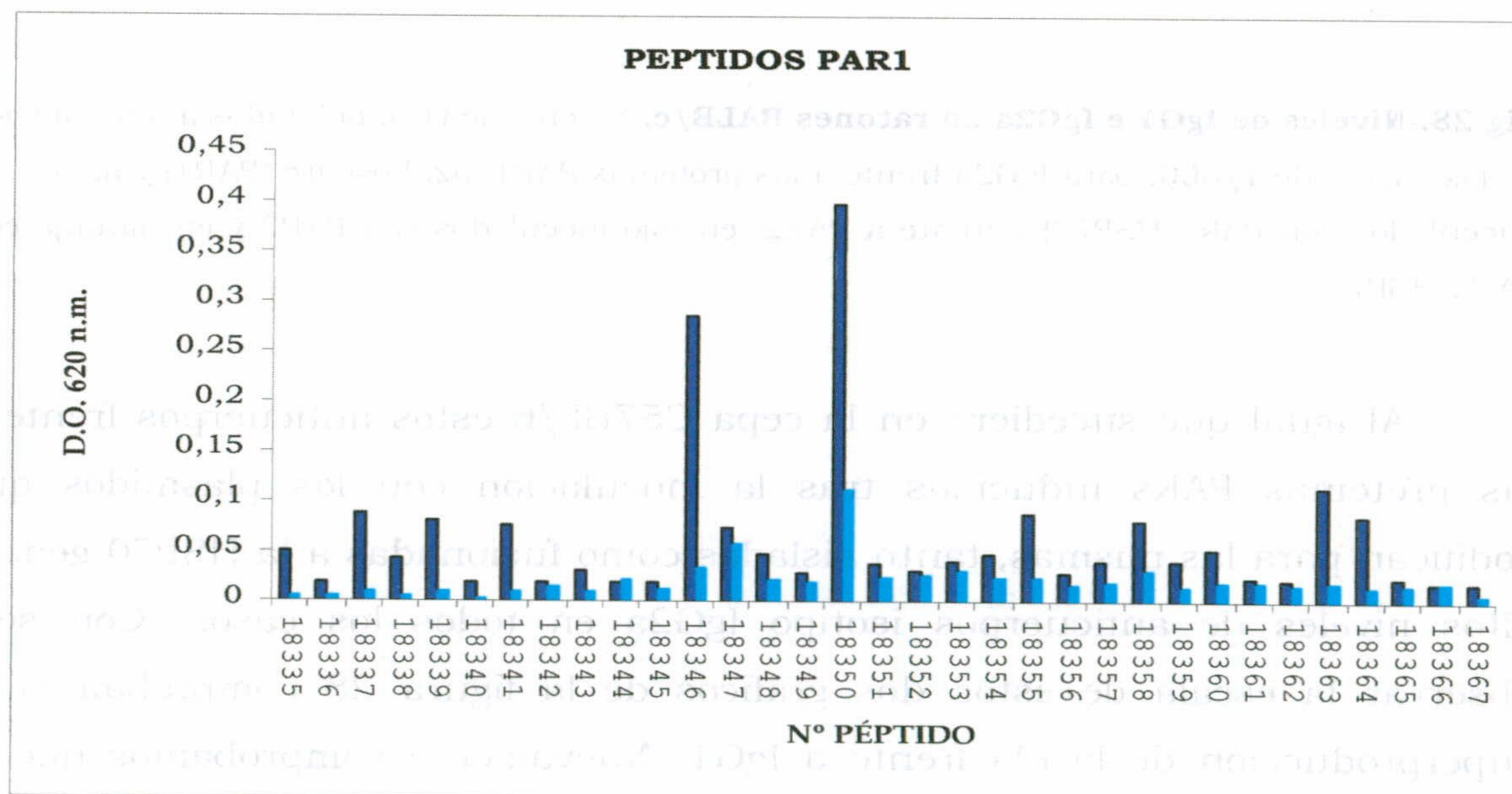


Fig 29.-Reconocimiento de péptidos contenidos en la proteínas PAR1 por ratones vacunados con el gen PAR1(azul oscuro) como control se analizó un suero de ratón no inmunizado (azul claro).Determinación de Ig G mediante FAST-ELISA. La dilución empleada en este caso fue de 1/100.

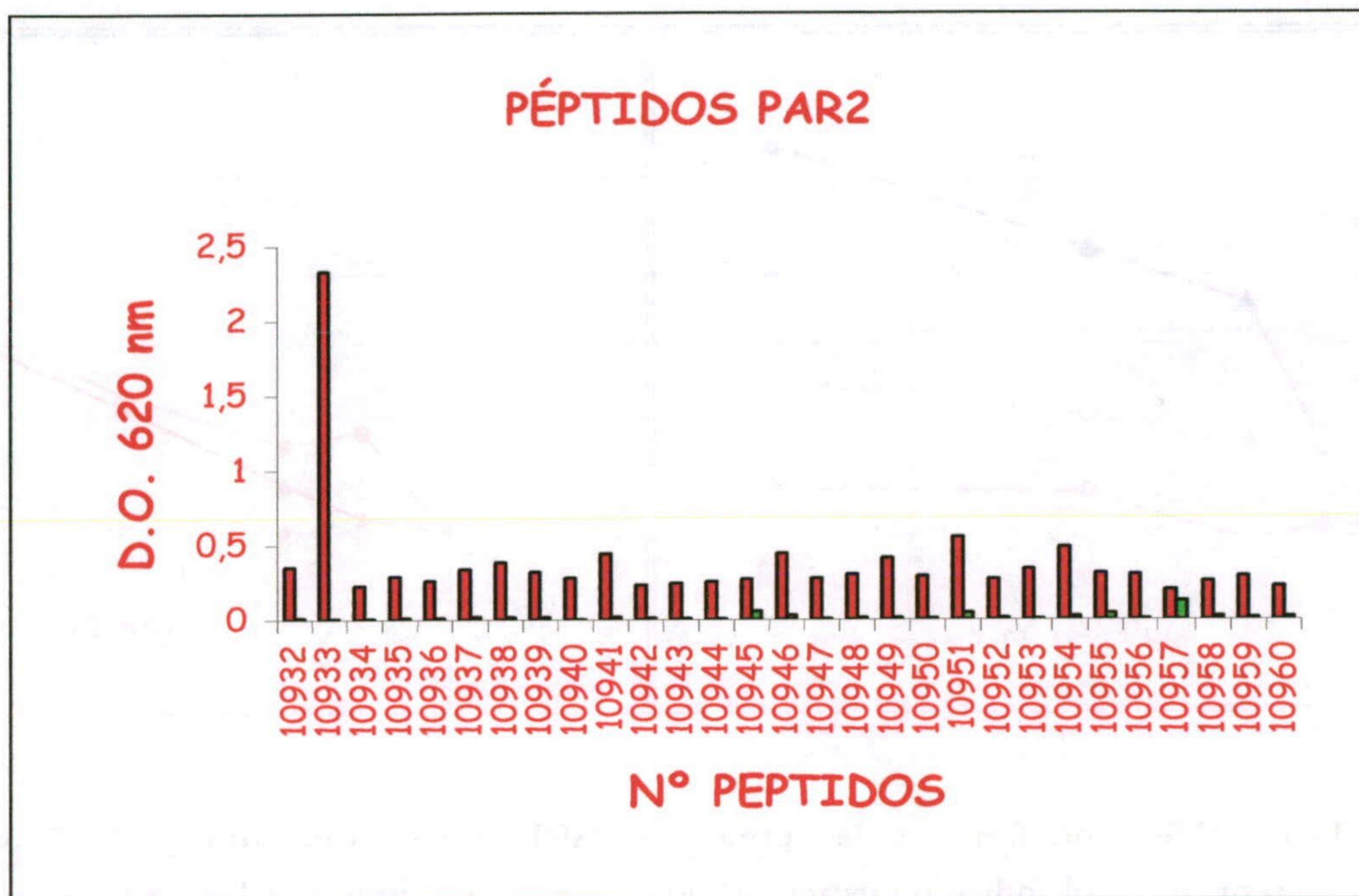


Fig30.-Reconocimiento de péptidos de PAR2 por ratones vacunados con el gen PAR2. Determinación de Ig G mediante FAST-ELISA. La dilución empleada en este caso fue de 1/100. En rojo se muestran los valores obtenidos para ratones inmunizados con el gen PAR2 y en verde el control, suero de ratón que recibió 4 dosis de solución salina.

4.4.3.2.- Respuesta celular inducida por las proteínas PARs en vacunas DNA. Análisis de determinantes antigénicos.

Con objeto de estudiar la respuesta celular inducida por estas proteínas tanto aisladas como fusionadas a la HSP70, se realizaron una serie de ensayos que se detallan a continuación:

4.4.3.2.1.-Proliferación linfocitaria frente a las proteínas PARs.

Como primera aproximación se realizaron ensayos de linfoproliferación, tres semanas tras la cuarta inoculación, en ambas cepas. En todos los casos se incluyeron dos grupos control, por una parte un grupo de ratones que fueron inoculados con solución salina y por otra un grupo de ratones inoculados con el vector vacío.

Para dichos ensayos se utilizaron esplenocitos de ratón extraídos en esterilidad y dependiendo del ensayo se necesitaron 1 ó 2 ratones por grupo. Se utilizaron concentraciones crecientes de antígeno para comprobar que se trataba de un efecto específico del antígeno.

En primer lugar se muestran los resultados obtenidos en los ratones de la cepa BALB/c:

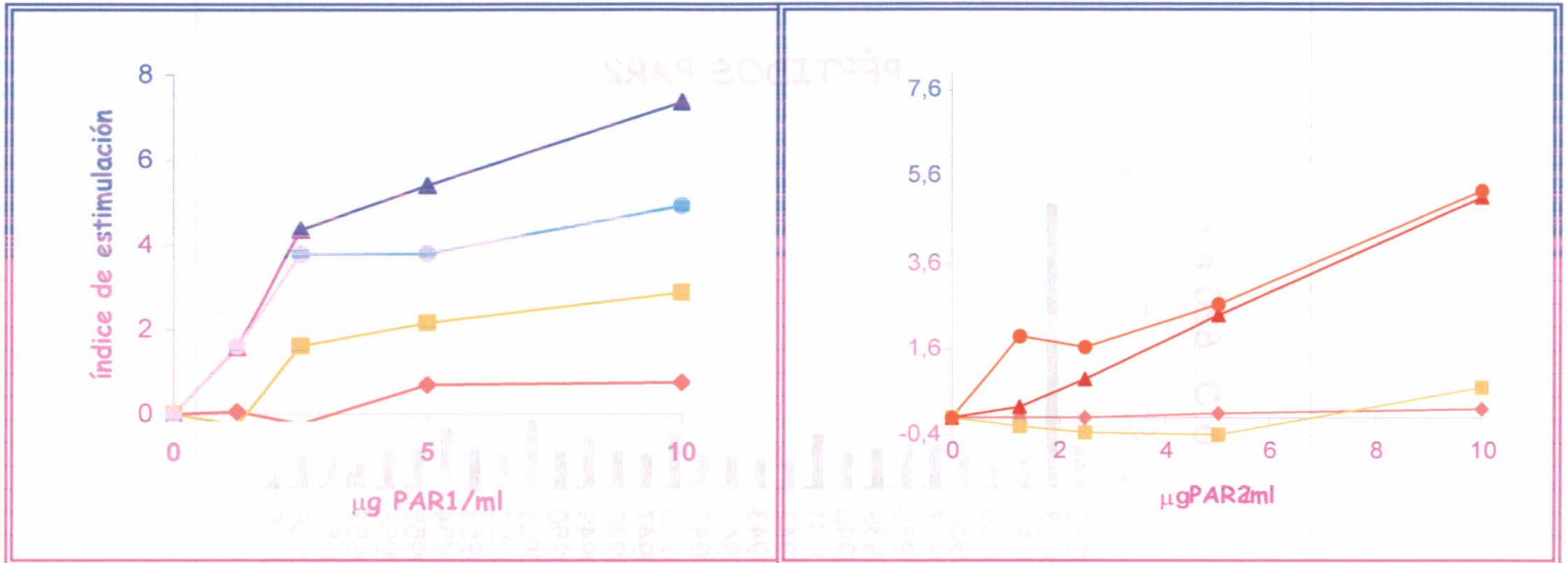


Fig 31.- Linfoproliferación frente a las proteínas PAR1 (gráfico izquierdo) y PAR2 (gráfico derecho). Se representa el índice de estimulación frente a cada una de ellas en los grupos de ratones BALB/c : control salino (rosa), control pCMV4 (verde), inoculados con PAR1 (azul oscuro), con PAR1-HSP70 (azul claro), inoculados con PAR2 (rojo) y con PAR2-HSP70 (naranja).

Podemos comprobar que existe una respuesta linfoproliferativa tanto frente a PAR1 como frente a PAR2. En el gráfico de la izquierda de la figura 31 se muestran los resultados obtenidos para los esplenocitos de ratones inoculados con PAR1 y con PAR1-HSP70, los índices de estimulación en el primer caso están en torno a 8 mientras que para PAR1-70, a la misma concentración de antígeno se sitúan en torno a 6. En ambos casos por encima de control, ya sea de ratones inoculados con el vector vacío (con índices de estimulación de 4) o con solución salina con valores aún más bajos, cerca de 1. También comprobamos que este efecto resulta dosis dependiente, es decir, este índice de estimulación aumenta cuando se aumenta la concentración del antígeno, en este caso la proteína PAR1. En el caso de PAR2, tanto los ratones que recibieron en el plásmido el gen PAR2 aislado, como los que lo recibieron fusionado a la HSP70, presentan índices de estimulación muy similares, y al igual que sucedió con PAR1, estos valores (en torno a 5.5) comprobamos que aumentan al aumentar la concentración de PAR2.

4.4.3.3.2.-Proliferación linfocitaria frente a péptidos de las proteínas PAR1 y PAR2.

A la vista de los índices de estimulación observados en aquellos ratones que habían sido inoculados con PAR1 y PAR2 y al objeto de identificar

potenciales epítopes T, se ensayaron péptidos de unos 20 aminoácidos de longitud, que abarcan la totalidad de cada una de las proteínas a estudio (ver sección de materiales y métodos). El ensayo se realizó igual que en el caso anterior con esplenocitos de los ratones BALB/c inoculados con las proteínas PAR1 y PAR2. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 32 y 33 en las que sólo se representan aquellos péptidos que inducen significativamente la proliferación.

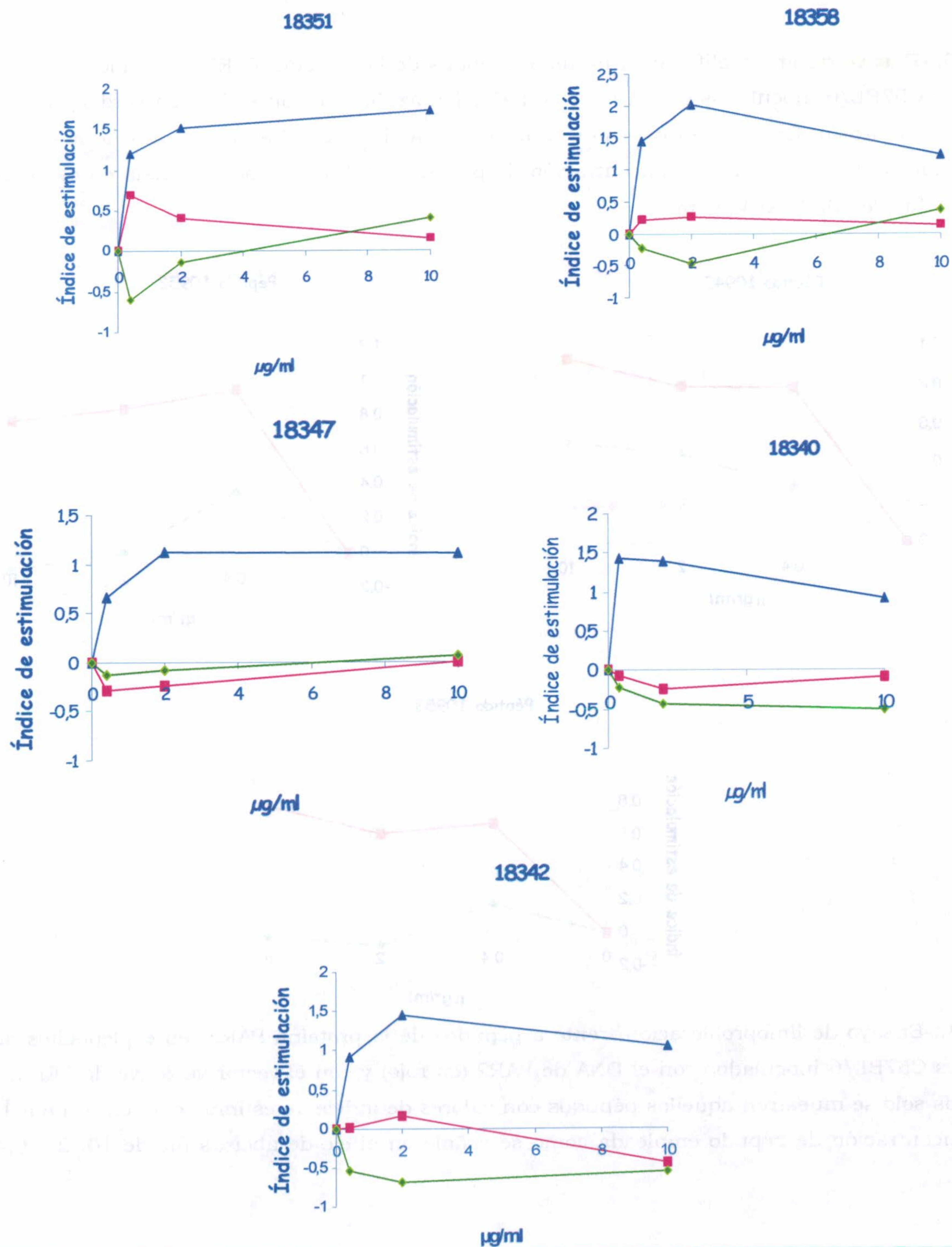


Fig 33.-Ensayo de linfoproliferación frente a péptidos de la proteína PAR1 en esplenocitos de ratones C57BL/6 inoculados con el DNA de PAR1 (en azul), solución salina (en verde) y con el vector vacío (rosa). En los gráficos sólo se muestran aquellos péptidos con valores de índice de estimulación en torno a 1. La concentración de péptido empleada como se señala en el eje de abcisas fue de 10, 2 y 0,4 $\mu\text{g/ml}$.

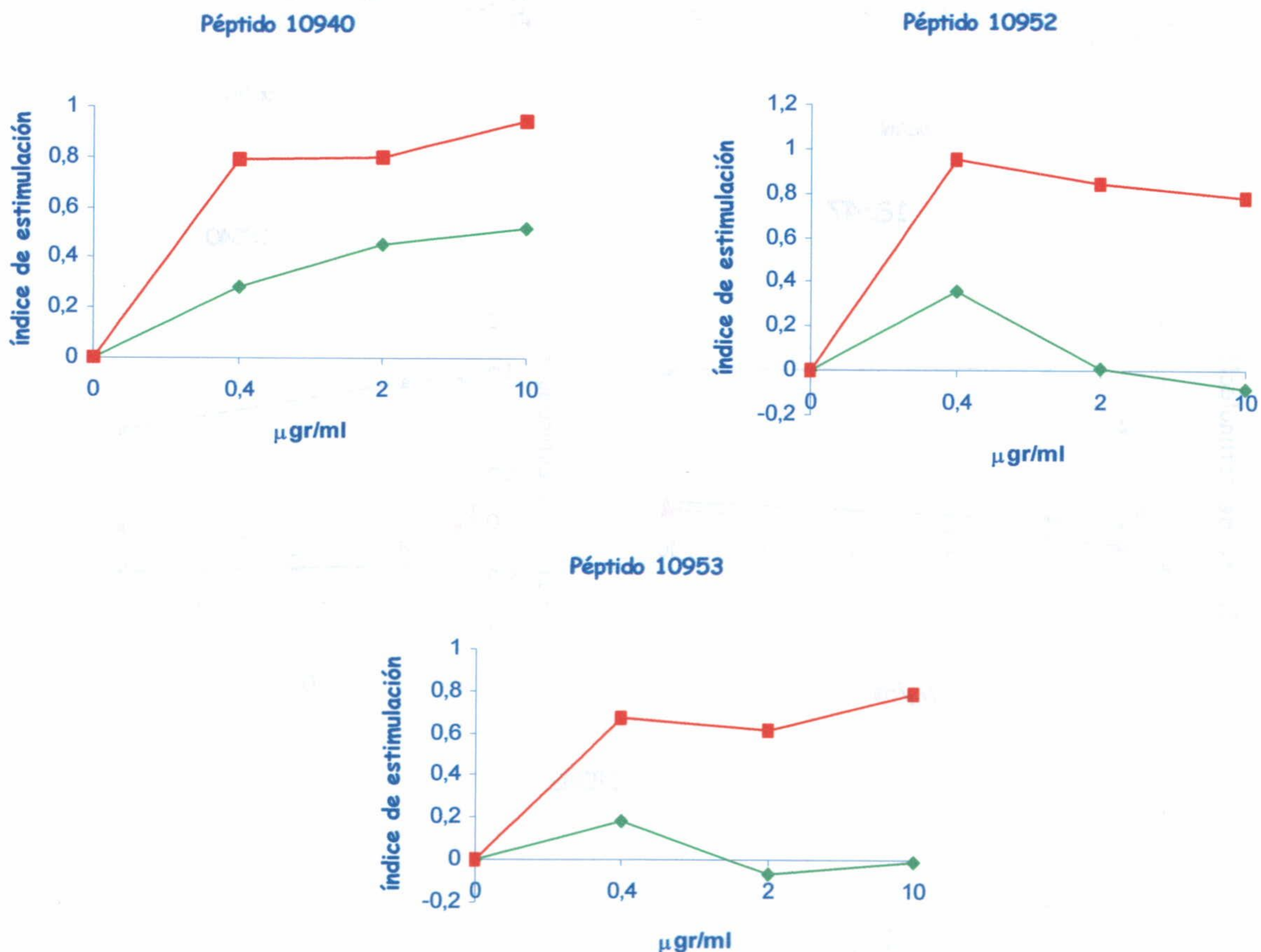


Fig 34.-Ensayo de linfoproliferación frente a péptidos de la proteína PAR2 en esplenocitos de ratones C57BL/6 inoculados con el DNA de PAR2 (en rojo) y con el vector vacío (verde). En los gráficos sólo se muestran aquellos péptidos con valores de índice de estimulación en torno a 1. La concentración de péptido empleada como se señala en el eje de abcisas fue de 10, 2 y 0,4 $\mu\text{g/ml}$.

Como se muestra en estos gráficos se han localizado 5 potenciales epítopes T en el caso de PAR1 y tres en la proteína PAR2. En todos los casos los índices de estimulación obtenidos no son muy elevados, incluidos entre 1 y 2, si bien dada la reproducibilidad observada en diferentes experimentos de inmunización entendemos que pueden identificarse como epítopes T. En la proteína PAR1 estos epítopes se localizan hacia la región amino y central, mientras que en la proteína PAR2 se localizan hacia la región aminoterminal.

4.4.3.3.3.-Perfil de citoquinas en esplenocitos de ratones inmunizados.

Con los datos obtenidos hasta ahora habíamos comprobado que existía respuesta celular frente a ambas proteínas en aquellos ratones que habían sido inoculados con los genes que codificaban para las mismas, sin embargo ahora necesitábamos determinar de qué tipo era esta respuesta. Con este objetivo se realizó un estudio de citoquinas realizando una tinción intracelular de esplenocitos estimulados *in vitro* con estos antígenos PAR1 y PAR2. Como control positivo de estimulación utilizamos el pDBu. Dado que desconocíamos en qué momento tras la estimulación sería máxima la producción de estas citoquinas se realizaron las determinaciones a las 20, 44 y 64 horas postestimulación. Tal como se describió en la sección materiales y métodos estas determinaciones se realizaron mediante citometría de flujo, empleando anticuerpos anti-citoquina y un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo. Los resultados obtenidos se presentan en los siguientes gráficos:

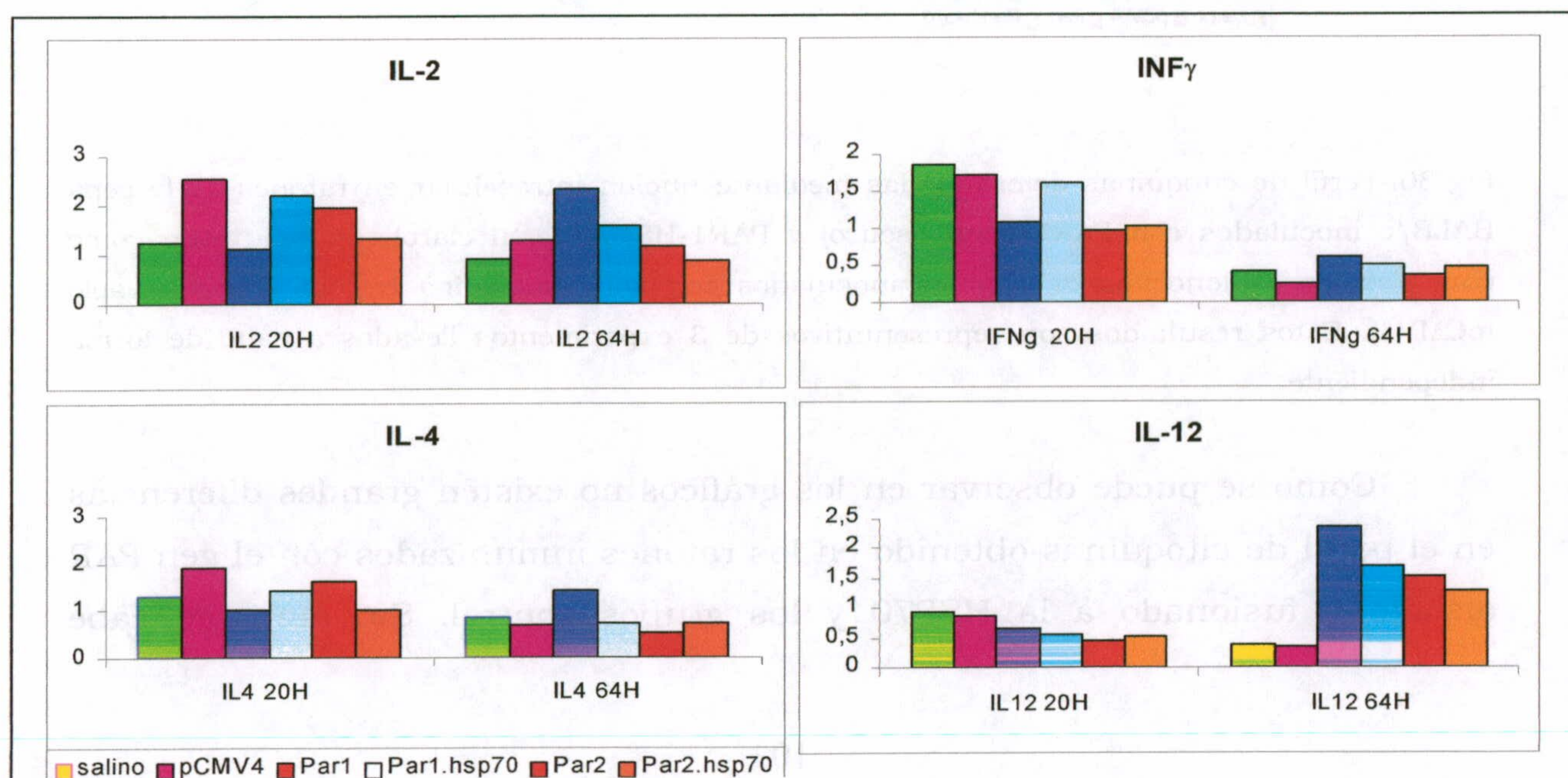


Fig 35.-Medida de citoquinas intracelulares en esplenocitos de ratones BALB/c estimulados con proteínas totales de *T.cruzi*. En verde inoculados con solución salina, en rosa con pCMV4, en azul con PAR1, azul claro (PAR1-70), en rojo PAR2 y en naranja (PAR2.70). Se representa el porcentaje de células expresando cada una de las citoquinas.

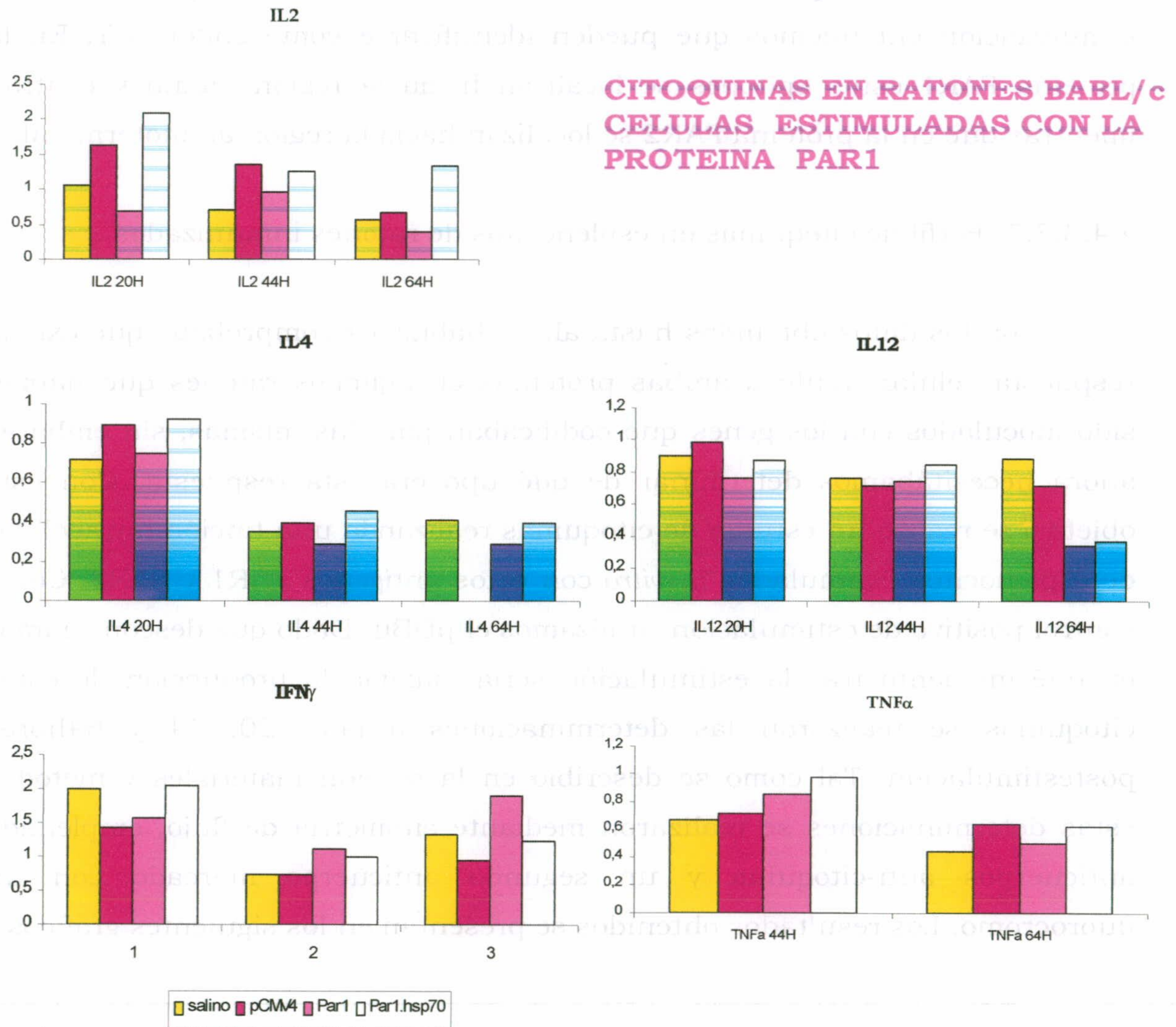


Fig 36.-Perfil de citoquinas determinadas mediante tinción intracelular en ratones de la cepa BALB/c inoculados con PAR1 (azul oscuro) y PAR1-HSP70 (azul claro), se incluyeron como controles los esplenocitos de ratones inoculados con solución salina (verde) y vector vacío (pCMV4). Estos resultados son representativos de 3 experimentos llevados a cabo de forma independiente.

Como se puede observar en los gráficos no existen grandes diferencias en el perfil de citoquinas obtenido en los ratones inmunizados con el gen PAR aislado o fusionado a la HSP70 y los grupos control. Sin embargo cabe

destacar el leve aumento del porcentaje de células expresando IFN- γ y TNF- α en aquellos ratones inoculados con el gen PAR1 aislado o fusionado a la HSP70 relativo a los controles inoculados con solución salina o vector vacío, y el aumento de IL-2 que se observa en aquellos ratones que recibieron el gen PAR1 fusionado a la HSP70.

En cuanto a los resultados obtenidos en aquellos grupos de ratones que recibieron el gen PAR2 aislado o fusionado a la HSP70, se representan en la figura 37.

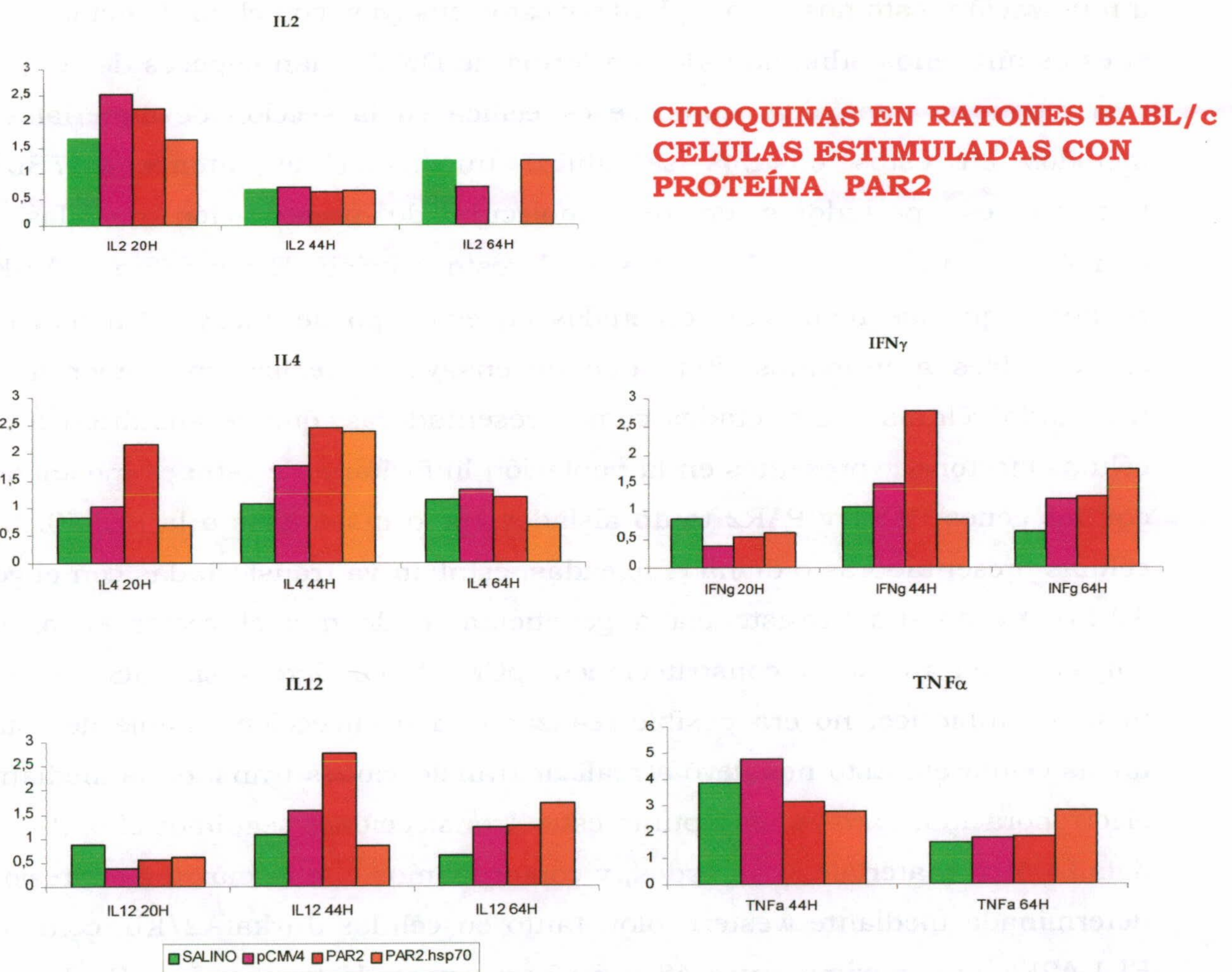


Figura37.- Perfil de citoquinas determinadas mediante tinción intracelular en ratones de la cepa BALB/c inoculados con PAR2 (rojo) o PAR2-HSP70(naranja) y con solución salina (verde) o vector vacío (rosa). Se representa el porcentaje de células que expresan cada una de las citoquinas. Estos resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

Como podemos observar se detecta un aumento del porcentaje de células que expresan INF- γ e IL-12.

4.4.3.3.4.-Ensayos de citotoxicidad.

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos se ha comprobado que resulta fundamentales en el control de la infección. Nuestros ensayos de linfoproliferación demostraban la existencia de respuesta celular tras la inmunización, esto nos llevo a plantear estos ensayos, con el fin de determinar si estos antígenos administrados en forma de DNA serían capaces de generar una respuesta citotóxica. Como se especifica en la sección de materiales y métodos en estos ensayos se utilizó una cepa de ratones C57BL/6 transgénicos, portadores de una molécula de presentación de clase I quimérica, con $\alpha 1$ y $\alpha 2$ humanas y el resto murino. Estos ratones A2-Kb permiten que los resultados obtenidos en este tipo de ensayos puedan ser extrapolables a humanos. Este tipo de ensayo se realizó en primer lugar utilizando células transfectadas como presentadoras, que se añadirían a las células efectoras, presentes en la población linfocitaria de ratones inoculados con los genes PAR1 y PAR2 tanto aislados como fusionados a la HSP70. Las células presentadoras o diana empleadas, estaban ya transfectadas con el gen A2-Kb presentando resistencia a geneticina, dado que el vector eucariota empleado en nuestras construcciones, pCMV4, confiere resistencia a este mismo antibiótico, no era posible realizar una transfección estable de estas líneas celulares. Esto nos llevó a realizar transfecciones transitorias mediante electroporación. Para poner a punto estas transfecciones seguimos el protocolo detallado en materiales y métodos, y comprobamos que la máxima expresión, determinada mediante western blot, tanto en células JurkatA2/Kb, como en EL4-A2K^b, era máxima entre 48 y 60 horas post-electroporación. En base a este resultado, estas células serían electroporadas en este margen de tiempo antes del ensayo, posteriormente centrifugadas en un gradiente de ficoll, para eliminar las células muertas y finalmente añadidas a los esplenocitos.

Tras la extracción de los bazo y su posterior homogenización, se realizaron un total de tres estimulaciones *in vitro*, por una parte con células presentadoras transfectadas con los genes aislados, así como con estas

mismas células transfectadas con los genes PARs fusionados a la HSP70. Dado que esta proteína había sido descrita como “vehículo transportador de antígenos hacia clase I” la transfección con genes fusionados podría mejorar la presentación de los distintos péptidos antigénicos resultantes del procesamiento intracelular de las proteínas PARs tras la transfección.

Se realizó el ensayo clásico de liberación de cromo, entre tres y diez semanas tras la última dosis de DNA. Este ensayo se ha realizado al menos 3 veces con cada uno de los grupos y a continuación se muestran los resultados obtenidos en uno de ellos como representativos del resto:

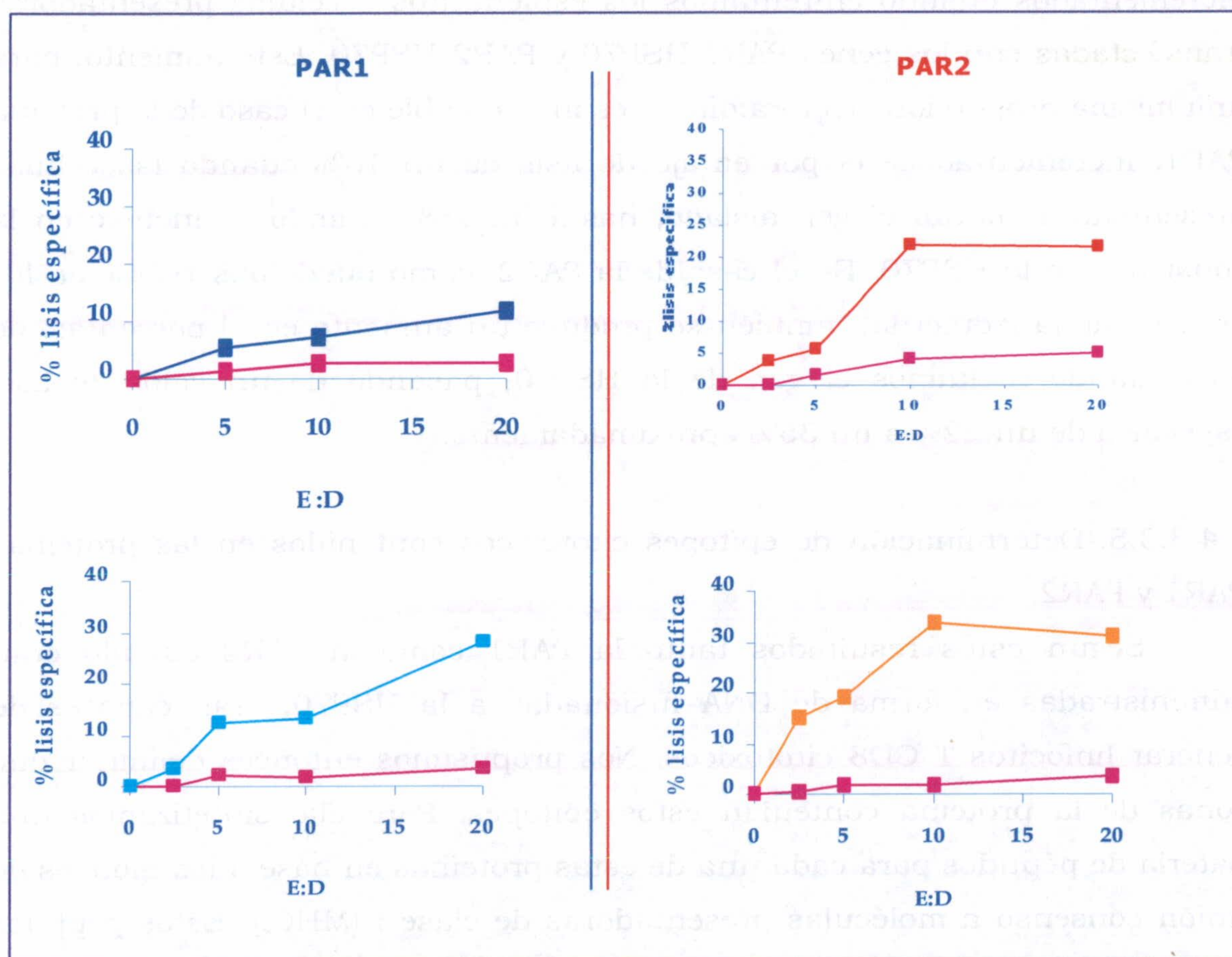


Fig38-Ensayos de citotoxicidad.CTLs. En todos los gráficos se representa el porcentaje de lisis específica frente a distintas proporciones de células efectoras y diana. En los dos gráficos de la derecha las células efectoras empleadas son esplenocitos de ratones inoculados con el gen PAR1-HSP70, enfrentadas a células presentadoras transfectadas con el gen PAR1 (superior izquierdo color azul oscuro), con el vector vacío (en rosa en todos los gráficos), o a células transfectadas con el gen PAR1 fusionado a la HSP70 (en azul claro, gráfico inferior a la izquierda). En los gráficos de la derecha se muestran los resultados obtenidos cuando se enfrentaron los esplenocitos de ratones inoculados con la fusión PAR2-HSP70 a células transfectadas con el gen PAR2 (en rojo), PAR2-HSP70 (naranja) o con el vector vacío (en rosa)

Aquellos ratones que habían recibido los genes de PAR1 y PAR2 aislados no mostraron en ningún caso porcentajes de lisis significativos respecto al control, es decir con este ensayo sólo detectamos la presencia de linfocitos T CD8+ citotóxicos en los ratones inoculados con los genes tanto PAR1 como PAR2 fusionados a la HSP70. En estos gráficos podemos comprobar además, que estos porcentajes de lisis específica se ven incrementados cuando enfrentamos los esplenocitos a células presentadoras transfectadas con los genes PAR1-HSP70 y PAR2-HSP70. Este aumento, para una misma proporción efectora:diana, es más notable en el caso de la proteína PAR1, incrementándose el porcentaje de lisis de un 10% cuando las células presentadoras llevan el gen aislado, hasta un 25% cuando se incluye en la construcción la HSP70. En el caso de la PAR2, como puede observarse en los gráficos de la izquierda, también se produce un aumento en el porcentaje de lisis cuando incluimos el gen de la HSP70, pasando de un valor de lisis específica de un 22% a un 35% aproximadamente.

4.4.3.3.5.-Determinación de epítopes citotóxicos contenidos en las proteínas PAR1 y PAR2.

Según estos resultados tanto la PAR1 como la PAR2 cuando eran administradas en forma de DNA fusionadas a la HSP70, eran capaces de generar linfocitos T CD8 citotóxicos. Nos propusimos entonces delimitar qué zonas de la proteína contenían estos epítopes. Para ello sintetizamos una batería de péptidos para cada una de estas proteínas en base a los motivos de unión consenso a moléculas presentadoras de clase I (MHCI). Estos péptidos con una longitud entre 9-11 aminoácidos fueron ensayados para determinar su capacidad de unión a estas moléculas de clase I, *in vitro*, con objeto de seleccionar aquellos que se uniesen mejor, y cuya unión fuese más estable, ya que se propone que la fuerza de unión del péptido a la molécula de clase I puede ser indicativa de la inmunogenicidad de ese péptido. Estos ensayos fueron realizados utilizando como control el péptido de la envuelta del virus de la hepatitis B (HB_ENV). Se utilizaron las células T2, como se ha comentado deficientes en la expresión de moléculas transportadoras de antígeno, TAP, de forma que expresan en su superficie principalmente moléculas de clase I

A*0201. Los resultados expresados como índice de fluorescencia relativo, respecto al péptido control, se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 1.-Péptidos de PAR1 con motivos de unión a HLA-A*201

Nombre del péptido	Posición	Secuencia	Índice de fluorescencia relativo
18396	PAR1 ₂₈₋₃₇	ALAALYELV	
18397	PAR1 ₃₀₋₄₀	ALYELEVENAI	
18398	PAR1 ₃₈₋₄₆	AIATAENYV	
18399	PAR1 ₄₆₋₅₅	VYAYTEGRLV	
18400	PAR1 ₁₄₃₋₁₅₂	ALKPHQPPDL	
18401	PAR1 ₁₅₅₋₁₆₃	ALARDLSDV	
18402	PAR1 ₁₅₉₋₁₆₇	DLSDVCGAL	
18403	PAR1 ₁₇₄₋₁₈₄	DLMAELRAEL	
18404	PAR1 ₁₇₈₋₁₈₆	ELRAELSEL	
18405	PAR1 ₁₈₆₋₁₉₃	ELDGERDKV	
18406	PAR1 ₂₆₅₋₂₇₃	SISRFAEAL	
18407	PAR1 ₂₈₃₋₂₉₀	DLHNCDKKR	
18408	PAR1 ₃₁₆₋₃₂₄	QIVEQKKKL	
18409	PAR1 ₃₁₇₋₃₃₄	ELRQKAREL	
18410	PAR1 ₃₃₇₋₃₄₅	DITLKQKEMV	
18411	PAR1 ₃₉₉₋₄₀₇	MVTRIPQQNL	
18412	PAR1 ₄₀₂₋₄₀₈	RIPQQNLRQV	
18413	PAR1 ₄₁₀₋₄₁₆	QVLDQLNDI	
18414	PAR1 ₄₁₃₋₄₂₀	QLNDIEAEV	
18415	PAR1 ₄₂₈₋₄₃₆	FVSCCGELTV	
18416	PAR1 ₄₃₃₋₄₃₇	ELTVKKMHR	
18417	PAR1 ₄₆₆₋₄₇₃	NMSYRLEL	
18418	PAR1 ₄₇₅₋₄₈₂	DIIEQMKGV	
18419	PAR1 ₄₇₉₋₄₈₆	QMKFVSGVI	
18420	PAR1 ₄₈₁₋₄₈₉	GVSGVINAL	
18421	PAR1 ₄₉₈₋₅₀₆	QLFQSVEKGV	
18422	PAR1 ₅₂₀₋₅₂₉	PLQEYGIKSV	
18423	PAR1 ₅₃₅₋₅₄₃	FVDRSMHYV	
18424	PAR1 ₅₄₂₋₅₅₀	YVENEERKV	
18425	PAR1 ₅₄₈₋₅₅₆	KVLEKRNVL	

Tabla 1.-Se muestran en la siguiente tabla el nombre del péptido, la posición en la que se encuentra, su secuencia aminoacídica y el índice de fluorescencia relativo, calculado respecto al péptido control HB-ENV.

Estos ensayos se realizaron utilizando como control un péptido de la envuelta del virus de la hepatitis B, y se muestran los porcentajes de índice de fluorescencia relativos a este péptido. Como vemos aquellos que presentan mayor índice relativo son los números 18415, 18420, y 18418.

Tabla 2.-Péptidos de PAR2 con motivos de unión a HLA-A*0201

Nombre del péptido	Posición	Secuencia	Indice de fluorescencia relativo
12790	PAR2 ₁₉₋₂₈	AVPEVTDVTL	0.29
12791	PAR2 ₉₀₋₉₉	LTEAYDIKKL	0.22
12792	PAR2 ₉₉₋₁₀₇	LMRVCGLQL	0.25
12793	PAR2 ₁₂₃₋₁₃₁	EVVALKKTL	0.01
12794	PAR2 ₁₂₆₋₁₃₄	ALKKTLNEL	0.76
12795	PAR2 ₁₄₈₋₁₅₇	GTIDNAIAKL	0.11
12796	PAR2 ₁₅₆₋₁₆₃	KLEKIEDL	0.21
12797	PAR2 ₁₇₆₋₁₈₅	QVPVAVLKNL	-0.03
12798	PAR2 ₁₈₄₋₁₉₃	NLEECMNVTV	-0.11
12799	PAR2 ₁₉₀₋₁₉₉	NVTVVQTALL	0.03
12800	PAR2 ₂₃₆₋₂₄₅	YIKAQLEHL	0.08
12801	PAR2 ₃₀₀₋₃₀₈	NLHDAIQKA	0.10
12802	PAR2 ₃₄₆₋₃₅₅	ELERVLRQL	0.003
12803	PAR2 ₃₇₆₋₃₈₅	KVEYQQFLDV	0.126
12804	PAR2 ₄₁₃₋₄₂₁	LVAEGCSAI	0.09
12805	PAR2 ₄₂₇₋₄₃₅	KTNEELGDL	0.028
12806	PAR2 ₄₃₆₋₄₄₄	RLQVHQEYL	0.16
12807	PAR2 ₄₄₉₋₄₅₇	RLYKTLGQL	0.18
12808	PAR2 ₄₅₆₋₄₆₅	QLVYKKEKRL	0.06
12809	PAR2 ₄₆₄₋₄₇₂	RLEEIDRNI	0.155
12810	PAR2 ₄₉₉₋₅₀₇	ELYKLRAQV	0.21
12811	PAR2 ₅₀₆₋₅₁₄	QVEEELEML	0.12
12812	PAR2 ₅₁₃₋₅₂₂	MLKDKMAQAL	0.21
12813	PAR2 ₅₅₆₋₅₆₅	KMVEYRAHL	0.15
12814	PAR2 ₅₆₃₋₅₇₂	HLAKQEEVKJ	0.14
12815	PAR2 ₃₈₋₄₆	NLKLKTSCL	0.16

Tabla2.- Se muestran en la siguiente tabla el nombre del péptido, la posición en la que se encuentra, su secuencia aminoacídica y el índice de fluorescencia relativo, calculado respecto al péptido control HB-ENV.

En el caso de PAR2 siguiendo la misma metodología que con los péptidos de PAR1, como vemos en la tabla se seleccionaron los péptidos 12807, 12796 y 12790 por ser los que presentaban mayores índices de fluorescencia relativos.

De los péptidos ensayados seleccionamos 3 en el caso de PAR1 y otros 3 en el caso de PAR2, pues presentaban un mayor índice relativo de fluorescencia y por tanto que mejor se unían a la molécula HLA-A*201. Al objeto de comprobar la estabilidad de la unión de los mismos, procedimos a realizar un ensayo de la estabilidad unión a células T2 usando diferentes concentraciones de péptido y analizamos mediante citometría de flujo como se detalla en la sección materiales y métodos. Los resultados se presentan en los siguientes gráficos:

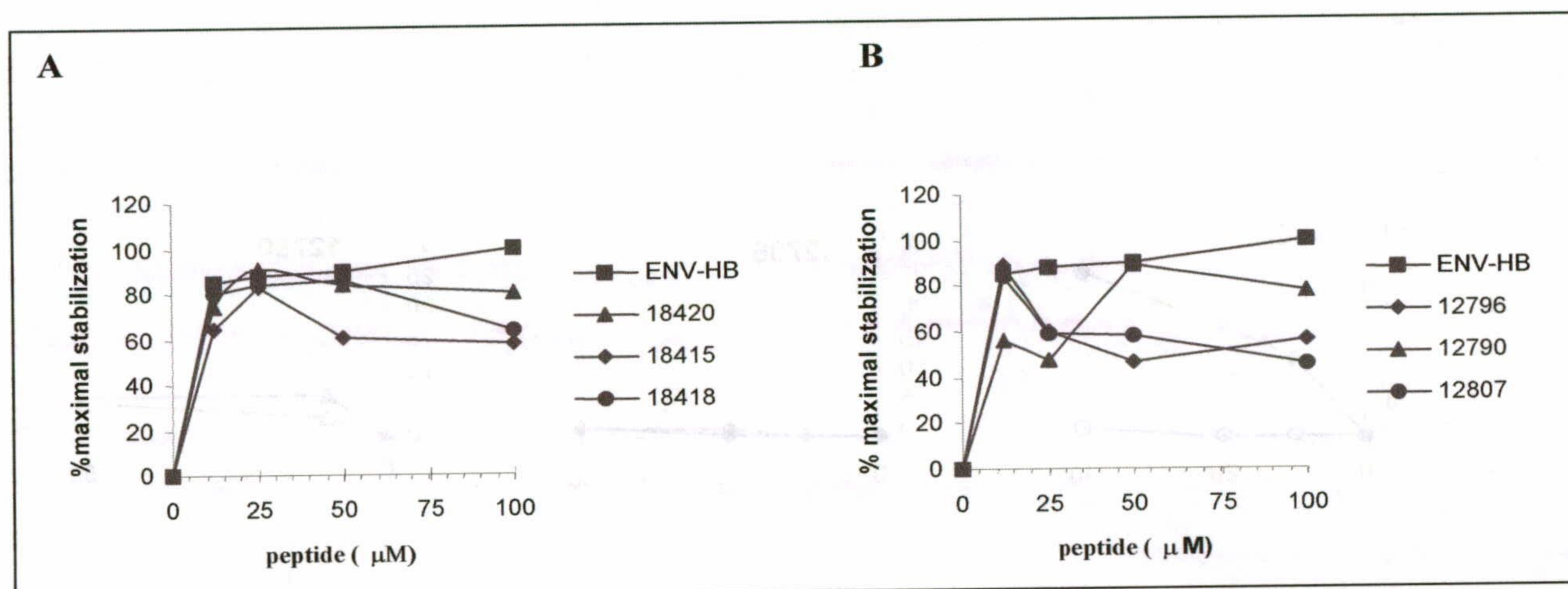


Fig39.-Porcentajes de máxima estabilización en función de la concentración. Se utilizaron las concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5 µM de cada uno de los péptidos incluyendo igual que en los ensayos anteriores el péptido de la envuelta del virus de la hepatitis B.

Como se observa en esta figura 5 de los seis péptidos seleccionados, resultaron estables a bajas concentraciones (la excepción es el péptido 12790), con porcentajes de estabilización máxima en torno al 80%.

Una vez seleccionados los péptidos realizamos un nuevo ensayo de CTL utilizando en este caso como presentadoras células EL4 ó Jurkat A2/Kb cargadas con cada uno de estos péptidos. A la vista de los resultados obtenidos anteriormente en este caso como efectoras sólo empleamos los esplenocitos de ratones que habían sido inoculados con PAR1-HSP70 que se enfrentaron a los péptidos de PAR1 y esplenocitos de ratones inoculados con

PAR2-HSP70 que se estimularían con los péptidos de PAR2. Tras tres estimulaciones in vitro con cada uno de los péptidos se realizó el ensayo de liberación de cromo cuyos resultados se muestran en las siguientes figuras:

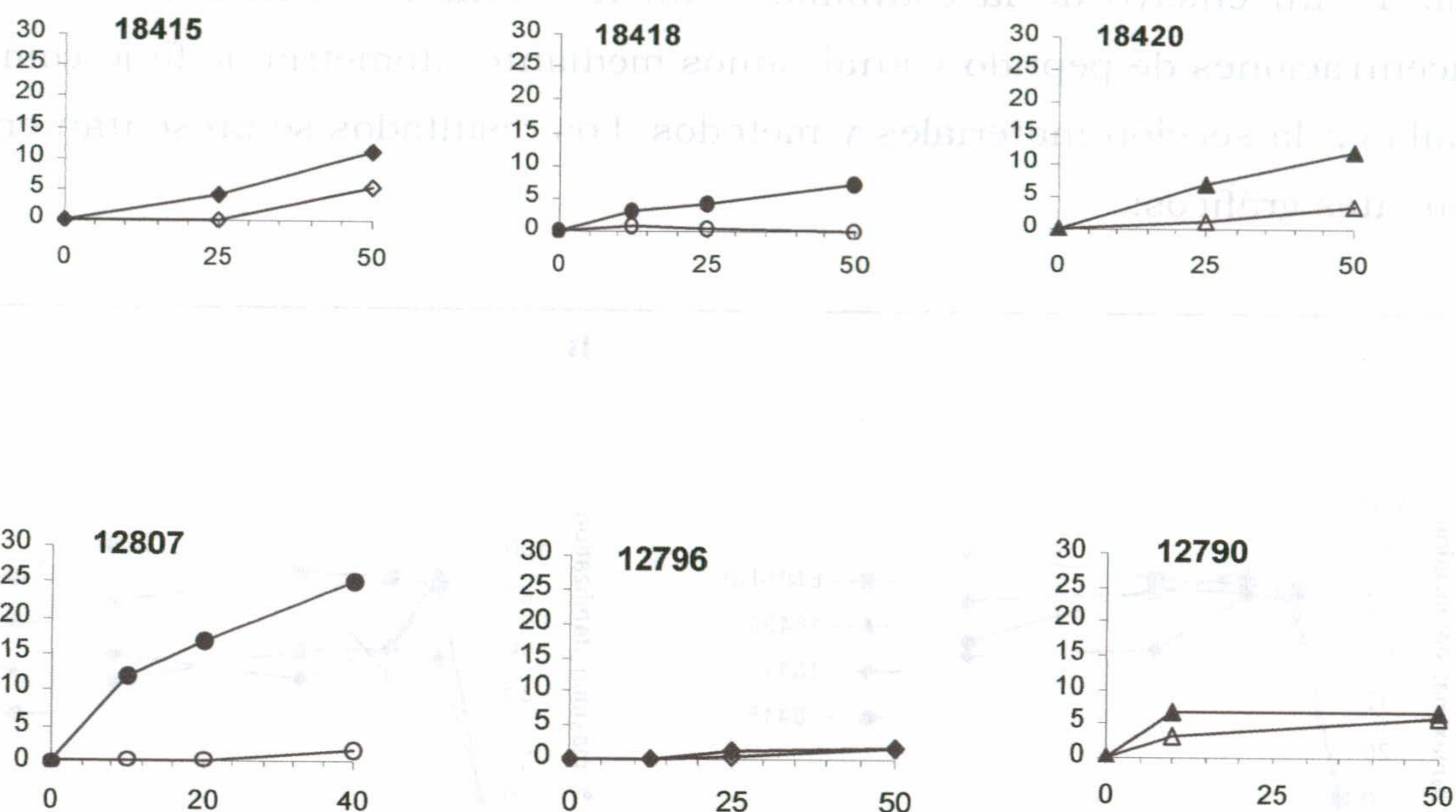


Fig 40-**Ensayo de citotoxicidad con los péptidos A2 de PAR1 y PAR2.** (A) Se muestran los porcentajes de lisis específica en función de distintas proporciones efectora:diana, obtenidos para los péptidos de PAR1 (18415,18418,18420) frente a esplenocitos de ratones inoculados con los genes PAR1-HSP70 fusionados. (B) Porcentajes de lisis específica obtenidos cuando se emplearon células cargadas con los péptidos de PAR2 (12807,12796 y 12790) como dianas frente a esplenocitos de ratones que habían sido inoculados con la construcción que contenía PAR2-HSP70.

Como se observa en estos gráficos, en el caso de PAR1 no se aprecian grandes diferencias entre los porcentajes de lisis obtenidos con células sin péptido respecto a las células que presentan el péptido. Tan sólo en el caso del péptido 18420 (gráfico superior derecho) para una proporción E:D de 50:1 podemos apreciar un ligero aumento en el porcentaje de lisis respecto al control (12% frente a un 2% obtenido frente a células sin péptido).

Interesantemente para los péptidos de PAR2 comprobamos que cuando se enfrentan los esplenocitos de ratones inoculados con PAR2-HSP70 al péptido 12807 realmente se observa un elevado porcentaje de lisis específica, en torno a un 30% para una proporción E:D de 50:1. Este péptido se puede considerar como un epítipo A2 contenido en la proteína PAR2.

4.4.3.4.-Análisis de la capacidad protectora.

4.4.3.4.1.-Parasitemia en ratones vacunados e infectados.

Todos los estudios de respuesta inmunológica comentados hasta ahora, fueron realizados antes de someter a los ratones al reto con formas infectivas del parásito. Ahora teníamos que comprobar qué efectos tenían estas respuestas, humoral y celular que habíamos generado tras la inmunización con los plásmidos. Para ello se realizó una infección experimental en la cepa BALB/c, con tripomastigotes procedentes de cultivos como ya se comentó en materiales y métodos, con objeto de que no resultasen letales, permitiendo a los animales alcanzar la fase crónica de la enfermedad y poder así realizar estudios de protección.

Cuatro ratones de cada grupo aproximadamente entre 10 y 12 semanas tras la última inoculación de DNA, fueron infectados con 2500 parásitos/ratón de *T. cruzi* cepa Y via intraperitoneal. Tras la infección se realizó un seguimiento de la parasitemia, en ambas cepas los resultados obtenidos se resumen en los siguientes gráficos:

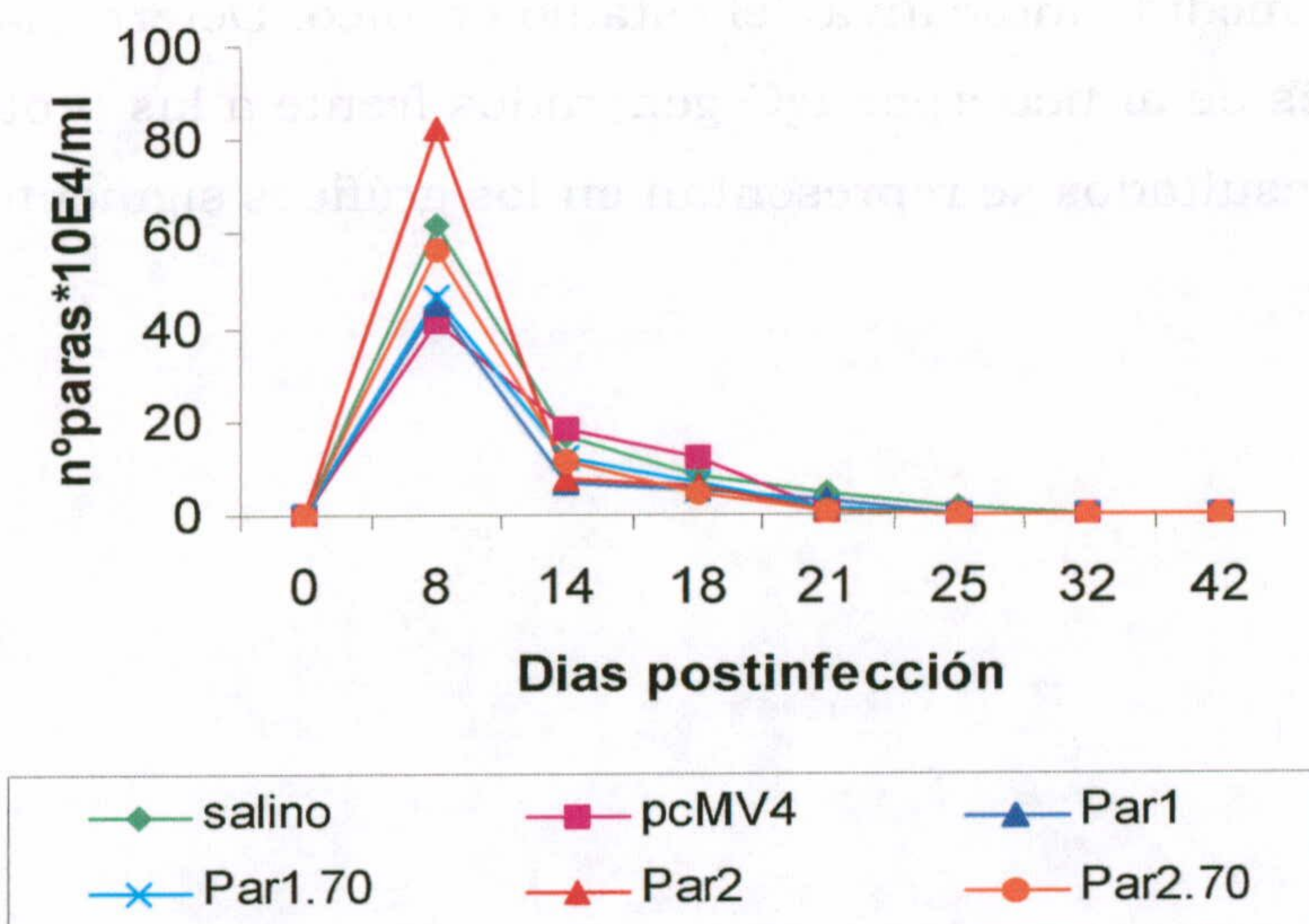


Fig41.-Parasitemia en ratones BALB/c inoculados con DNA, tras la infección con 2500 parásitos/ratón. En cada grupo se muestra el valor medio expresado como número de parásitos $\times 10^4$ /ml, obtenido para cuatro ratones de un mismo ensayo.

Como se puede observar en estos gráficos, aunque existen ligeras diferencias en el nivel de parasitemia, aquellos ratones que fueron inoculados con el vector vacío, con solución salina y con la PAR1 tardan unos días más en aclarar el parásito en sangre. Los ratones que fueron inoculados con PAR2 alcanza un máximo superior al resto, en aproximadamente 7 días, sin embargo a los 14 días el número de parásitos es casi cero.

4.4.3.4.2.-Anticuerpos en ratones inmunizados e infectados

Nos preguntamos ahora, si los ratones que habían sido inmunizados con nuestros antígenos, serían capaces de responder a la infección y qué ocurría con los anticuerpos anti-PARs que se habían generado en ambas cepas cuando estos ratones entraban en contacto con el parásito. Para ello utilizamos ratones de la cepa BALB/c infectados con 2500 parásitos /ratón vía intraperitoneal y se recolectaron los sueros en los días 8, 11, y 21 de infección como indicativos de la fase aguda, si tenemos en cuenta que en unos 21 días como media el parásito desaparece de la sangre, y dos meses post-infección, como medida indicativa del estadio crónico. Determinamos mediante ELISA los niveles de anticuerpos IgG generados frente a las proteínas PARs en infección y los resultados se representan en los gráficos siguientes:

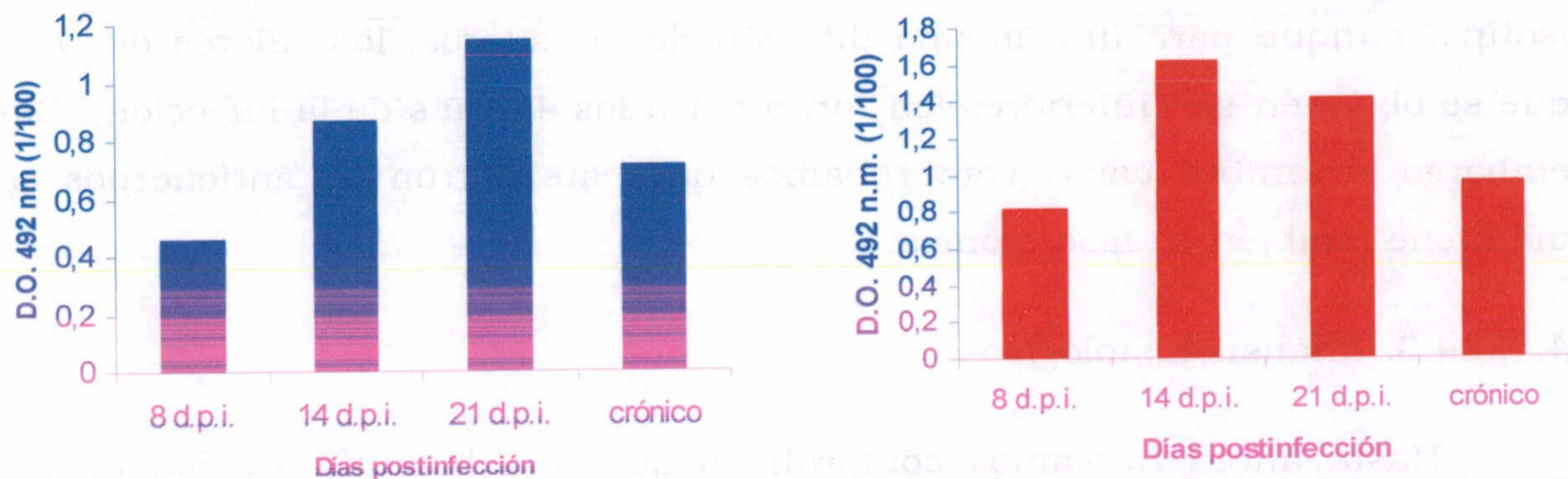


Fig42.-Niveles de anticuerpos frente a PAR1 (derecha) y PAR2 (izquierda) en ratones de la cepa BALB/c inmunizados con el DNA de PAR1 (en azul) y de PAR2 (en rojo).

Seguidamente se realizó un tipaje del tipo de anticuerpos generados (IgG1 e IgG2a) en ratones vacunados tras la infección y los resultados se muestran en las siguientes figuras:

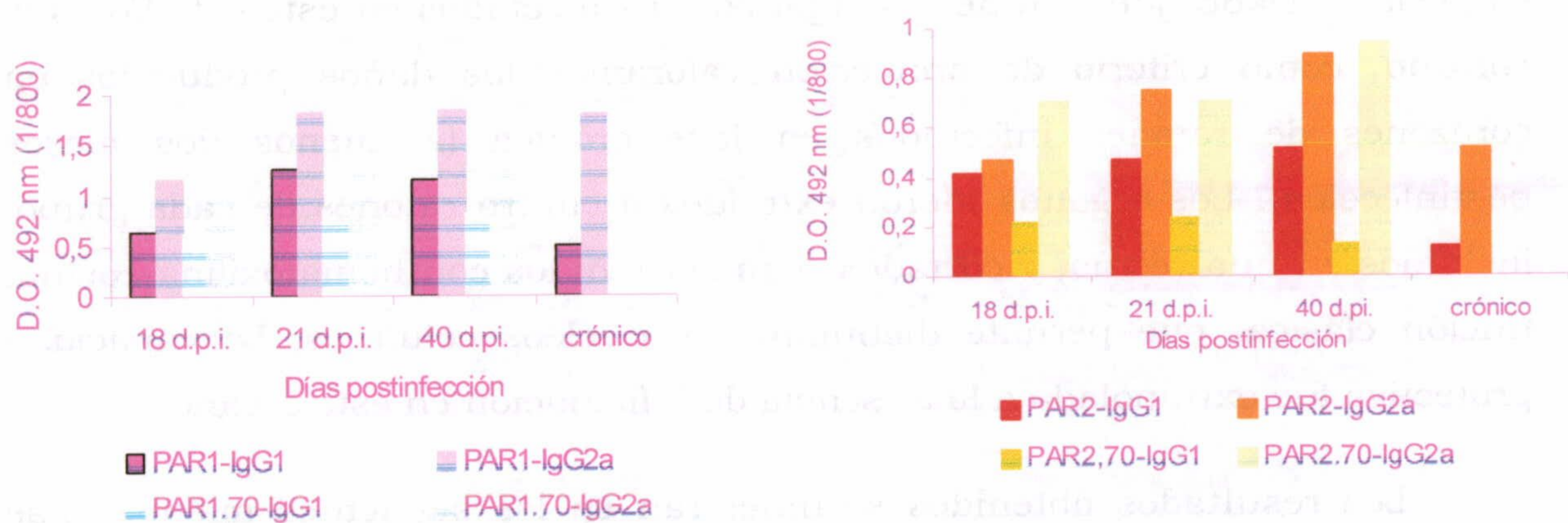


Fig 43.-Niveles de anticuerpos frente a PAR1 (gráfico izquierdo) y frente a PAR2 (gráfico derecho) en ratones inoculados e infectados. Se determinaron los niveles de IgG1 e IgG2a

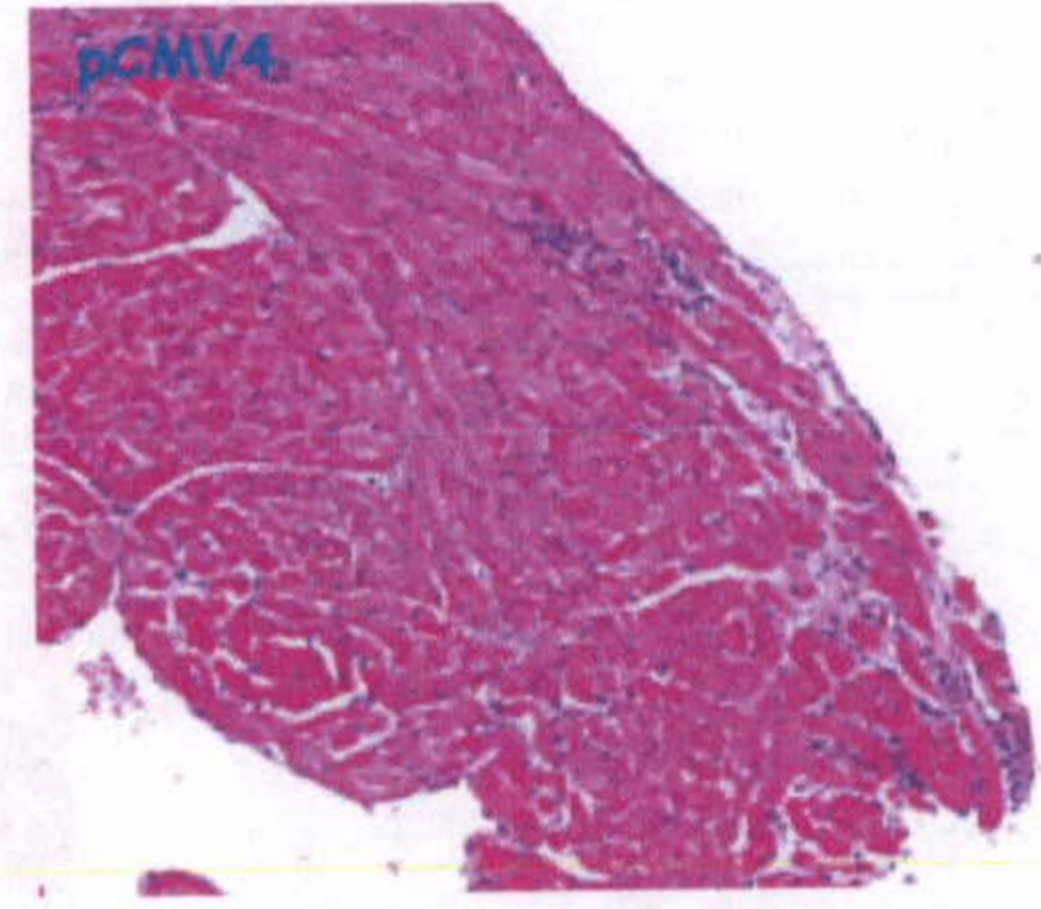
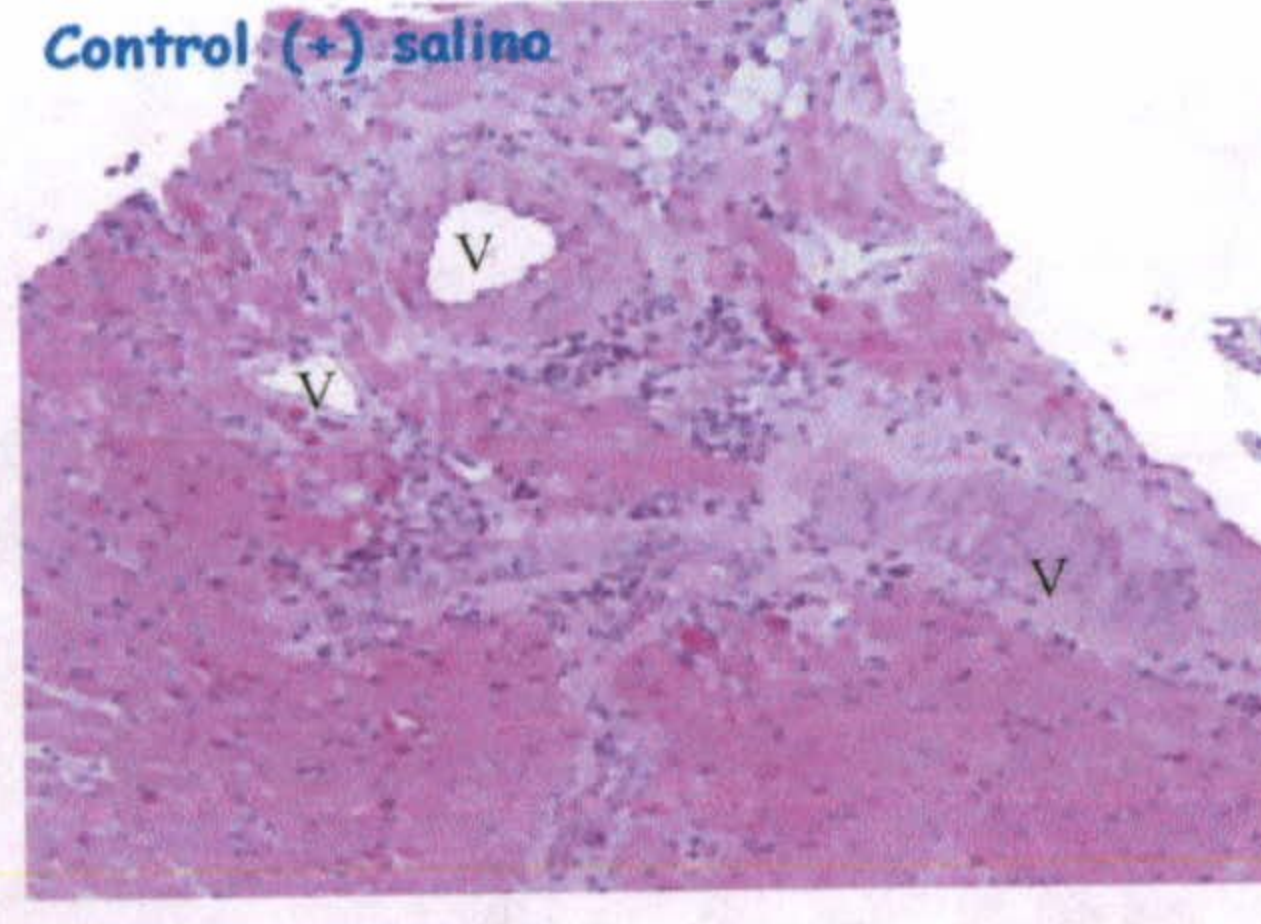
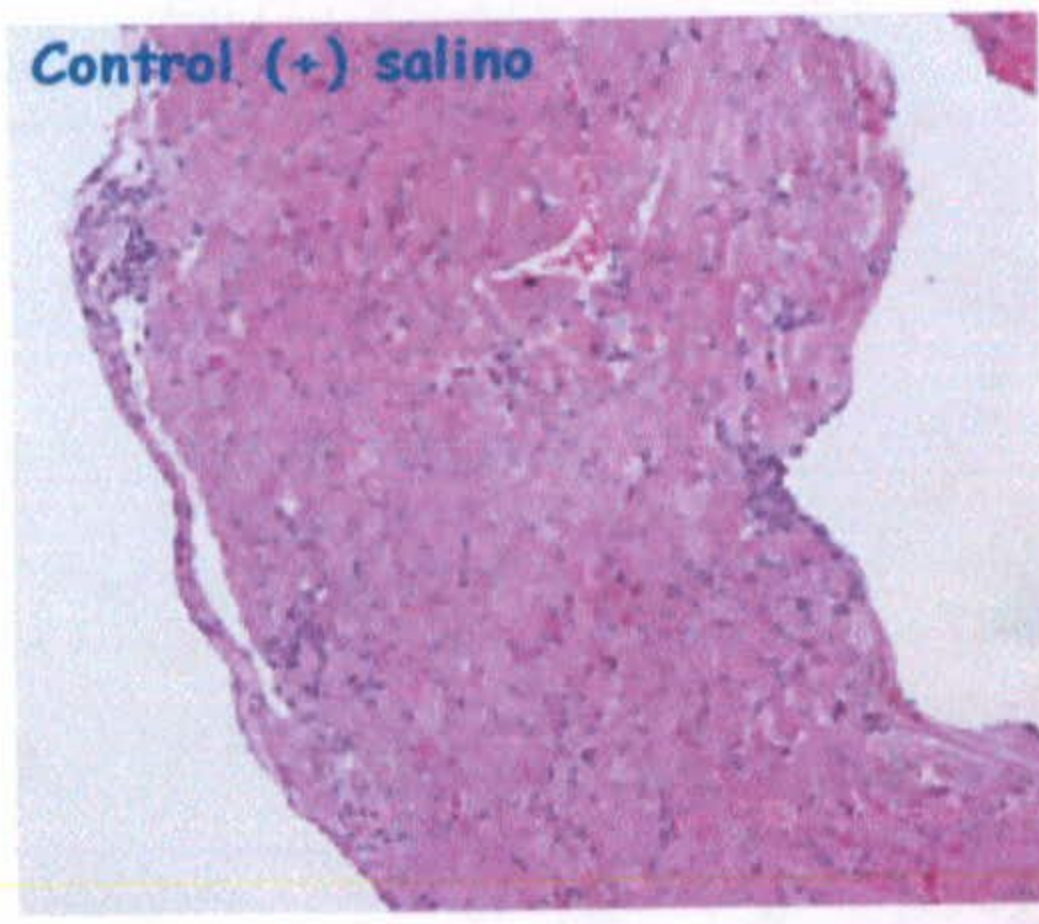
Como podemos comprobar se observan altos niveles de anticuerpos (dilución 1/800) frente a las dos proteínas siendo fundamentalmente IgG2a. Sin embargo cabe destacar que los niveles de anticuerpos en este caso son superiores frente a la proteína PAR1, con valores de IgG2a en torno a 1.5 ,

que además se mantienen en la fase crónica de la infección. En el caso de PAR2 comprobamos que estos anticuerpos son también principalmente de este isotipo, aunque para una misma dilución de los sueros, los valores de D.O. que se obtienen son inferiores (en torno a 1 a los 40 días de la infección). Sin embargo en ambos casos comprobamos que este patrón de anticuerpos se mantiene también en fase crónica.

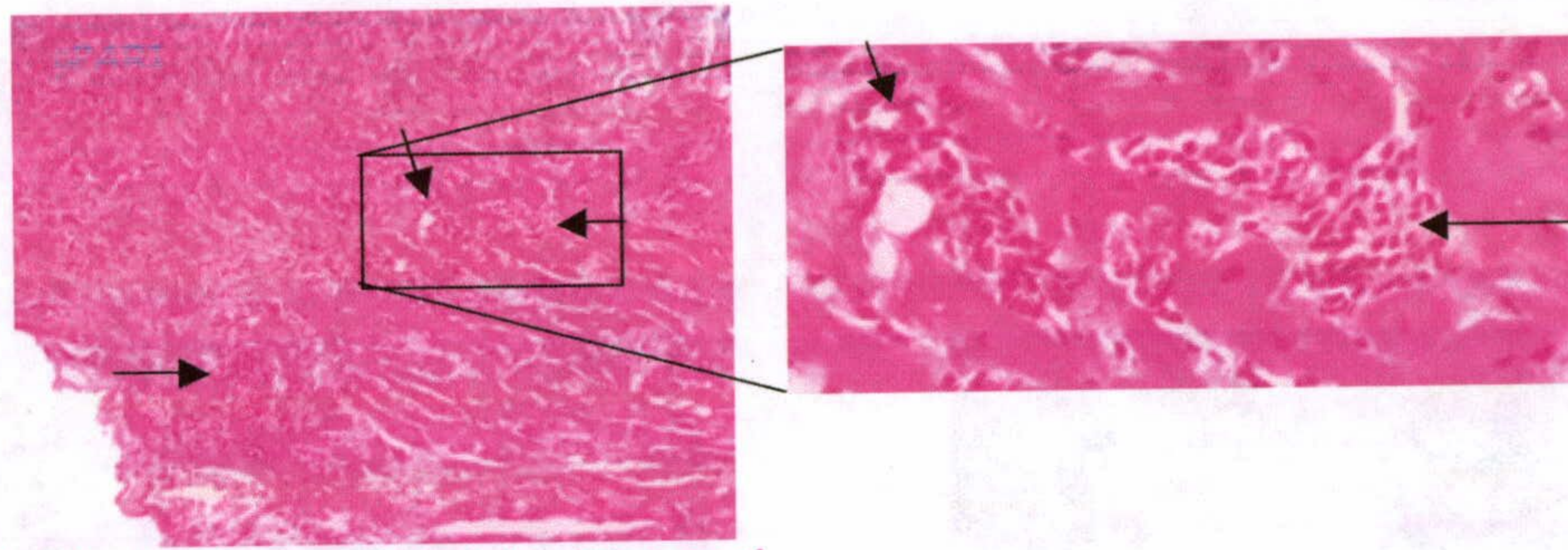
4.4.3.4.3.-Análisis histológicos:

Hasta ahora habíamos comprobado que tras la inmunización de los ratones de las dos cepas empleadas en nuestros ensayos, se generaba una respuesta humoral y celular a priori asociada a protección. Necesitábamos entonces demostrar que realmente esta respuesta inmunológica se traducía en la protección de estos ratones frente a la infección por *T. cruzi*. Como hemos comentado para la infección se emplearon tripomastigotes atenuados tras dos pases por cultivo de células LLCMK (línea de fibroblastos). De esta forma los ratones, de la cepa susceptible, BALB/c alcanzarían la fase crónica de la infección en la que evaluamos la capacidad protectora de los cuatro plásmidos empleados. Dado que uno de los órganos más afectados en este estadio es el corazón, como criterio de protección valoramos los daños producidos en corazones de ratones infectados en fase crónica (al menos dos meses postinfección). Los órganos fueron extraídos a cuatro ratones de cada grupo, incluidos en una resina, y cortados para ser teñidos con hematoxilina-eosina, tinción clásica, que permite distinguir los núcleos celulares. La capacidad protectora fue extrapolada a la ausencia de inflamación en este órgano.

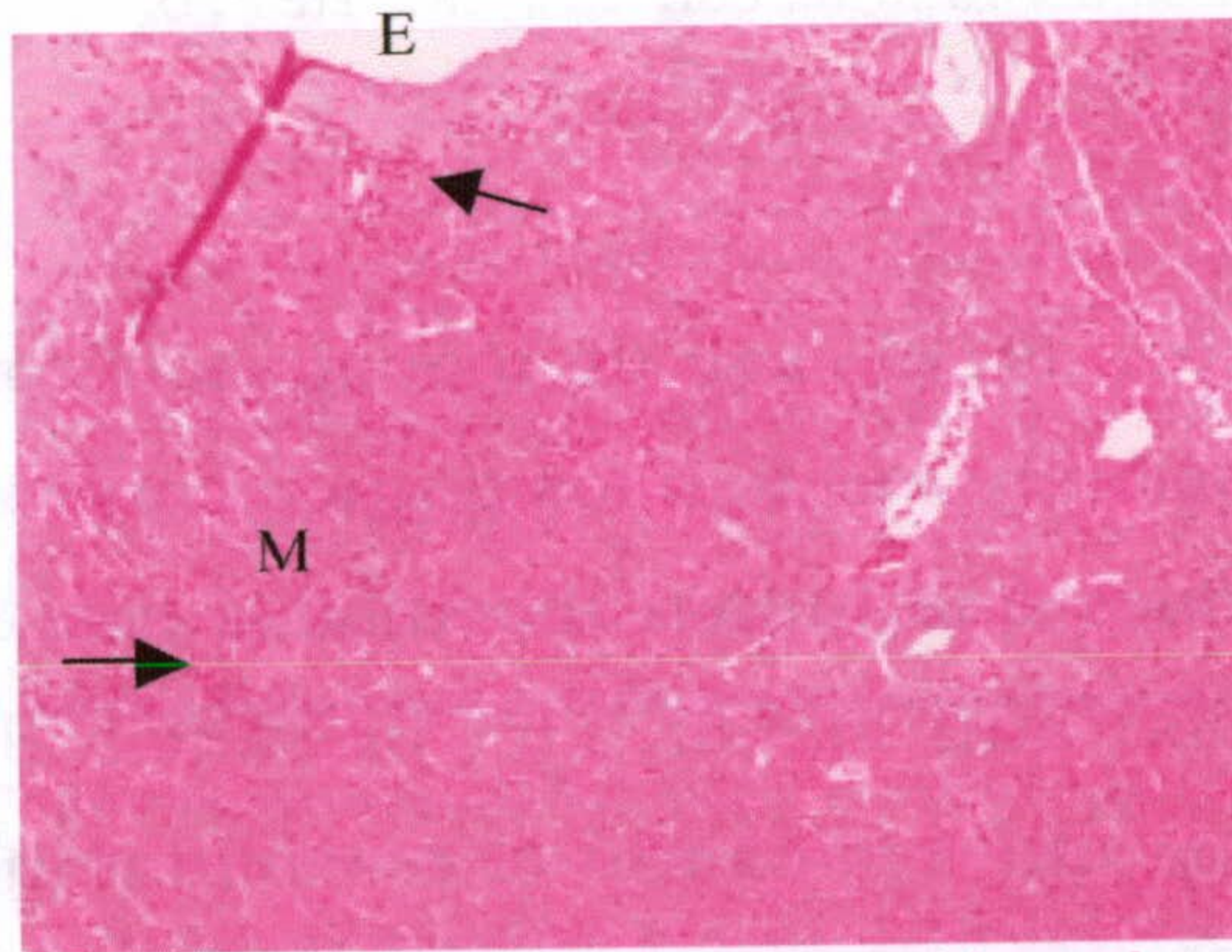
Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes microscopías (figuras 45 y 46):



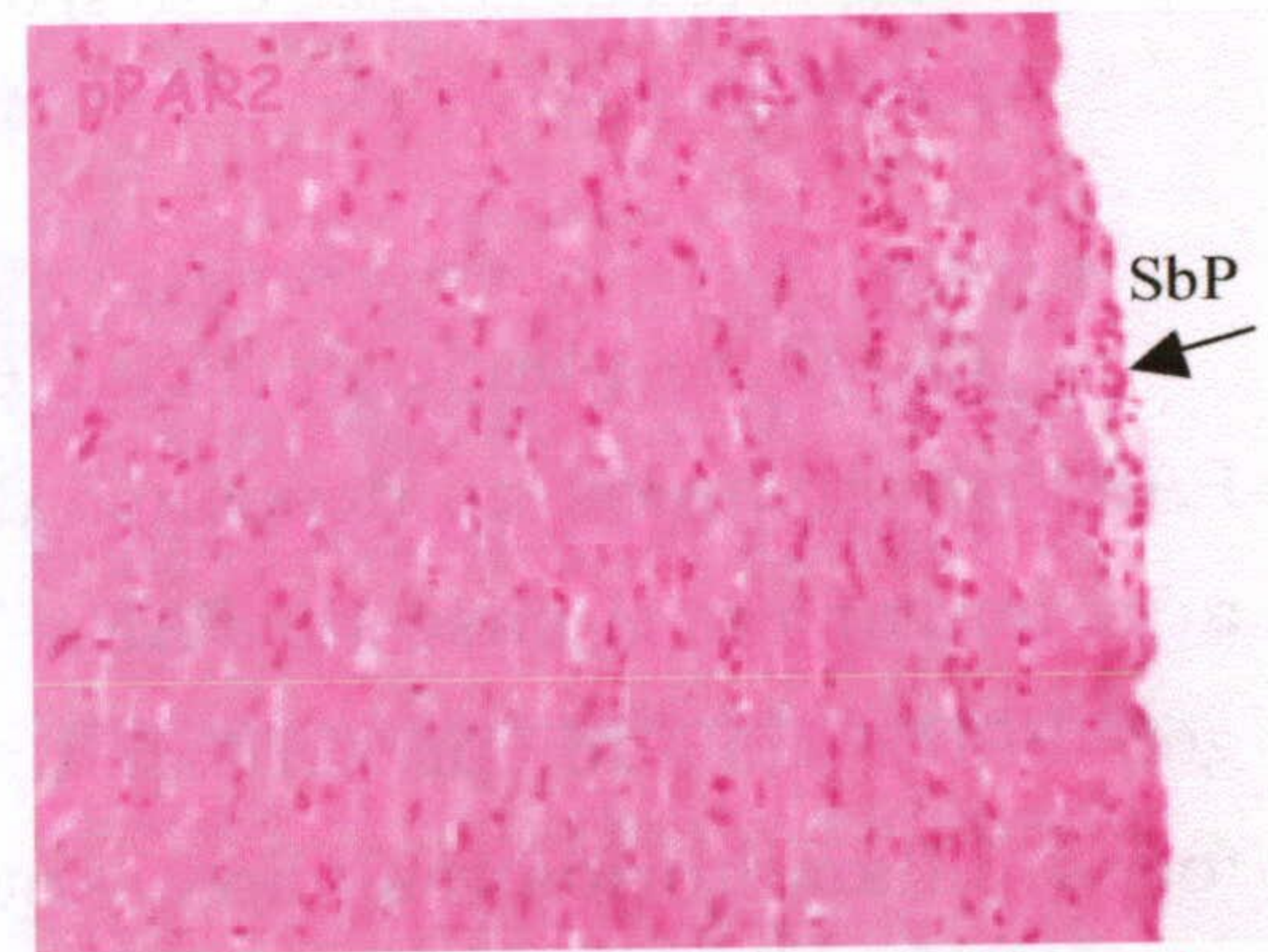
Inflamación a distintos niveles en los grupos control, tanto salinos, como inoculados con el vector vacío (pCVM4)



Infiltrado inflamatorio crónico intramural intenso (HE, 10x)



Pequeños focos de inflamación sub-endocardios e intramurales (HE, 10x)



Pequeños focos de inflamación sub-pericárdicos aislados (HE, 10x)

Fig45.-Cortes histológicos de corazones de ratones inoculados e infectados: grupos control (paneles superiores) y de los ratones inoculados con PAR1 (zona central), PAR1-HSP70 (inferior izquierda) y PAR2 (inferior derecha).

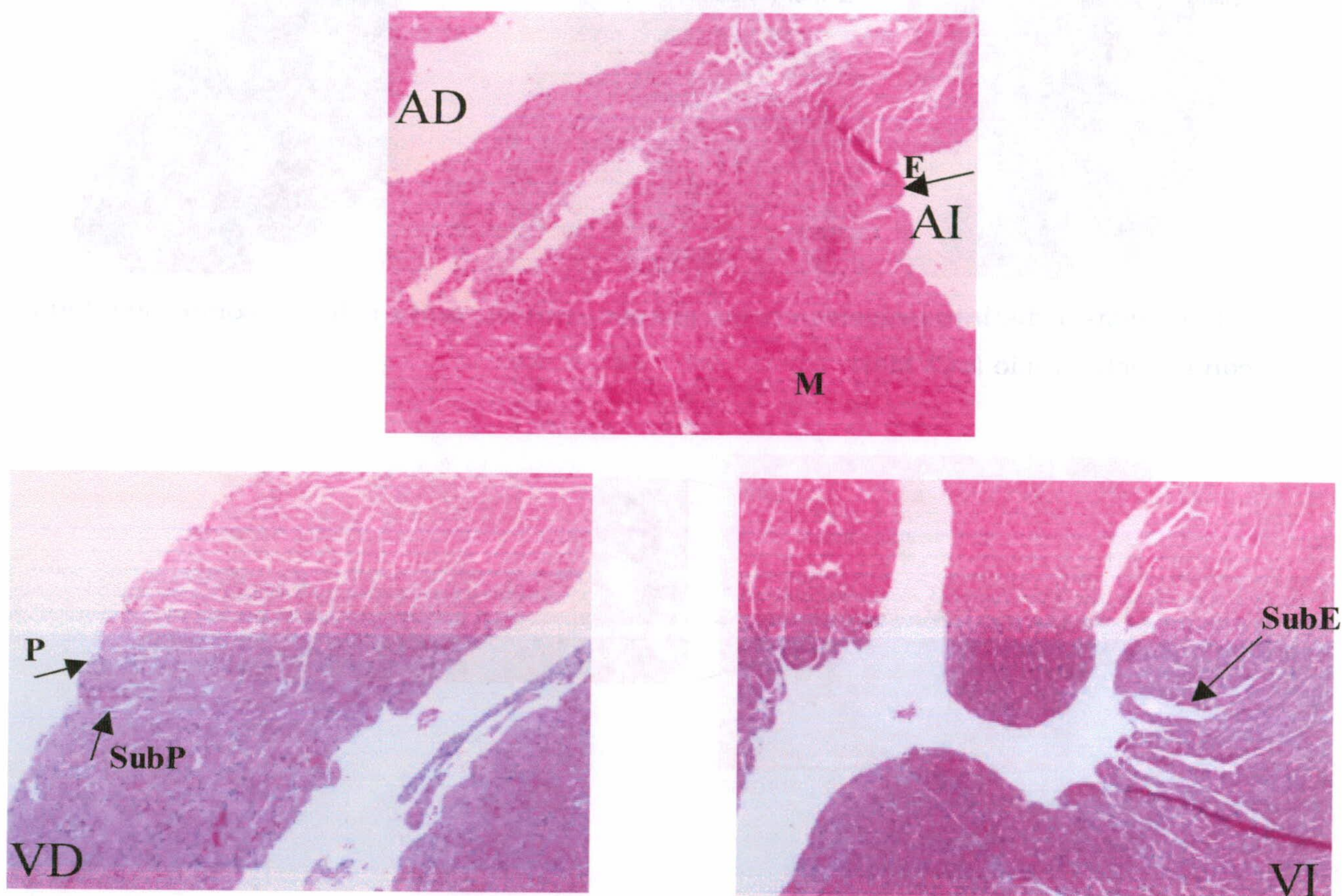


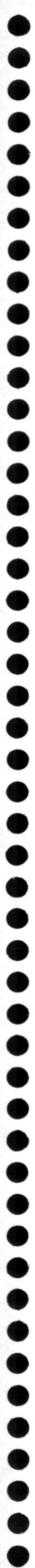
Fig46.-Tejido cardíaco normal, correspondiente a ratones inoculados con la PAR2-HSP70

Como se puede apreciar en estos cortes, en el caso de inoculación con PAR1 observamos un descenso de la inflamación respecto a los grupos control, aún mayor en el caso de PAR1-70. Los ratones que fueron inoculados con el gen PAR2 aislado, presentan una inflamación aún menor, con presencia de focos inflamatorios aislados. Aquellos ratones que recibieron el plásmido que contenía el gen PAR2 fusionado a la HSP70 presentaron un tejido cardíaco muy similar al normal, con ausencia de focos inflamatorios en aurículas y ventrículos, como muestra la figura 46.

Podemos concluir por tanto, que estos ratones resultaron protegidos frente a la infección por *T. cruzi* y aquellos que recibieron PAR2 ó PAR1-HSP70, presentaron un grado de inflamación menor que los grupos controles, lo que podría apuntar a una protección parcial en dichos grupos.



Discusión



1.-Clonaje, expresión y purificación de las proteínas PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma cruzi* en un sistema procariota.

Para comenzar los estudios realizados en esta tesis, obviamente lo primero que necesitábamos era conocer los genes que codificaban estas proteínas así como obtener PAR1 y PAR2 en forma de proteínas recombinantes para realizar los distintos ensayos. En el caso de los genes cuando comenzaron estos trabajos en las bases de datos estaban disponibles las secuencias de ambos genes. Aunque habían sido caracterizadas en la cepa *Esmeraldo* en base a la secuencia nucleotídica de ambas se diseñaron unos oligonucleótidos que mapeaban en los extremos 5' y 3' de cada una de ellas que nos permitieron su amplificación mediante PCR a partir de DNA genómico de *T. cruzi* cepa Y. La secuenciación de estos amplificados nos confirmó que no existían cambios significativos a pesar de ser cepas distintas lo que indicaba un alto grado de conservación entre cepas.

Estos fragmentos que codificaban para las proteínas PARs (1,8Kb en el caso de PAR1 y 1,9Kb en el caso de PAR2) fueron ahora subclonados en un vector de expresión procariota con el fin de obtener las proteínas recombinantes. En el caso de PAR1 seleccionamos el vector pQ, este vector se presenta de forma comercial en 3 versiones con distinta fase de lectura, en nuestro caso seleccionamos el pQE32 de forma que nuestro inserto que por otra parte contenía el ATG iniciador pudiese ser expresado de forma correcta, bien utilizando el ATG del vector o el suyo propio. Tras adicionar el agente inductor comprobamos una expresión bastante elevada de la proteína PAR1 en cultivos de *E. Coli* cepa M15, recomendada por el fabricante. Incluso en ausencia del agente inductor, estos cultivos expresaban grandes cantidades de proteína. Probablemente debido a esta alta expresión, la proteína PAR1 se acumulaba en cuerpos de inclusión resultando ser totalmente insoluble en un tampón fosfato estandar. Anteriormente esta proteína se había purificado de forma nativa a partir de extractos proteicos de tripomastigotes pero no había sido purificada en forma de proteína recombinante. En estos extractos de parasitos resultó ser igualmente insoluble con la dificultad añadida de que dada su similitud bioquímica, tamaño o punto isoeléctrico con otras proteínas paraflagelares, o con la tubulina era difícil de obtener completamente aislada del resto. Durante la realización de esta tesis este mismo grupo ha clonado el

gen de PAR1 en un vector de expresión pTrcHisA, resultando ser también insoluble (Luhrs 2003). En su caso han recurrido a dos pasos de purificación, primero mediante cromatografía de afinidad a níquel y segundo un gel preparativo de SDS-PAGE. Igualmente comprobaron que la proteína formaba cuerpos de inclusión, lo que les llevó a utilizar el SDS que no pudieron retirar totalmente de las preparaciones, dejando un bajo porcentaje de 0.05%. En nuestro caso la solubilización se realizó con urea a altas concentraciones, 8M, sin embargo tras extensivas diálisis de las muestras, comprobamos que la proteína PAR1 resultaba altamente estable mientras permaneciese este agente en el tampón y renaturalizaba correctamente al dializar frente a concentraciones decrecientes de urea, obteniéndose finalmente en su estado renaturalizado. Además pudimos comprobar que esta proteína podía soportar un amplio rango de pHs que oscilan desde 8 hasta 4, a pesar de tener un punto isoeléctrico en torno a 5. En nuestro protocolo de purificación utilizamos una elución por pH y dada la alta expresión de proteína pudimos comprobar que desde un pH6 hasta 4 la proteína podíamos obtener proteína más o menos pura. Las fracciones más puras se obtuvieron a pH4 dado que a mayores pHs a pesar de obtener también proteína, el número de contaminantes era mayor.

En el caso de la proteína PAR2 al igual que sucedió con PAR1, no se observaron cambios significativos a nivel de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de esta proteína en la cepa *Esmeraldo*. El sistema de purificación seleccionado en este caso fue el del vector p-CAL. En este caso se realizó un clonaje independiente de ligación, y se utilizó la cepa de *E.coli* Bl21. A diferencia de lo que ocurriese con PAR1 esta proteína resultó ser parcialmente soluble en el tampón utilizado. Se incluía en su extremo amino en este caso un péptido de unión a calmodulina que permitiría su purificación. El crecimiento del cultivo se realizó a 28°C lo que probablemente facilitó su obtención en el extracto soluble. La elución se realizó mediante la adición de calcio sin necesidad de modificar el pH al que se había solubilizado. Al igual que PAR1 la proteína PAR2 sólo había sido purificada a partir de extractos de epimastigotes mediante SDS-PAGE y en este mismo año, en forma de proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel y electroforesis preparativa (Lurhs et al 2003). Nuestro protocolo de purificación presenta la ventaja de que es factible obtener esta proteína en un estado nativo, mediante una purificación de la fracción solubilizada, que contenía un alto porcentaje

de proteína. Dada la alta expresión de la proteína en este sistema, se realizó además una segunda purificación de la fracción insoluble, lo que nos permitía obtener mayores concentraciones de proteína que tras ser dializada, al igual que sucedió con la PAR1, comprobamos renaturalizaba correctamente.

Aunque no se ha comentado en resultados, en materiales y métodos mencionamos la obtención de anticuerpos policlonales de conejo utilizando estas proteínas junto adyuvante de Freud, como agente inmunógeno. En este proceso pudimos comprobar que ambas eran capaces de inducir altos niveles de anticuerpos, tras tres dosis de unos 200µg, específicos frente a las mismas, lo que de alguna forma nos corroboraba que la conformación que adoptaban tras la diálisis era correcta o al menos suficiente para que pudiesen ser reconocidas por el sistema inmune. En este sentido la PAR1 resultó ser más estable que la PAR2, siendo posible realizar varios ciclos de congelación y descongelación de las muestras sin necesidad de añadir glicerol. En el caso de PAR2 la proteína purificada de extractos solubles, así como la obtenida de los insolubles tras ser dializada era más sensible a la degradación.

2.-Antigenicidad de las proteínas PAR1 y PAR2 de T.cruzi en infección natural.

En los primeros trabajos que se realizaron con estas proteínas, se había podido comprobar mediante "western blot" que estas proteínas podían ser reconocidas por sueros de pacientes chagásicos y no así por sueros de individuos sanos. Dado que en estos ensayos no se había utilizado proteínas totalmente purificadas, sino extractos de epimastigotes decidimos analizar con nuestras proteínas recombinantes el reconocimiento por sueros de pacientes chagásicos mediante la técnica de ELISA. De esta forma de manera más precisa podríamos estimar el grado de reconocimiento de ambas por parte de pacientes.

2.1.-Reconocimiento de las proteínas PAR1 y PAR2 por sueros de pacientes chagásicos.

Como se muestra en los resultados, a una dilución de los sueros de 1/800, frente a ambas proteínas observamos valores de densidad óptica elevados, entre 2 y 3. La batería de sueros empleada en estos ensayos incluye pacientes de distinta procedencia, Colombia y Venezuela, sin embargo los

niveles de Ig G observados son similares y elevados en ambos casos. Estos resultados nos estarían indicando el alto grado de conservación de estas proteínas en distintas cepas de *T. cruzi* ya que recordamos que existe diferentes cepas infectivas en distintas zonas geográficas aunque no se ha realizado un tipaje de la cepa en cada uno de estos pacientes. Además los valores observados en sueros de individuos sanos confirman la ausencia de reconocimiento de estas proteínas, de esta forma a pesar de su homología con proteínas formadoras de microtubulos o microfilamentos, aunque sólo a nivel estructural y en ningún caso a nivel de secuencia, no permite que sean reconocidas por anticuerpos de un individuo sano, lo que las convierte en un buen candidato con fines inmunoprolifácticos o terapéuticos, salvando el problema de autorreactividades. Los anticuerpos frente a las PARs aparecen de forma específica en individuos afectados por la enfermedad de Chagas. Estos resultados están en concordancia con el único trabajo publicado sobre el reconocimiento de las PARs en pacientes chagásicos, que ha sido publicado en este año 2003. En este trabajo se ha comprobado que en 7 de los 8 pacientes analizados, de Brasil todos ellos, aparecen anticuerpos frente a las proteínas PARs. Nuevamente en estos trabajos se han empleado proteínas obtenidas de extractos totales del parásito para realizar las ELISAS. En el estudio se incluyen pacientes con distinto grado de enfermedad por supuesto individuos sanos, sin embargo mediante la técnica de ELISA cuando utilizan las proteínas recombinantes purificadas concluyen que no observan tan clara la diferencia de niveles de IgG frente a las PARs entre individuos sanos y pacientes chagásicos. En este trabajo apuntan que el isotipo de estos anticuerpos sería principalmente IgG1 e IgG3.

2.2.-Búsqueda de determinantes antigénicos contenidos en las proteínas PARs

A la vista de los resultados obtenidos en estos pacientes decidimos estudiar si estos anticuerpos IgG frente a las proteínas PARs se generaban frente a determinados epítopes de las proteínas. Así como se ha mostrado en la sección de resultados se emplearon un total de 33 péptidos de PAR1 y 30 de PAR2, no solapantes y que recorrían la secuencia completa de aminoácidos de ambas proteínas.

En este caso la dilución de los sueros fue bastante menor, 1/100 pero aún a esta dilución y a la vista del gráfico, podemos concluir que no existen epítopes B claros en ninguno de los dos casos. Nuestros resultados apuntan a un reconocimiento conformacional de estas proteínas, y quizá los péptidos que dan valores más elevados respecto a sueros control de individuos sanos, puedan indicarnos zonas de la proteína que debido a su conformación quedan más expuestas. En el caso de la proteína PAR1 encontramos un par de péptidos en la zona central y hacia su extremo carboxilo y en el caso de PAR2 aunque en general los valores de densidad óptica son algo más elevados, comprobamos que se trata de reacciones del péptidos con componentes del suero, puesto que en los controles los valores obtenidos son también más elevados. A pesar de ello, hemos localizado péptidos que igualmente debido a la conformación de la proteína pueden quedar expuestos, hacia la zona amino de esta proteína. Curiosamente es interesante mencionar que a pesar de alto grado de conservación que existe entre los distintos miembros de la familia de proteínas paraflagelares las mayores divergencias se localizan en los extremos amino y carboxilo, que precisamente son en los que situamos posibles epítopes, o estructuras más antigénicas.

3.-Antigenicidad de las proteínas PAR1 y PAR2 en infección experimental murina.

Dado que el modelo empleado en esta tesis es un modelo murino, era necesario conocer el curso de los anticuerpos en infección experimental y comprobar si el comportamiento de los mismos era similar al que habíamos observado en infección natural. Para ello ratones de las cepas C57BL/6 (modelo de resistencia) y BALB/c (como modelo de susceptibilidad) fueron infectados por tripomastigotes de la cepa Y obtenidos como se detalla en materiales y métodos. En estos ratones se realizó un seguimiento de los niveles de anticuerpos tanto en fase aguda como crónica. En el caso de infección natural obviamente sólo pudo hacerse en fase crónica, dada la dificultad para diagnosticar esta enfermedad no disponíamos de sueros de pacientes en fase aguda, sin embargo en un modelo experimental podemos realizar un seguimiento completo de la enfermedad.

3.1.-Reconocimiento de las proteínas PARs por sueros de ratones infectados.

Los sueros de ratones infectados como se comentó fueron recogidos a lo largo de la infección, se incluyeron tres ratones por grupo de los que se realizó un seguimiento de la parasitemia para corroborar que el proceso de infección había sido correcto. Como se muestra en los gráficos obtenidos tanto en la cepa BALB/c como en C57BL/6 existen anticuerpos tipo IgG frente a las proteínas PARs en la fase aguda y crónica. Estos resultados nos indican por una parte que estas proteínas son altamente antigénicas, puesto que tras la infección en tan sólo 5 días aparecen anticuerpos frente a ellas. Por otra nos confirman que el modelo murino resulta válido para el estudio de esta enfermedad ya que al menos en la producción de anticuerpos, el comportamiento de los ratones es muy similar al de los humanos.

Como se observa en los gráficos existen diferencias entre cepas y entre las dos proteínas ensayadas. En general podemos comprobar que los niveles de anticuerpos IgG frente a PAR1 y frente a PAR2, en los ratones infectados aparecen algo antes en los ratones C57BL/6 sin embargo son mayores en la cepa BALB/c durante la fase aguda. Además en fase crónica ocurre lo contrario, comprobamos que en la cepa resistente los anticuerpos frente a PAR1 y frente a PAR2 aparecen en niveles mayores que en la cepa susceptible. De alguna forma esto podría estar dando a las proteínas PARs un papel en la protección a infección que sufren los ratones de la cepa C57BL/6. Estos anticuerpos aunque obviamente no serían indicativos de protección, podrían estar implicados en la resistencia a la infección que presenta esta cepa, junto con otros elementos como expresión de moléculas de coestimulación o citoquinas (Planelles et al 2003).

En cuanto a la determinación de isotipo, a diferencia de los resultados obtenidos en infección natural (Michailowsky et al 2003) estos anticuerpos son principalmente tipo IgG2b aunque en nuestro caso no hemos realizado el análisis de Ig G1 o IgG3, sí podemos decir que los niveles de IgG que hemos observado en infección experimental son principalmente IgG2b.

3.2.-Análisis de determinantes antigénicos contenidos en la proteínas PARs.

Al igual que hicimos en infección natural quisimos determinar si estos anticuerpos IgG que observamos frente a las PARs en infección experimental, estaban dirigidos hacia epítopes concretos de las proteínas. Comprobamos que los resultados eran algo distintos de los observados en humanos. En el caso

de la proteína PAR1 localizamos unos epítopes similares a los humanos, hacia la región central y carboxilo terminal. Sin embargo, en el caso de la proteína PAR2 apareció un claro epítipo B, con valores de D.O, en torno a 2 en comparación con un suero control, de un ratón no infectado.

4.-Diseño de una vacuna genética basada en la utilización de los genes PAR1 y PAR2 de T. cruzi. Papel inmunomodulador de la HSP70.

4.1.-Construcción de vectores vacuna de DNA. Expresión de los genes PAR1 y PAR2 tanto aislados como fusionados a la HSP70.

Como vector vacuna utilizamos el vector pCMV4. Este vector posee un promotor "fuerte" el del citomegalovirus (CMV) y ha sido ampliamente utilizado en ensayos de vacunación genética. El vector incluye además una señal de poliadenilación que permite la estabilización del mensajero, y un intrón, el intrón A que permitirá la salida de este mensajero al citoplasma.

Para chequear nuestros constructos, lo primero que se hizo fue secuenciarlos, así comprobamos que en todos los casos los insertos, genes de PAR1, PAR2, y las fusiones con la HSP70 estaban en la fase correcta de lectura. Ahora necesitábamos cerciorarnos de que en un sistema mamífero eran capaces de expresarse correctamente cada una de las proteínas. Estos ensayos se realizaron mediante transfección transitoria, utilizando lipofectina, que forma un complejo liposoluble con el DNA. Se tomaron extractos celulares a distintos tiempos post-transfección y comprobamos que en nuestro caso la expresión era máxima entre 48 y 60 horas. Según se ha descrito el tiempo en el que se detecta máxima expresión en este sistema es variable, estando entre 24 y 48 horas. Probablemente el gran tamaño de nuestras proteínas, en torno a 80kD en el caso de las PARs aisladas y de unos 140kD para las fusiones con HSP70, hacen que nuestro mayores niveles de expresión se obtengan algo más tarde, aunque en este rango. También como se muestra en el western blot, cabe mencionar que no observamos diferencias de tamaños, respecto a los valores teóricos esperados en función de la secuencia. El anticuerpo empleado, por otra parte, si bien no estaba purificado comprobamos que reconoce de forma específica estas proteínas, y no existe reconocimiento inespecífico de ninguna proteína en este tamaño en los extractos de células que fueron transfectadas con el vector vacío.

También cabe mencionar que no se realizó una cuantificación de la expresión, de forma numérica, simplemente se cargó una concentración total de proteínas similar en todos los carriles del gel. Estimamos que en nuestro caso no es necesaria esta cuantificación pues sólo necesitábamos comprobar que los constructos expresaban correctamente.

4.2.-Vacunación con DNA. Modelo experimental.

En base a las numerosas referencias bibliográficas y a la experiencia de nuestro propio laboratorio, seleccionamos la vía intramuscular. Según se ha podido comprobar el uso de esta vía, aunque de manera dependiente del antígeno codificado por estos plásmidos, tiende a inducir una respuesta tipo Th1 y una producción de anticuerpos de isotipo IgG2a, relacionados con protección frente a la infección por *T. cruzi*. El número de dosis fue igualmente fijado en base a resultados previos obtenidos con otro antígeno de *T. cruzi*, la proteína KMP11, también ensayada en forma de vacuna genética. En función de los resultados podemos concluir que realmente en este caso eran necesarias al menos tres dosis en función de los niveles de anticuerpos observados, y seguramente una cuarta para generar la respuesta celular.

El modelo murino está ampliamente utilizado en ensayos de vacunación génica así como modelo de infección por *T. cruzi* como se comentó en el apartado de introducción. En base a nuestros resultados podemos concluir que el comportamiento de anticuerpos durante la infección experimental es muy similar al que tiene lugar en infección natural.

4.3.1.-Respuesta humoral inducida por las proteínas PARs en vacunas DNA.

Sorprendentemente ambas proteínas fueron capaces de inducir altos niveles de anticuerpos cuando fueron administradas en forma de DNA. Este hecho no es muy frecuente cuando se emplea la vacunación génica. La inducción de anticuerpos es frecuente pero no en niveles tan elevados. Pensamos que esto podría justificarse por la elevada antigenicidad de estas proteínas, resultando una alta producción de anticuerpos con una baja cantidad de antígeno, de hecho, tras la obtención de anticuerpos policlonales anti-PAR1 y anti-PAR2 en conejos, podemos decir que ambas son capaces de inducir altos niveles de anticuerpos IgG específicos, cuando son administradas como proteínas recombinantes.

En general, hemos podido comprobar que de forma independiente de haplotipo, estas proteínas en forma de DNA inducen la producción de anticuerpos IgG2a. La inclusión en los plásmidos de la proteína HSP70 no podemos decir que tuviese ningún efecto sobre el isotipo de estos anticuerpos y tampoco observamos un efecto claro sobre los niveles de estos anticuerpos. En otros casos se ha podido comprobar un aumento de anticuerpos IgG2a frente a antígenos fusionados a esta proteína. Estos resultados son fácilmente explicables por los altos niveles de anticuerpos generados, de esta forma es difícil observar diferencias entre grupos inoculados con los genes aislados y con la fusión a la HSP70. Además estas dos proteínas solas son capaces de inducir anticuerpos de isotipo IgG2a. Quizá en el caso de la PAR1, sí se puede apreciar una aparición más temprana de estos anticuerpos cuando se fusiona a la HSP70 para ser administrada en forma de vacuna genética, e incluso una mayor duración de estos anticuerpos.

4.3.2.-Respuesta celular. Análisis de determinantes antigénicos.

Como se mostró en los resultados, ambas proteínas son capaces de inducir la proliferación *in vitro* de esplenocitos de ratones que fueron inmunizados con los genes que contenían estos antígenos. A priori no podemos especificar si se trata de linfocitos T ó B, puesto que partimos de la población total de bazo. Si comparamos los índices de estimulación obtenidos entre los grupos que reciben los genes aislados y fusionados a la HSP70, una vez no apreciamos diferencias significativas. En el caso de la PAR2 los índices de estimulación obtenidos son idénticos, y en PAR1 existe sólo una ligera diferencia.

A la vista de los resultados obtenidos con los péptidos, con objeto de determinar posibles epítopes T, en general podemos decir que no hemos detectado epítopes claros, dado que los valores de índice de estimulación obtenidos fueron en todos los casos bastante inferiores a los que obtuvimos con las proteínas completas. Sin embargo, sí podemos decir que existen ciertas zonas de la proteína, que pueden no coincidir exactamente con los péptidos sintetizados que resultan reconocidas de forma preferencial estimulando la proliferación de esplenocitos *in vivo*. Así en el caso de PAR1 hemos localizado 5 posibles epítopes T, que se localizarían en la zona central y carboxilo de la proteína, curiosamente en regiones poco conservadas. Para PAR2 se han identificado 3 posibles epítopes, hacia la región amino o central.

Estas zonas podrían seleccionarse para ensayos posteriores en los que utilizásemos como antígeno sólo aquellas regiones de la proteína capaces de estimular una respuesta humoral o celular, incluso combinando en el mismo plásmido distintos epítopes de estas dos proteínas.

4.3.3.-Respuesta celular inducida tras la vacunación con los plásmidos. Ensayos de citotoxicidad.

Lo primero que llama la atención de estos resultados es la ausencia de respuesta citotóxica tanto en los ratones inoculados con PAR1 como en los que se inocularon con PAR2. Sin embargo, la inclusión de la HSP70 se traduce en la generación de linfocitos T citotóxicos frente a estas proteínas. Estos resultados en principio esperables, en base a nuestras premisas, ponen de manifiesto una vez más que la inclusión de la HSP70 en plásmidos, fusionada a otros antígenos, permite la generación de citotoxicidad frente a esos antígenos. Además en base a resultados previos en el laboratorio, obtenidos con la KMP11, sumándolos a éstos, podemos decir que este efecto resulta independiente de las características y tamaño del antígeno al que se fusiona. Las proteínas PARs no comparten ningún tipo de homología con la KMP11, ni en tamaño ni en secuencia, y sin embargo en ambos casos la inclusión de estos con la HSP70 se ha traducido en citotoxicidad específica frente al antígeno. Estos resultados además ponen de manifiesto la posibilidad de emplear esta molécula en vacunas genéticas para inducir citotoxicidad frente a distintos antígenos.

Además hemos podido comprobar que esta proteína de alguna forma, está mejorando el procesamiento de estos antígenos, como se deduce de los resultados obtenidos con células transfectadas con los genes PARs aislados o con las fusiones PAR1-HSP70 ó PAR2-HSP70. En ambos casos entendemos que el aumento en los porcentajes de lisis específica observados en esplenocitos estimulados in vitro, con Jurkat ó EL4 transfectadas, son explicables por un mejor procesamiento de las proteínas PARs que supone una mejor presentación de posibles péptidos citotóxicos. En el caso de PAR1 el aumento de porcentajes de lisis es aún más llamativo que en el caso de PAR2. Posiblemente esto se deba a la propia estructura de la proteína.

En cuanto a la identificación de posibles epítopes T citotóxicos contenidos en estas proteínas, podemos decir que en el caso de PAR2 hemos localizado un epítope CD8 claro, el péptido 12807, con porcentajes de lisis en

torno al 25%. No ocurre lo mismo en el caso de PAR1. Sólo fueron un total de 3 péptidos para cada una de las proteínas. Aunque a priori se sintetizaron 20 en el caso de PAR1 y 23 en el caso de PAR2, realizamos una selección en base a su capacidad de unión. Se ha descrito que la unión a estos motivos de clase I, puede ser un indicativo de la inmunogenicidad de los péptidos (Sette et al 1994). Además de unión comprobamos estabilidad y a la vista de los resultados podemos decir que una unión más estable no se traduce en una mayor inmunogenicidad.

En el caso de PAR1, se ha localizado en infección experimental la existencia de linfocitos T CD8 frente a un péptido situado en la secuencia aminoacídica muy cercano a los péptidos 18415 y 18418 que nosotros hemos ensayado. Hay que mencionar que en este caso no se consiguió demostrar la capacidad citotóxica de estos linfocitos CD8 capaces de reconocer este péptido. Nosotros pensamos que en esta región debe existir un epítipo citotóxico aunque no se corresponde exactamente con nuestros péptidos y quizá se necesiten ensayos posteriores para delimitarlo. Además es importante reseñar que el tipo de técnica que hemos empleado, ensayo de liberación de cromo, no es tampoco el más sensible para la determinación de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Así, creemos que la no determinación de porcentajes de lisis específica en el caso de ratones inoculados con las PARs aisladas no puede traducirse en la ausencia de citotoxicidad frente a ellas, más bien podría explicarse por la presencia de niveles bajos de linfocitos T CD8 citotóxicos que no somos capaces de detectar, aunque tampoco podemos asegurar que estos existan.

4.4.-Análisis de protectividad.

A pesar de todas las respuestas generadas tras la inoculación con nuestros plásmidos era necesario algo más. Nos planteamos así realizar ensayos de protección en fase crónica de la enfermedad. Sabemos que una de las principales complicaciones que presentan los pacientes afectados con chagas, son las cardiomiopatías. Además está ampliamente descrito que la reacción inflamatoria crónica en corazón correlaciona con la severidad de la enfermedad aunque exista cierta controversia sobre su origen (autoinmunidad versus presencia del parásito). Así tras atenuar nuestra cepa infectiva de *T. cruzi*, conseguiríamos que los ratones de la cepa susceptible, BALB/c llegasen a un estadio crónico de la enfermedad. Esto nos permitiría analizar la

capacidad protectora de nuestra vacuna. Como se muestra en los resultados de parasitemia, no podemos decir que existan grandes diferencias entre los distintos grupos, tanto vacunados como controles. Este hecho es fácilmente explicable si tenemos en cuenta que en la infección utilizamos una cepa atenuada. En cualquier caso, sí parece que existe una tendencia a controlar antes la parasitemia en los ratones inoculados con el gen PAR2 aislado o fusionado a la HSP70, así como en los que fueron inoculados con PAR1 respecto a los grupos control.

Los análisis en fase crónica, tras elaborar un criterio de valoración de la inflamación, nos muestran a la PAR1 aislada como capaz de disminuir la respuesta inflamatoria crónica al menos en el órgano estudiado, en corazón. Esta disminución en inflamación es aún mayor cuando se inoculó el gen PAR1 fusionado a la HSP70. Sin duda los resultados más espectaculares se obtienen con el gen PAR2. El corazón de ratones infectados, que fueron inoculados con este gen, se presenta muy similar a un tejido cardíaco normal, apareciendo pequeños focos inflamatorios aislados. Aún más sorprendentes resultan los cortes histológicos de aquellos ratones que recibieron el gen PAR2-HSP70, en este caso el tejido cardíaco aparece prácticamente normal, tanto a nivel de aurículas como ventrículos. Estos resultados nos indicarían la capacidad protectora de esta vacuna genética que incluye el gen PAR2 y la HSP70. Actualmente se están realizando ensayos para determinar qué región de la HSP70 o regiones, son las responsables de sus capacidades como inmunomoduladora. Es importante recordar que se trata de una proteína altamente conservada, y para su uso como adyuvante natural sería interesante acotar al máximo la zona responsable de estas actividades. En cualquier caso, es evidente que su papel en la presentación de antígenos en clase I ha quedado demostrado con estos resultados.

5.-Búsqueda de análogos a PAR1 en otros trypanosomátidos.

Como se comentó en la introducción, las proteínas PARs se agrupan principalmente en dos familias, en base a sus homologías y a sus tamaños. Así en una primera familia encontramos las proteínas PAR3 de *T. cruzi*, PFRC de *T. brucei* y PFR3 de *L. mexicana* y en la otra se incluyen la proteína PAR2 de *T. cruzi*, PFRA de *T. brucei* y PFR2 de *L. mexicana*. Sin embargo la proteína PAR1

de *T. cruzi* así como la PAR4 son muy distintas al resto, en su secuencia aminoácídica, presentando homologías en torno al 14-16% con el resto. Dados los resultados obtenidos tras la inmunización con la proteína PAR1 en una vacuna genética, su capacidad para generar anticuerpos, respuesta celular, nos pareció interesante comprobar si realmente existían homólogos a esta en otros tripanosomátidos. De esta forma si fuese así, quizá podría plantearse el diseño de una vacuna multicomponente, o incluso el empleo de esta proteína con fines terapéuticos en otras enfermedades ocasionadas por otros tripanosomátidos. Como muestran los resultados de este apartado, a pesar de no haber sido descrita, existe un homólogo a PAR1 en *T. brucei*, algo a priori esperable pero que sin embargo no había sido corroborado. Esta secuencia obtenida mediante PCR, ha sido secuenciada y hemos podido comprobar que existe un alto grado de conservación entre la proteína de *T. cruzi* y de *T. brucei*, al igual que sucede con el resto de proteínas PARs descritas. A diferencia de la PAR1 de *T. cruzi* de la que existen 10 copias por genoma diploide, según hemos determinado, en el caso de PAR1 de *T. brucei* existirían sólo dos copias. Además el RNA mensajero de esta proteína tendría un tamaño aproximado de 3,6 kb frente a 6kb del mensajero de *T. cruzi*. En base a nuestros resultados en el caso de *brucei* no observamos diferencias en cuanto a la abundancia de este mensajero en las formas sanguíneas o procíclicas, por lo que no parece existir ningún tipo de regulación de esta proteína en los distintos estadios. Sin embargo en *T. cruzi* este mensajero es más abundante en formas epimastigotes que en tripomastigote aunque la proteína aparece en cantidades muy similares en ambas, proponiéndose una regulación a nivel de abundancia del mensajero.

En cuanto a su posible uso con fines terapéuticos o inmunoprolácticos, cabe destacar la presencia en esta proteína PAR1 de *T. brucei* de un péptido definido como citotóxico en el caso de *T. cruzi*, apareciendo totalmente conservado en *T. brucei*. La citotoxicidad de este péptido ha sido comprobada en infección experimental aunque (Wrightsmann 2002). Así mismo en la secuencia aminoácídica de esta nueva proteína también aparecen conservadas las regiones que hemos determinado como más antigénicas en PAR1, localizando un posible epítipo T así como dos epítopes B.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In the second section, the author outlines the various methods used to collect and analyze the data. This includes both primary and secondary data collection techniques. The analysis focuses on identifying trends and patterns over time, which is crucial for making informed decisions.

The third part of the report details the challenges encountered during the data collection process. These include issues related to data quality, such as missing values and inconsistencies. The author provides strategies to address these challenges, such as data cleaning and validation procedures.

Finally, the document concludes with a summary of the findings and recommendations. It highlights the key insights gained from the analysis and suggests areas for future research. The author stresses the need for continuous monitoring and evaluation to ensure the long-term success of the project.

Conclusiones



CONCLUSIONES:

- 1°.-Las proteínas paraflagelares PAR1 y PAR2 de *Trypanosoma. cruzi* son proteínas altamente antigénicas, detectándose altos niveles de anticuerpos de tipo IgG frente a ambas en pacientes en fase crónica de la enfermedad.
- 2°.-En el modelo murino de infección experimental también se observan anticuerpos tipo IgG (isotipo IgG2b) frente a ambas proteínas durante el curso de la infección especialmente una vez se ha superado la fase aguda de la enfermedad.
- 3°.-En infección natural se han localizado 5 epítopes B en la proteína PAR1 situados en la zona central de la proteína y en su extremo carboxilo, mientras que en el caso de PAR2 parece existir preferencialmente un reconocimiento conformacional de la proteína.
- 4°.-En infección experimental, y de forma similar a lo observado en infección natural, se identificaron diferentes epítopes B en la proteína PAR1 localizados en las regiones centrales y carboxilo, siendo preferencialmente conformacional el reconocimiento de la PAR2.
- 5°.-Las proteínas PAR1 y PAR2 resultaron altamente inmunogénicas cuando fueron administradas en forma de vacuna genética generando altos niveles de anticuerpos de isotipo IgG2a específicos de antígeno. Así mismo, estas proteínas tienen capacidad para inducir una respuesta linfoproliferativa en esplenocitos de ratones que han sido inoculados con DNA que codifica para dichas proteínas tanto aisladas como fusionadas a la HSP70. El mayor índice de estimulación se observa en células de ratones inmunizados con el vector conteniendo el gen PAR1 aislado.
- 6°.-Se han localizado 5 epítopes T en la secuencia de la proteína PAR1, situados en su extremo amino y región central y 3 en el caso de PAR2 localizados en la región central de la proteína.
- 7°.- En ratones transgénicos C57Bl/6-A2K^b la HSP70 de *T. cruzi* fusionada a las proteínas PAR1 ó PAR2 es capaz de generar como DNA vacuna linfocitos T citotóxicos frente a dichos antígenos. Este fenómeno no se observa cuando se inmuniza con los genes *Par1* y *Par2* de *T. cruzi* de forma aislada.
- 8°.- Se ha localizado un epítope A2 citotóxicos contenido en la proteína PAR2 (péptido 12807).
- 9°.- Las células EL-4/Jurkat transfectadas con los genes de fusión PAR1.HSP70 y PAR2.HSP70 son más eficientes en la presentación de péptidos A2 contenidos en los antígenos PARs a linfocitos T CD8+ citotóxicos, que las

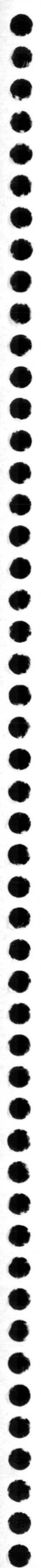
transfectadas con los genes aislados PAR1 y PAR2. Este hecho corrobora el ya descrito papel de la proteína HSP70 como vehículo de antígenos hacia la vía de procesamiento de clase I.

10°.-El vector vacuna conteniendo el gen codificante para la proteína PAR2 fusionado al gen codificante para la HSP70 de *Trypanosoma cruzi* induce protección frente a la infección por *T. cruzi*.

11°.-*T. brucei* posee una proteína homóloga a la PAR1 de *T. cruzi*, siendo la expresión de sus transcritos similar en las formas procíclica y sanguínea del parásito.



Bibliografía



BIBLIOGRAFIA

- Abrahamsohn, I. A., R. L. Coffman.** 1995. Cytokine nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* **155**: 3955-3963.
- Abrahamsohn, I. A., R. L. Coffman.** 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, IL-12 regulate innate acquired immunity to infection. *Exp Parasitol.* **84**:231-44.
- Adams, E., A. Basten, S. Rodda, W. J. Britton.** 1997. Human T-cell clones to the 70-kilodalton heat shock protein of *Mycobacterium leprae* define mycobacterium-specific epitopes rather than shared epitopes. *Infect Immun.* **65**:1061-70.
- Adams, E., W. J. Britton, A. Morgan, A. L. Goodsall, A. Basten.** 1993. Identification of human T cell epitopes in the *Mycobacterium leprae* heat shock protein 70-kD antigen. *Clin Exp Immunol.* **94**:500-6.
- Adema, G. J., F. Hartgers, R. Verstraten, E. de Vries, G. Marland, S. Menon, J. Foster, Y. Xu, P. Nooyen, T. McClanahan, K. B. Bacon, C. G. Figdor.** 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature.* **387**:713-7.
- Affranchino, J. L., C. F. Ibanez, A. O. Luquetti, A. Rassi, M. B. Reyes, R. A. Macina, L. Aslund, U. Pettersson, A. C. Frasch.** 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* **34**:221-8.
- Akbari, O., N. Panjwani, S. Garcia, R. Tascon, D. Lowrie, B. Stockinger.** 1999. DNA vaccination: transfection activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med.* **189**:169-78.
- Aliberti, J. C., F. S. Machado, J. T. Souto, A. P. Campanelli, M. M. Teixeira, R. T. Gazzinelli, J. S. Silva.** 1999. beta-Chemokines enhance parasite uptake promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **67**:4819-26.
- Aliberti, J. C., F. S. Machado, R. T. Gazzinelli, M. M. Teixeira, J. S. Silva.** 1999. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages mediates resistance to parasite infection in mice. *Infect Immun.* **67**:2810-4.
- Aliberti, J. C., M. A. Cardoso, G. A. Martins, R. T. Gazzinelli, L. Q. Vieira, J. S. Silva.** 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* **64**:1961-7.
- Allen, T. M., T. U. Vogel, D. H. Fuller, B. R. Mothe, S. Steffen, J. E. Boyson, T. Shipley, J. Fuller, T. Hanke, A. Sette, J. D. Altman, B. Moss, A. J. McMichael, D. I. Watkins.** 2000. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol.* **164**:4968-78.
- Alves M. J., G. Abuin, M. F. Goncalves, V. Y. Kuwajima, W. Colli.** 1987. Molecular strategies of Parasitic Invasion, **42**: 323-332.
- Andrade Z. A.** 1984. The canine model of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **79**: 77-83.
- Andrade, V., M. Barral-Netto, S. G. Andrade.** 1985. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Braz J Med Biol Res.* **18**:499-506.
- Andrade, Z. A.** 1999. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **94**:71-80.
- Andrade, Z. A., S. G. Andrade, M. Sadigursky, R. J. Wenthold, Jr., S. L. Hilbert, V. J. Ferrans.** 1997. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg.* **57**:328-36.
- Andrews, N. W. Colli, W.** 1982. Adhesion interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* **29**: 264-269.
- Anselmi, A., F. Pifano, J. A. Suarez, O. Gurdziel.** 1966. Myocardiopathy in Chagas' disease. I. Comparative study of pathologic findings in chronic human experimental Chagas' myocarditis. *Am Heart J.* **72**:469-81.
- Araujo, F. G.** 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. *Infect Immun.* **57**:2246-8.

- Arnold-Schild, D., D. Hanau, D. Spehner, C. Schmid, H. G. Rammensee, H. de la Salle, H. Schild.** 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **162**: 3757-3760.
- Asea, A., S. K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones, M. A. Stevenson, L. B. Chen, R. W. Finberg, G. C. Koo, S. K. Calderwood.** 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone cytokine. *Nat. Med.* **6**: 435-442.
- Baldwin, S. L., C. D. D'Souza, I. M. Orme, M. A. Liu, K. Huygen, O. Denis, A. Tang, L. Zhu, D. Montgomery, J. B. Ulmer.** 1999. Immunogenicity protective efficacy of DNA vaccines encoding secreted non-secreted forms of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A. *Tuber Lung Dis.* **79**:251-9.
- Banchereau, J., R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells the control of immunity. *Nature.* **392**:245-52.
- Barr, S. C.** 1993. Anti-heart tissue antibodies during experimental infections with pathogenic non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* isolates in dogs. *Int J Parasitol.* **23**:961-7.
- Barrios, C., A. R. Lussow, J. Van Embden, R. Van der Zee, R. Rappuoli, P. Costantino, J. A. Louis, P. H. Lambert, G. Del Giudice.** 1992. Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: The use of the 70-kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants Bacillus Calmette Guerin priming. *Eur J Immunol.* **22**:1365-72.
- Barrios, C., C. Georgopoulos, P. H. Lambert, G. Del Giudice.** 1994. Heat shock proteins as carrier molecules: in vivo helper effect mediated by *Escherichia coli* GroEL DnaK proteins requires cross-linking with antigen. *Clin Exp Immunol.* **98**:229-33.
- Bastin P, Sherwin T, Gull K.** 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature.* Feb 5;391(6667):548.
- Bastin P, MacRae TH, Francis SB, Matthews KR, Gull K.** 1999. Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol Cell Biol.* Dec;19(12):8191-200.
- Basu S, Srivastava PK.** 2000 Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress Chaperones.* Nov;5(5):443-51. Revisión
- Beltz, L. A., M. B. Szein, F. Kierszenbaum.** 1988. Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 receptor expression. *J Immunol.* **141**:289-94.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller, W.R. Heath.** 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**: 478-480.
- Berberich C., J. M. Requena, C. Alonso.** 1997. Cloning of gen expression antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp. Parasitol.* **85**: 105-108.
- Binder, R. J., D. K. Han, P. K. Srivastava.** 2000. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol.* **1**:151-155.
- Binder RJ, Anderson KM, Basu S, Srivastava PK.** 2000 Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J Immunol.* Dec 1;165(11):6029-35.
- Bird, A. P.** 1986. CpG-rich islands the function of DNA methylation. *Nature.* **321**:209-13.
- Blachere, N. E., Z. Li, R. Y. Chandawarkar, R. Suto, N. S. Jaikaria, S. Basu, H. Udono, P. K. Srivastava.** 1997. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response tumor immunity. *J Exp Med.* **186**:1315-22.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff.** 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today.* **15**:22-8.
- Bohle, B., B. Jahn-Schmid, D. Maurer, D. Kraft, C. Ebner.** 1999. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 IFN-gamma production in cells from allergic individuals inhibit IgE synthesis in vitro. *Eur J Immunol.* **29**:2344-53.
- Bohm, W., R. Schirmbeck, A. Elbe, K. Melber, D. Diminky, G. Kraal, N. van Rooijen, Y. Barenholz, J. Reimann.** 1995. Exogenous hepatitis B surface antigen particles processed by dendritic cells or

- macrophages prime murine MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Immunol.* **155**:3313-21.
- Born, W., L. Hall, A. Dallas, J. Boymel, T. Shinnick, D. Young, P. Brennan, R. O'Brien.** 1990. Recognition of a peptide antigen by heat shock--reactive gamma delta T lymphocytes. *Science.* **249**:67-9.
- Borrow, P., D. F. Tough, D. Eto, A. Tishon, I. S. Grewal, J. Sprent, R. A. Flavell, M. B. Oldstone.** 1998. CD40 ligand-mediated interactions are involved in the generation of memory CD8(+) cytotoxic T lymphocytes (CTL) but are not required for the maintenance of CTL memory following virus infection. *J Virol.* **72**:7440-9.
- Bot, A.** 2000. DNA vaccination the immune responsiveness of neonates. *Int Rev Immunol.* **19**:221-45.
- Bot, A., S. Antohi, S. Bot, A. Garcia-Sastre, C. Bona.** 1997. Induction of humoral cellular immunity against influenza virus by immunization of newborn mice with a plasmid bearing a hemagglutinin gene. *Int Immunol.* **9**:1641-50.
- Bourquin, C., A. Iglesias, T. Berger, H. Wekerle, C. Linington.** 2000. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-DNA vaccination induces antibody-mediated autoaggression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* **30**:3663-71.
- Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, J. G. Gribben, L. M. Nadler.** 1996. The role of B7-1/B7-2:CD28/CLTA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity down-regulation of the immune response. *Immunol Rev.* **153**:5-26.
- Boyer, J. D., K. E. Ugen, B. Wang, M. Agadjanyan, L. Gilbert, M. L. Bagarazzi, M. Chattergoon, P. Frost, A. Javadian, W. V. Williams, Y. Refaeli, R. B. Ciccarelli, D. McCallus, L. Coney, D. B. Weiner.** 1997. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med.* **3**:526-32.
- Boyle, J. S., A. Silva, J. L. Brady, A. M. Lew.** 1997. DNA immunization: induction of higher avidity antibody effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:14626-31.
- Bradley, L. M., D. K. Dalton, M. Croft.** 1996. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol.* **157**:1350-8.
- Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hegde, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich, P. B. Sigler.** 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature.* **371**:578-86.
- Braga MS, Lauria-Pires L, Arganaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira AR.** 2000. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* May-Jun;42(3):157-61.
- Brener, Z.** 1981. "Chagas' disease" en Modern genetic concepts techniques in the study of parasites. Ed Michal, pp345-363. Shwabe Basel.
- Brener, Z.** 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* **27**:347-82.
- Bridge, M. A., Q. Zhou, B. F. Koop, T. W. Pearson.** 1998. Cloning characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 gene locus of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **91**:359-63.
- Brinkmann, V., T. Geiger, S. Alkan, C. H. Heusser.** 1993. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med.* **178**:1655-63.
- Brockner, T., M. Riedinger, K. Karjalainen.** 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med.* **185**:541-50.
- Brodskyn, C. I., A. M. Silva, H. A. Takehara, I. Mota.** 1989. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Cell Biol.* **67**:343-8.
- Bullock W. O., Fernandez, J. M. Short, J. M.** 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming RecA *E. coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* **5** (4): 376-379-
- Burleigh, B. A., N. W. Andrews.** 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol.* **49**:175-200.
- Cardillo, F., J. C. Voltarelli, S. G. Reed, J. S. Silva.** 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun.* **64**:128-34.

- Castanos-Velez, E., S. Maerlan, L. M. Osorio, F. Aberg, P. Biberfeld, A. Orn, M. E. Rottenberg.** 1998. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect Immun.* **66**:2960-8.
- Castellino, F., P. E. Boucher, K. Eichelberg, M. Mayhew, J. E. Rothman, A. N. Houghton, R. N. Germain.** 2000. Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med.* **191**:1957-64.
- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, M. Azuma, K. Okumura, L. L. Lanier, J. Banchereau.** 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med.* **180**:1841-7.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, G. Alber.** 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* **184**:747-52.
- Chapman, B. S., R. M. Thayer, K. A. Vincent, N. L. Haigwood.** 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19**:3979-86.
- Chen, C. H., T. L. Wang, C. F. Hung, Y. Yang, R. A. Young, D. M. Pardoll, T. C. Wu.** 2000. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Res.* **60**:1035-42.
- Chen, W., U. Syldath, K. Bellman, V. Burkat, H. Kolb.** 1999. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol.* **162**: 3212-3219.
- Chen, Y., T. Takimoto, L. Liu, S. Surman, D. L. Woodland.** 1999. DNA vaccination as a tool to identify subdominant CD8 T cell epitopes. *Vaccine.* **18**:720-7.
- Cho, B. K., D. Palliser, E. Guillen, J. Wisniewski, R. A. Young, J. Chen, H. N. Eisen.** 2000. A proposed mechanism for the induction of cytotoxic T lymphocyte production by heat shock fusion proteins. *Immunity.* **12**:263-72.
- Chopp, M.** 1993. The roles of heat shock proteins immediate early genes in central nervous system normal function pathology. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* **6**:6-10.
- Chow, Y. H., B. L. Chiang, Y. L. Lee, W. K. Chi, W. C. Lin, Y. T. Chen, M. H. Tao.** 1998. Development of Th1 Th2 populations the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J Immunol.* **160**:1320-9.
- Chu, R. S., O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann, C. V. Harding.** 1997. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med.* **186**:1623-31.
- Condon, C., S. C. Watkins, C. M. Celluzzi, K. Thompson, L. D. Falo, Jr.** 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med.* **2**:1122-8.
- Corr, M., D. J. Lee, D. A. Carson, H. Tighe.** 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med.* **184**:1555-60.
- Cowdery, J. S., J. H. Chace, A. K. Yi, A. M. Krieg.** 1996. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol.* **156**:4570-5.
- Cox, G. J., T. J. Zamb, L. A. Babiuk.** 1993. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice cattle injected with plasmid DNA. *J Virol.* **67**:5664-7.
- Craig, E. A., B. D. Gambill, R. J. Nelson.** 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev.* **57**:402-14.
- Cunha-Neto, E., R. Moliterno, V. Coelho, L. Guilherme, E. Bocchi, M. Higuchi, N. Stolf, F. Pileggi, L. Steinman, J. Kalil.** 1994. Restricted heterogeneity of T cell receptor variable alpha chain transcripts in hearts of Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Parasite Immunol.* **16**:171-9.
- Cunha-Neto, E., V. Coelho, L. Guilherme, A. Fiorelli, N. Stolf, J. Kalil.** 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest.* **98**:1709-12.
- Cyr, D. M., W. Neupert.** 1996. Roles for hsp70 in protein translocation across membranes of organelles. *Exs.* **77**:25-40.

- D'Andrea, A., M. Rengaraju, N. M. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Aste, S. H. Chan, M. Kobayashi, D. Young, E. Nickbarg, R. Chizzonite, S. F. Wolf, G. Trinchieri. 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* **176**:1387-98.
- Daniels, D. L., Schroederm, J. L., Szybalski, W., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F., Petersen, G. B. Blattner, F. R. 1983. Appendix II: Complete annotated lambda sequence of lambda-II. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. Eds. Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, R. F. W. Weisberg, R. A.
- Davenport, M. P., K. R. McKenzie, A. Basten, W. J. Britton. 1992. The variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70-kilodalton heat shock protein is the target for humoral immune responses. *Infect Immun.* **60**:1170-7.
- Davidoff, A. M., J. D. Iglehart, J. R. Marks. 1992. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:3439-42.
- Davis, H. L., M. J. McCluskie, J. L. Gerin, R. H. Purcell. 1996. DNA vaccine for hepatitis B: evidence for immunogenicity in chimpanzees comparison with other vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:7213-8.
- Davis, H. L., M. Mancini, M. L. Michel, R. G. Whalen. 1996. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response effect of boost. *Vaccine.* **14**:910-5.
- de Andrade, A. L., F. Zicker, R. M. de Oliveira, S. Almeida Silva, A. Luquetti, L. R. Travassos, I. C. Almeida, S. S. de Andrade, J. G. de Andrade, C. M. Martelli. 1996. Randomised trial of efficacy of benzimidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* **348**:1407-13.
- de Diego, J., C. Punzon, M. Duarte, M. Fresno. 1997. Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. *J Immunol.* **159**:4983-9.
- Degrave WM, Melville S, Ivens A, Aslett M. 2001 Parasite genome initiatives. *Int J Parasitol.* May 1;31(5-6):532-6. Review.
PMID: 11334938 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- de Lana, M., E. Chiari, W. L. Tafuri. 1992. Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **87**:59-71.
- Demangel, C., A. Bean, E. Martin, C. Feng, A. Kamath, W. Britton. 1999. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin-infected dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**: 1972-1979.
- Ding, L., P. S. Linsley, L. Y. Huang, R. N. Germain, E. M. Shevach. 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol.* **151**:1224-34.
- Doe, B., M. Selby, S. Barnett, J. Baenziger, C. M. Walker. 1996. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:8578-83.
- Donnelly, J. J., A. Friedman, D. Martinez, D. L. Montgomery, J. W. Shiver, S. L. Motzel, J. B. Ulmer, M. A. Liu. 1995. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat Med.* **1**:583-7.
- Donnelly, J. J., J. B. Ulmer, M. A. Liu. 1995. Protective efficacy of intramuscular immunization with naked DNA. *Ann N Y Acad Sci.* **772**:40-6.
- Donnelly, J. J., J. B. Ulmer, J. W. Shiver, M. A. Liu. 1997. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol.* **15**:617-48.
- DosReis, G. A. 1997. Cell-mediated Immunity in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Parasitol. Today.* **13**:335-342.
- Dow S. W., L. G. Frandkin, D. H. Liggitt, A. P. Willson, T. D. Heath, T. A. Potter. 1999. Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses antitumor activity when administered intravenously. *J. Immunol.* **163**: 1552-1561.
- Drazen, J. M., J. P. Arm, K. F. Austen. 1996. Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med.* **183**:1-5.
- Elkins, K. L., T. R. Rhinehart-Jones, S. Stibitz, J. S. Conover, D. M. Klinman. 1999. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol.* **162**:2291-8.

- Elloso, M. M., P. Scott.** 1999. Expression contribution of B7-1 (CD80) B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J Immunol.* **162**:6708-15.
- Elsaghier, A., R. Lathigra, J. Ivanyi.** 1992. Localisation of linear epitopes at the carboxy-terminal end of the mycobacterial 71 kDa heat shock protein. *Mol Immunol.* **29**:1153-6.
- Estes, D. M., P. S. Turaga, K. M. Sievers, J. M. Teale.** 1993. Characterization of an unusual cell type (CD4+ CD3-) expanded by helminth infection related to the parasite stress response. *J Immunol.* **150**:1846-56.
- Facer, C. A.** 1980. Direct antiglobulin reactions in Gambian children with *P. falciparum* malaria. III. Expression of IgG subclass determinants genetic markers association with anaemia. *Clin Exp Immunol.* **41**:81-90.
- Falasca A., D. Grana, J. Buccolo, M. Gili, A. Merlo, J. Zoppi, E. Mareso.** 1986. Susceptibility of the *Cebus apella* monkey to different strains of *Trypanosoma cruzi* after single or repeated inoculations. *Pan American Health Organization Bulletin* **20**: 117-137.
- Fischer, H. G., R. Dorfler, B. Schade, U. Hadding.** 1999. Differential CD86/B7-2 expression cytokine secretion induced by *Toxoplasma gondii* in macrophages from resistant or susceptible BALB H-2 congenic mice. *Int Immunol.* **11**:341-9.
- Fitch, F. W., M. D. McKisic, D. W. Lancki, T. F. Gajewski.** 1993. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol.* **11**:29-48.
- Flo, J., S. Tisminetzky, F. Baralle.** 2000. Modulation of the immune response to DNA vaccine by co-delivery of costimulatory molecules. *Immunology.* **100**:259-67.
- Fomsgaard, A.** 2000. [Do we owe something?]. *Ugeskr Laeger.* **162**:3876-7.
- Fomsgaard, A., H. V. Nielsen, N. Kirkby, K. Bryder, S. Corbet, C. Nielsen, J. Hinkula, S. Buus.** 1999. Induction of cytotoxic T-cell responses by gene gun DNA vaccination with minigenes encoding influenza A virus HA NP CTL-epitopes. *Vaccine.* **18**:681-91.
- Forster, I., I. Lieberam.** 1996. Peripheral tolerance of CD4 T cells following local activation in adolescent mice. *Eur J Immunol.* **26**:3194-202.
- Fouts, D. L., B. J. Ruef, P. T. Ridley, R. A. Wrightsman, D. S. Peterson, J. E. Manning.** 1991. Nucleotide sequence transcription of a trypanostigote surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **46**:189-200.
- Fralish BH, Tarleton RL.** 2003. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine.* Jun 20;21(21-22):3070-80.
- Freund, J., J. Casals, E. P. Hosmer.** 1937. Sensitization antibody formation after injection of tubercle bacilli paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **37**: 509-513.
- Frosch, S., D. Kuntzlin, B. Fleischer.** 1997. Infection with *Trypanosoma cruzi* selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages enhances their costimulatory activity. *Infect Immun.* **65**:971-7.
- Fuchs, C., Rosenvold, E. C., Honigman, A. and Szybalski, W.** 1978. A simple method for identifying the palindromic sequences recognized by restriction endonucleases: the nucleotide sequence of the Ava II site. *Gene,* 4:1-23.
- Fuertes, M. A., C. Berberich, R. M. Lozano, G. Gimenez-Gallego, C. Alonso.** 1999. Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP11) from *Leishmania infantum*. *Eur. J. Biochem.* **260**: 559-567.
- Fuertes, M. A., J. M. Perez, M. Soto, M. C. Lopez, C. Alonso.** 2001. Calcium-induced conformational changes in *Leishmania infantum* kinetoplastid membrane protein-11. *J Biol Inorg Chem.* **6**:107-17.
- Fuller, D. H., J. R. Haynes.** 1994. A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **10**:1433-41.
- Fynan, E. F., H. L. Robinson, R. G. Webster.** 1993. Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA Cell Biol.* **12**:785-9.
- Fynan, E. F., R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro, H. L. Robinson.** 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:11478-82.

- Gately, M. K., R. R. Warriar, S. Honasoge, D. M. Carvajal, D. A. Faherty, S. E. Connaughton, T. D. Anderson, U. Sarmiento, B. R. Hubbard, M. Murphy. 1994. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity induces production of IFN-gamma in vivo. *Int Immunol.* **6**:157-67.
- Gaunt, M.W., 2003 *Nature*, Vol 421,936-939
- Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, S. L. James, A. Sher. 1992. IL-10 inhibits parasite killing nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* **148**:1792-6.
- Gazzinelli, R. T., V. M. Leme, J. R. Cancado, G. Gazzinelli, J. Scharfstein. 1990. Identification partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells immune sera from patients with Chagas' disease. *Infect Immun.* **58**:1437-44.
- Geissler, E. K., J. Wang, J. H. Fechner, Jr., W. J. Burlingham, S. J. Knechtle. 1994. Immunity to MHC class I antigen after direct DNA transfer into skeletal muscle. *J Immunol.* **152**:413-21.
- Geissler, M., A. Gesien, J. R. Wands. 1997. Inhibitory effects of chronic ethanol consumption on cellular immune responses to hepatitis C virus core protein are reversed by genetic immunizations augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol.* **159**:5107-13.
- Geissler, M., A. Gesien, K. Tokushige, J. R. Wands. 1997. Enhancement of cellular humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol.* **158**:1231-7.
- Geissler, M., K. Tokushige, C. C. Chante, V. R. Zurawski, Jr., J. R. Wands. 1997. Cellular humoral immune response to hepatitis B virus structural proteins in mice after DNA-based immunization. *Gastroenterology.* **112**:1307-20.
- Gilkeson, G. S., A. J. Pritchard, D. S. Pisetsky. 1991. Specificity of anti-DNA antibodies induced in normal mice by immunization with bacterial DNA. *Clin Immunol Immunopathol.* **59**:288-300.
- Gilkeson, G. S., A. M. Pippen, D. S. Pisetsky. 1995. Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest.* **95**:1398-402.
- Gilkeson, G. S., P. Ruiz, A. M. Pippen, A. L. Alexander, J. B. Lefkowitz, D. S. Pisetsky. 1996. Modulation of renal disease in autoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Exp Med.* **183**:1389-97.
- Gilkeson, G. S., R. Spurney, T. M. Coffman, R. Kurlander, P. Ruiz, D. S. Pisetsky. 1992. Effect of anti-CD4 antibody treatment on inflammatory arthritis in MRL-lpr/lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol.* **64**:166-72.
- Giordano, R., D. L. Fouts, D. Tewari, W. Colli, J. E. Manning, M. J. Alves. 1999. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem.* **274**:3461-8.
- Girones N, Fresno M. . 2003 Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*Jan;19(1):19-22.
- Gomes, N. A., J. O. Previato, B. Zingales, L. Mendonca-Previato, G. A. DosReis. 1996. Down-regulation of T lymphocyte activation in vitro in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* . Assignment of the T cell-suppressive determinant to the ceramide domain. *J Immunol.* **156**:628-35.
- Greenfield, E. A., K. A. Nguyen, V. K. Kuchroo. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol.* **18**:389-418.
- Grewal, I. S., R. A. Flavell. 1998. CD40 CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* **16**:111-35.
- Halpern, M. D., R. J. Kurlander, D. S. Pisetsky. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol.* **167**:72-8.
- Harel-Bellan, A., M. Joskowicz, D. Fradelizi, H. Eisen. 1985. T lymphocyte function during experimental Chagas disease: production of response to interleukin 2. *Eur. J. Immunol.* **15**: 438-442.
- Harrer, T., E. Harrer, S. A. Kalams, P. Barbosa, A. Trocha, R. P. Johnson, T. Elbeik, M. B. Feinberg, S. P. Buchbinder, B. D. Walker. 1996. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth specificity of the response relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection low viral load. *J Immunol.* **156**: 2616-2623.

- Hartmann, G., G. J. Weiner, A. M. Krieg.** 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:9305-10.
- Hathcock, K. S., G. Laszlo, C. Pucillo, P. Linsley, R. J. Hodes.** 1994. Comparative analysis of B7-1 B7-2 costimulatory ligands: expression function. *J Exp Med.* **180**:631-40.
- Hausler T, Clayton C.** 1996 Post-transcriptional control of hsp70 mRNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* Feb-Mar;76(1-2):57-71.
- Havlr, D. V., R. S. Wallis, W. H. Boom, T. M. Daniel, K. Chervenak, J. J. Ellner.** 1991. Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect Immun.* **59**:665-70.
- Heath, W. R. Carbone, F. R.** 1999. Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 314-318.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira.** 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* **408**:740-5.
- Henderson, R., S. Watkins, J. Flynn.** 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **159**: 635-643.
- Ho, A. S., Y. Liu, T. A. Khan, D. H. Hsu, J. F. Bazan, K. W. Moore.** 1993. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:11267-71.
- Hoffman, S. L., D. L. Doolan, M. Sedegah, R. Gramzinski, H. Wang, K. Gowda, P. Hobart, M. Margalith, J. Norman, R. C. Hedstrom.** 1995. Nucleic acid malaria vaccines. Current status potential. *Ann N Y Acad Sci.* **772**:88-94.
- Holscher, C., G. Kohler, U. Muller, H. Mossmann, G. A. Schaub, F. Brombacher.** 1998. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi* -infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun.* **66**:1208-15.
- Houghten, R. A.** 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:5131-5.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra, K. M. Murphy.** 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* **260**:547-9.
- Hsu, C. H., K. Y. Chua, M. H. Tao, Y. L. Lai, H. D. Wu, S. K. Huang, K. H. Hsieh.** 1996. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med.* **2**:540-4.
- Huang, A. Y., A. T. Bruce, D. M. Pardoll, H. I. Levitsky.** 1996. In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity.* **4**:349-55.
- Huang, A. Y., P. Golumbek, M. Ahmadzadeh, E. Jaffee, D. Pardoll, H. Levitsky.** 1994. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science.* **264**:961-5.
- Huang, Q., J. F. Richmond, K. Suzue, H. N. Eisen, R. A. Young.** 2000. In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain is CD4(+) T cell independent. *J Exp Med.* **191**:403-8.
- Hunter, C. A., T. Slifer, F. Araujo.** 1996. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha gamma interferon. *Infect Immun.* **64**:2381-6.
- Huygen, K., J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, R. R. Deck, C. M. DeWitt, I. M. Orme, S. Baldwin, C. D'Souza, A. Drowart, E. Lozes, P. Vandebussche, J. P. Van Vooren, M. A. Liu, J. B. Ulmer.** 1996. Immunogenicity protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med.* **2**:893-8.
- Ichino, M., G. Mor, J. Conover, W. R. Weiss, M. Takeno, K. J. Ishii, D. M. Klinman.** 1999. Factors associated with the development of neonatal tolerance after the administration of a plasmid DNA vaccine. *J Immunol.* **162**:3814-8.
- Imani, F., M. J. Soloski.** 1991. Heat shock proteins can regulate expression of the Tla region-encoded class Ib molecule Qa-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:10475-9.
- Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, R. M. Steinman.** 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus Calmette-Guerin* organisms, sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* **178**: 479-488.

- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, R. M. Steinman.** 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* **176**:1693-702.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K. S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P. S. Linsley, S. Ikehara, S. Muramatsu, R. J. Hodes, R. M. Steinman.** 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med.* **180**:1849-60.
- Ito K, Ito K, Shinohara N, Kato S.** 2003. DNA immunization via intramuscular and intradermal routes using a gene gun provides different magnitudes and durations on immune response. *Mol Immunol.* 2003 May;39(14):847-54.
- Jacobi, H. H., Y. Liang, P. K. Tingsgaard, P. L. Larsen, L. K. Poulsen, P. S. Skov, M. Haak-Frendscho, A. L. Niles, O. Johansson.** 1998. Dendritic mast cells in the human nasal mucosa. *Lab Invest.* **78**:1179-84.
- Jardim, A., S. Hanson, B. Ullman, W. D. McCubbin, C. M. Kay, R. W. Olafson.** 1995. Cloning structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Biochem J.* **305**:315-20.
- Jardim, E., O. M. Takayanagui.** 1994. Chagasic meningoencephalitis with detection of *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid of an immunodepressed patient. *J Trop Med Hyg.* **97**:367-70.
- Jenkins, M. K., R. H. Schwartz.** 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro in vivo. *J Exp Med.* **165**:302-19.
- Jensen F. C., J. R. Savary, J. P. Diveley, J. C. Chang.** 1998. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev.* **32**(3):173-186.
- Jensen, A. T., S. Gasim, A. Ismail, A. Gaafar, J. A. Kurtzhals, M. Kemp, A. M. El Hassan, A. Kharazmi, T. G. Theander.** 1998. Humoral cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Scand J Immunol.* **48**:103-9.
- Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, M. C. Nussenzweig.** 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* **375**:151-5.
- Jiao, S., P. Williams, R. K. Berg, B. A. Hodgeman, L. Liu, G. Repetto, J. A. Wolff.** 1992. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum Gene Ther.* **3**:21-33.
- Jones, E. M., D. G. Colley, S. Tostes, E. R. Lopes, C. L. Vnencak-Jones, T. L. McCurley.** 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* **48**:348-57.
- Justewicz, D. M., M. J. Morin, H. L. Robinson, R. G. Webster.** 1995. Antibody-forming cell response to virus challenge in mice immunized with DNA encoding the influenza virus hemagglutinin. *J Virol.* **69**:7712-7.
- Kalams, S. A., S. P. Buchbinder, E. S. Rosenberg, J. M. Billingsley, D. S. Colbert, N. G. Jones, A. K. Shea, A. K. Trocha, B. D. Walker.** 1999. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **73**:6715-6720.
- Kalil, J. Cunha-Neto, E.** 1996. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last?. *Parasitol. Today* **12**: 396-399.
- Kandimalla ER, Bhagat L, Cong YP, Pandey RK, Yu D, Zhao Q, Agrawal S.** 2003. Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 11;306(4):948-53.
- Kataoka, T., S. Yamamoto, T. Yamamoto, E. Kuramoto, Y. Kimura, O. Yano, T. Tokunaga.** 1992. Antitumor activity of synthetic oligonucleotides with sequences from cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res.* **83**:244-7.
- Katsumi, A., N. Emi, A. Abe, Y. Hasegawa, M. Ito, H. Saito.** 1994. Humoral cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. *Hum Gene Ther.* **5**:1335-9.
- Kaye, P. M., N. J. Rogers, A. J. Curry, J. C. Scott.** 1994. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol.* **24**:2850-4.
- Kierszenbaum, F.** 1985. Is there autoimmunity in Chagas disease?. *Parasitol. Today* **1**: 4-6.

- Kierszenbaum, F., H. M. Lopez, M. B. Szein.** 1994. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* -specific immune responses by a protein produced by *T. cruzi* in the course of Chagas' disease. *Immunology*. **81**:462-7.
- Kierszenbaum, F., H. M. Lopez, M. B. Szein.** 1996. *Trypanosoma cruzi* downregulates the production of interleukin-2, interferon-gamma, interleukin-4 interleukin-5 by activated human lymphocytes. *J Parasitol*. **82**:652-6.
- Kierszenbaum, F., J. L. de Diego, M. Fresno, M. B. Szein.** 1999. Inhibitory effects of the *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 on the expression of IL-2 receptor chains secretion of cytokines by subpopulations of activated human T lymphocytes. *Eur J Immunol*. **29**:1684-91.
- Kierszenbaum, F., M. B. Szein, L. A. Beltz.** 1989. Decreased human IL-2 receptor expression due to a protozoan pathogen. *Immunol Today*. **10**:129-31.
- Kierszenbaum, F., W. R. Cuna, L. A. Beltz, M. B. Szein.** 1989. *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 p70 receptor components. *J Immunol*. **143**:275-9.
- Kim, J. J., M. L. Bagarazzi, N. Trivedi, Y. Hu, K. Kazahaya, D. M. Wilson, R. Ciccarelli, M. A. Chattergoon, K. Dang, S. Mahalingam, A. A. Chalian, M. G. Agadjanyan, J. D. Boyer, B. Wang, D. B. Weiner.** 1997. Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat Biotechnol*. **15**:641-6.
- King, C. A., M. B. Spellerberg, D. Zhu, J. Rice, S. S. Sahota, A. R. Thompsett, T. J. Hamblin, J. Radl, F. K. Stevenson.** 1998. DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma myeloma. *Nat Med*. **4**:1281-6.
- Kitajima, T., K. Ariizumi, P. R. Bergstresser, A. Takashima.** 1996. A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J Clin Invest*. **98**:142-7.
- Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, A. M. Krieg.** 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**:2879-83.
- Klinman, D. M., G. Yamshchikov, Y. Ishigatsubo.** 1997. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol*. **158**:3635-9.
- Knoll, A. H.** 1992. The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science*. **256**:622-7.
- Kol, A., A. H. Lichtman, R. W. Finberg, P. Libby, E. A. Kurt-Jones.** 2000. Cutting edge: heat-shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol*. **164**: 13-17.
- Konecny, P., A. Stagg, H. Jebbari, N. English, R. Davidson, S. Knight.** 1999. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur. J. Immunol*. **29**: 1803-1811.
- Kovacsovics-Bankowski, M., K. L. Rock.** 1994. Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I II presentation regulation by cytokines. *Eur J Immunol*. **24**:2421-8.
- Kovacsovics-Bankowski, M., K. L. Rock.** 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*. **267**:243-6.
- Krausa, P., M. Brywka, D. Savage, K. M. Hui, M. Bunce, J. L. Ngai, D. L. Teo, Y. W. Ong, D. Barouch, C. E. Allsop, A. Hill, A. J. McMichael, J. C. Bodmer, M. J. Browning.** 1995. Genetic polymorphism within HLA-A*02: significant allelic variation revealed in different populations. *Tissue Antigens*. **45**:223-31.
- Krieg, A. M.** 2000. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. **12**:35-43.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, J. Schorr, H. L. Davis.** 1998. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol*. **6**:23-7.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, D. M. Klinman.** 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. **374**:546-9.
- Krieg, A. M., L. Love-Homan, A. K. Yi, J. T. Harty.** 1998. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol*. **161**:2428-34.

- Krieg, A. M., T. Wu, R. Weeratna, S. M. Efler, L. Love-Homan, L. Yang, A. K. Yi, D. Short, H. L. Davis.** 1998. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:12631-6.
- Kumar, S., R. L. Tarleton.** 1998. The relative contribution of antibody production CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **20**:207-16.
- Kumar, S., R. L. Talerton.** 2001. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* **166**: 4596-4603.
- Kurts, C., H. Kosaka, F. R. Carbone, J. F. Miller, W. R. Heath.** 1997. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med.* **186**:239-45.
- Kurts, C., W. R. Heath, F. R. Carbone, J. Allison, J. F. Miller, H. Kosaka.** 1996. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med.* **184**:923-30.
- La Flamme, A. C., S. J. Kahn, A. Y. Rudensky, W. C. Van Voorhis.** 1997. *Trypanosoma cruzi* -infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Eur J Immunol.* **27**:3085-94.
- Lafferty, K. J., A. J. Cunningham.** 1975. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci.* **53**:27-42.
- Lai, W. C., S. P. Pakes, K. Ren, Y. S. Lu, M. Bennett.** 1997. Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. *J Immunol.* **158**:2513-6.
- Lake, J. A., V. F. de la Cruz, C. G. Ferreira, C. Morel, L. Simpson.** 1991. Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:2612.
- Lamb, J. R., B. J. Skidmore, N. Green, J. M. Chiller, M. Feldmann.** 1983. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med.* **157**:1434-47.
- Lamml, U. K.** 1975. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **277**: 980-985.
- Lane JE, Ribeiro-Rodrigues R, Olivares-Villagomez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, Carter CE.** 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA within murine cardiac tissue sections by in situ polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Apr;98(3):373-6. Epub 2003 Jul 18.
- Laranja, F. S., Z. A. Andrade.** 1980. [Chronic cardiac form of chagas disease in dogs]. *Arq Bras Cardiol.* **35**:377-80.
- Leitner WW, Thalhamer J.** 2003 DNA vaccines for non-infectious diseases: new treatments for tumour and allergy. *Expert Opin Biol Ther.* Jul;3(4):627-38.
- Lew AM, Brady BJ, Boyle BJ.** 2000. Site-directed immune responses in DNA vaccines encoding ligand-antigen fusions. *Vaccine.* Feb 25;18(16):1681-5
- Lima, E. C., I. Garcia, M. H. Vicentelli, P. Vassalli, P. Minoprio.** 1997. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* **65**:457-65.
- Lima, J. A., A. Szarfman, S. D. Lima, R. J. Adams, R. J. Russell, A. Cheever, T. Trischmann, J. L. Weiss.** 1986. Absence of left ventricular dysfunction during acute chagasic myocarditis in the rhesus monkey. *Circulation.* **73**:172-9.
- Lindquist, S.** 1992. Heat-shock proteins stress tolerance in microorganisms. *Curr Opin Genet Dev.* **2**:748-55.
- Lipford, G. B., K. Heeg, H. Wagner.** 1998. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* **6**: 496-500.
- Lipford, G. B., M. Bauer, C. Blank, R. Reiter, H. Wagner, K. Heeg.** 1997. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol.* **27**:2340-4.
- Liu, M. A., Y. Yasutomi, M. E. Davies, H. C. Perry, D. C. Freed, N. L. Letvin, J. W. Shiver.** 1996. Vaccination of mice nonhuman primates using HIV-gene-containing DNA. *Antibiot Chemother.* **48**:100-4.

- Liu, Y., C. A. Janeway.** 1991. Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth. *Int Immunol.* **3**:323-32.
- Lopes, M. F., G. A. dos Reis.** 1994. *Trypanosoma cruzi* -induced immunosuppression: blockade of costimulatory T-cell responses in infected hosts due to defective T-cell receptor-CD3 functioning. *Infect Immun.* **62**:1484-8.
- Lopes, M. F., G. A. DosReis.** 1996. *Trypanosoma cruzi* -induced immunosuppression: selective triggering of CD4+ T-cell death by the T-cell receptor-CD3 pathway not by the CD69 or Ly-6 activation pathway. *Infect Immun.* **64**:1559-64.
- Lopez, H. M., M. K. Tanner, F. Kierszenbaum, M. B. Szein.** 1993. Alterations induced by *Trypanosoma cruzi* in activated mouse lymphocytes. *Parasite Immunol.* **15**:273-80.
- Low, H. P., R. L. Tarleton.** 1997. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. *Mol Biochem Parasitol.* **88**:137-49.
- Lu, S., J. C. Santoro, D. H. Fuller, J. R. Haynes, H. L. Robinson.** 1995. Use of DNAs expressing HIV-1 Env noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology.* **209**:147-54.
- Mackey, M. F., J. R. Gunn, C. Maliszewsky, H. Kikutani, R. J. Noelle, R. J. Barth.** 1998. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol.* **161**:2094-8.
- Mackey, M. F., R. J. Barth, R. J. Noelle.** 1998. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, effector function of helper cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol.* **63**:418-28.
- Mair y col., 2000
- Malchiodi E. L., C. H. Carbonetto, D. Grana, K. Eiguchi de Palmero, M. G. Chiaramonte, C. A. Falasca, R. A. Margni.** 1993. Immune response against *Trypanosoma cruzi* antigens in *Cebus apella* monkeys. *Tropical Medicine and Parasitology* **44**: 86-90.
- Mancini, M., M. Hadchouel, H. L. Davis, R. G. Whalen, P. Tiollais, M. L. Michel.** 1996. DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:12496-501.
- Manetti, R., F. Annunziato, L. Tomasevic, V. Gianno, P. Parronchi, S. Romagnani, E. Maggi.** 1995. Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon-alpha interleukin-12. *Eur J Immunol.* **25**:2656-60.
- Manickan, E., R. J. Rouse, Z. Yu, W. S. Wire, B. T. Rouse.** 1995. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* **155**:259-65.
- Manning-Cela R, Cortes A, Gonzalez-Rey E, Van Voorhis WC, Swindle J, Gonzalez A.** 2001. LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* Jun;69(6):3916-23.
- Maranon, C., L. Planelles, C. Alonso, M. C. Lopez.** 2000. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *Int Immunol.* **12**:1685-93.
- Maresca, B., G. S. Kobayashi.** 1994. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein as an antigen. *Experientia.* **50**:1067-74.
- Martin, F., C. Puertas, M. C. Thomas, C. Maranon, M. E. Patarroyo, J. Martin, C. Alonso, M. C. Lopez.** 1997. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigenic epitope implicated in the infectivity of fibroblast LLC-MK2 cells. *Parasitol Res.* **83**:226-32.
- Martin, F., J. M. Requena, J. Martin, C. Alonso, M. C. Lopez.** 1993. Cytoplasmic-nuclear translocation of the Hsp70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* **196**:1155-62.
- Martinez-Kinader, B., G. B. Lipford, H. Wagner, K. Heeg.** 1995. Sensitization of MHC class I-restricted T cells to exogenous proteins: evidence for an alternative class I-restricted antigen presentation pathway. *Immunology.* **86**:287-95.
- Martins, G. A., L. Q. Vieira, F. Q. Cunha, J. S. Silva.** 1999. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) CD95 ligand (Fas-L) expression nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun.* **67**:3864-71.

- Matano, T., R. Shibata, C. Siemon, M. Connors, H. C. Lane, M. A. Martin.** 1998. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J. Virol.* **72**: 164-169.
- Mathisen, P. M., V. K. Tuohy.** 2000. Gene therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Immunol.* **20**:327-33.
- Matthews, R. C.** 1992. The 14th C. L. Oakley Lecture. *Candida albicans* HSP 90: link between protective auto immunity. *J Med Microbiol.* **36**:367-70.
- Matthews, R. C., B. Maresca, J. P. Burnie, A. Cardona, L. Carratu, S. Conti, G. S. Deepe, A. M. Florez, S. Franceschelli, E. Garcia, L. S. Gargano, G. S. Kobayashi, J. G. McEwen, B. L. Ortiz, A. M. Oviedo, L. Polonelli, J. Ponton, A. Restrepos, A. Storlazzi.** 1998. Stress proteins in fungal diseases. *Med Mycol.* **36**:45-51.
- McAdam, A. J., A. N. Schweitzer, A. H. Sharpe.** 1998. The role of B7 co-stimulation in activation differentiation of CD4+ CD8+ T cells. *Immunol Rev.* **165**:231-47.
- McKenzie, K. R., E. Adams, W. J. Britton, R. J. Garsia, A. Basten.** 1991. Sequence immunogenicity of the 70-kDa heat shock protein of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol.* **147**:312-9.
- McWilliam, A. S., S. Napoli, A. M. Marsh, F. L. Pemper, D. J. Nelson, C. L. Pimm, P. A. Stumbles, T. N. Wells, P. G. Holt.** 1996. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med.* **184**:2429-32.
- Mejia-Lopez H., M. K. Tanner, F. Kierszbaum, M. Sztejn.** 1993. Alterations induced by *Trypanosoma cruzi* in activated mouse lymphocytes. *Parasite Immunology* **15**: 273-280.
- Melo Coutinho, C. M., G. H. Cavalcanti, M. C. Bonaldo, R. F. Mortensen, T. C. Araujo-Jorge.** 1998. *Trypanosoma cruzi* : detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. *Exp Parasitol.* **90**:143-53.
- Merrifield, R. B.** 1963. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2149-2154.
- Messina, J. P., G. S. Gilkeson, D. S. Pisetsky.** 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol.* **147**:1759-64.
- Metz, G., Y. Carlier, B. Vray.** 1993. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by IFN-gamma-preactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite Immunol.* **15**:693-9.
- Meurs, K. M., M. A. Anthony, M. Slater, M. W. Miller.** 1998. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in dogs: 11 cases (1987-1996). *J Am Vet Med Assoc.* **213**:497-500.
- Millar, A. E., S. J. Kahn.** 2000. The SA85-1.1 protein of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen. *Infect Immun.* **68**:3574-80.
- Millar, A. E., M. Wleklinski-Lee, S. J. Kahn.** 1999. The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. *J Immunol.* **162**:6092-9.
- Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR.** 2003. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* Jun 28;326(7404):1444-8. Review.
- Minoprio, P., M. C. el Cheikh, E. Murphy, M. Hontebeyrie-Joskowicz, R. Coffman, A. Coutinho, A. O'Garra.** 1993. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J Immunol.* **151**:4200-8.
- Minoprio, P., S. Itohara, C. Heusser, S. Tonegawa, A. Coutinho.** 1989. Immunobiology of murine T. cruzi infection: the predominance of parasite-nonspecific responses the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev.* **112**:183-207.
- Montgomery, D. L., J. W. Shiver, K. R. Leander, H. C. Perry, A. Friedman, D. Martinez, J. B. Ulmer, J. J. Donnelly, M. A. Liu.** 1993. Heterologous homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* **12**:777-83.
- Moore, K. W., A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, T. R. Mosmann.** 1993. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* **11**:165-90.

- Mor, G., G. Yamshchikov, M. Sedegah, M. Takeno, R. Wang, R. A. Houghten, S. Hoffman, D. M. Klinman.** 1996. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice. *J Clin Invest.* **98**:2700-5.
- Mor, G., M. Singla, A. D. Steinberg, S. L. Hoffman, K. Okuda, D. M. Klinman.** 1997. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum Gene Ther.* **8**:293-300.
- Moro, A., F. Ruiz-Cabello, A. Fernandez-Cano, R. P. Stock, A. Gonzalez.** 1995. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. *EMBO J.* **14**:2483-90.
- Mosca, W., L. Briceno, M. I. Hernandez.** 1991. Cell mediated immunity in Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi* antigens induce suppression of the in vitro proliferative response of mononuclear cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **86**:147-52.
- Mosmann, T. R.** 1994. Properties functions of interleukin-10. *Adv Immunol.* **56**:1-26.
- Mosmann, T. R., R. L. Coffman.** 1989. TH1 TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* **7**:145-73.
- Motran, C., A. Gruppi, C. M. Vullo, M. C. Pistoiresi-Palencia, H. M. Serra.** 1996. Involvement of accessory cells in the *Trypanosoma cruzi* -induced inhibition of the polyclonal response of T lymphocytes. *Parasite Immunol.* **18**:43-8.
- Mueller, D. L., M. K. Jenkins, R. H. Schwartz.** 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol.* **7**:445-80.
- Murfin, D. J., L. Choromanski, R. E. Kuhn.** 1985. Production characterization of clones of the Brazil strain of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol.* **71**:525-9.
- Murta, A. C., P. M. Persechini, T. Padron, W. de Souza, J. A. Guimaraes, J. Scharfstein.** 1990. Structural functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol.* **43**:27-38.
- Nichols, W. W., B. J. Ledwith, S. V. Manam, P. J. Troilo.** 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci.* **772**:30-9.
- Nishimura, T., H. Kitamura, K. Iwakabe, T. Yahata, A. Ohta, M. Sato, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, T. Kawano, M. Taniguchi, M. Nakui, M. Sekimoto, T. Koda.** 2000. The interface between innate acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* **12**:987-94.
- Nishimura, Y., A. Kamei, S. Uno-Furuta, S. Tamaki, G. Kim, Y. Adachi, K. Kuribayashi, Y. Matsuura, T. Miyamura, Y. Yasutomi.** 1999. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1-alpha promoter elicits HCV-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL). *Vaccine.* **18**:675-80.
- Nogueira, N.** 1987. Biological molecular aspects of *Trypanosoma cruzi*. En *Modern biotechnology Health: Perspectives for the year 2000*. Ed. M. E. Patarroyo, pp 125-134.
- Nogueira, N., J. Ellis, S. Chaplan, Z. Cohn.** 1981. *Trypanosoma cruzi*: in vivo in vitro correlation between T-cell activation susceptibility in inbred strains of mice. *Exp Parasitol.* **51**:325-34.
- O'Brien, R. L., M. P. Happ, A. Dallas, R. Cranfill, L. Hall, J. Lang, Y. X. Fu, R. Kubo, W. Born.** 1991. Recognition of a single hsp-60 epitope by an entire subset of gamma delta T lymphocytes. *Immunol Rev.* **121**:155-70.
- O'Brien, R. L., Y. X. Fu, R. Cranfill, A. Dallas, C. Ellis, C. Reardon, J. Lang, S. R. Carding, R. Kubo, W. Born.** 1992. Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:4348-52.
- Oftung, F., A. Geluk, K. E. Lundin, R. H. Melen, J. E. Thole, A. S. Mustafa, T. H. Ottenhoff.** 1994. Mapping of multiple HLA class II-restricted T-cell epitopes of the mycobacterial 70-kilodalton heat shock protein. *Infect Immun.* **62**:5411-8.
- Ottenhoff, T. H., B. K. Ab, J. D. Van Embden, J. E. Thole, R. Kiessling.** 1988. The recombinant 65-kD heat shock protein of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin/*M. tuberculosis* is a target molecule for CD4+ cytotoxic T lymphocytes that lyse human monocytes. *J Exp Med.* **168**:1947-52.

- Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK.** 2002 Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol.* Mar 15;168(6):2997-3003.
- Pasion, S. G., G. W. Brown, L. M. Brown, D. S. Ray.** 1994. Periodic expression of nuclear mitochondrial DNA replication genes during the trypanosomatid cell cycle. *J Cell Sci.* **107**:3515-20.
- Patarroyo, M. E., Vinasco, J., Amador, R., Espejo, F. Silva, Y., Moreno, A., Rojas, M., Mora, A. L., Salcedo, M. Valero, V., Goldberg, A. K. Kalil, J.** 1991. Genetic control of the immune response to a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.* **13**: 509-516.
- Peake, P. W., W. J. Britton, M. P. Davenport, P. W. Roche, K. R. McKenzie.** 1993. Analysis of B-cell epitopes in the variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70-kilodalton heat shock protein. *Infect Immun.* **61**:135-41.
- Pellegrin, J. L., E. Ortega-Barria, R. P. Prioli, J. S. Mejia, M. E. Pereira.** 1992. The neuraminidases of *Trypanosoma cruzi* *Acanthamoeba castellanii* are immunologically related. *Trop Med Parasitol.* **43**:33-7.
- Pene, J., F. Rousset, F. Briere, I. Chretien, J. Y. Bonnefoy, H. Spits, T. Yokota, N. Arai, K. Arai, J. Banchereau, et al.** 1988. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 suppressed by interferons gamma alpha prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:6880-4.
- Pentreath, V. W.** 1995. Royal Society of Tropical Medicine Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 May 1994. Trypanosomiasis the nervous system. *Pathology immunology. Trans R Soc Trop Med Hyg.* **89**:9-15.
- Perraut, R., A. R. Lussow, S. Gavaille, O. Garraud, H. Matile, C. Tougne, J. van Embden, R. van der Zee, P. H. Lambert, J. Gysin, et al.** 1993. Successful primate immunization with peptides conjugated to purified protein derivative or mycobacterial heat shock proteins in the absence of adjuvants. *Clin Exp Immunol.* **93**:382-6.
- Petry, P. Eisen, H.** 1989. Chagas disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today* **5**: 111-116.
- Pinelli, E., V. P. Rutten, M. Bruysters, P. F. Moore, E. J. Ruitenberg.** 1999. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation gamma interferon production. *Infect Immun.* **67**:237-43.
- Piras, R., M. M. Piras, D. Henriquez.** 1983. *Trypanosoma cruzi* -fibroblastic cell interactions necessary for cellular invasion. *Ciba Found Symp.* **99**:31-51.
- Pisetsky, D. S.** 1996. Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity.* **5**:303-10.
- Pisetsky, D. S.** 1997. DNA the immune system. *Ann Intern Med.* **126**:169-71.
- Planelles, L., C. Maranon, J. M. Requena, M. C. Lopez.** 1999. Phage recovery by electroporation of naked DNA into host cells avoids the use of packaging extracts. *Anal Biochem.* **267**:234-5.
- Planelles L, Thomas MC, Maranon C, Morell M, Lopez MC.** 2003. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin Exp Immunol.* Jan;131(1):41-7.
- Polla, B. S.** 1991. Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunol Today.* **12**:A38-41.
- Prina, E., C. Jouanne, S. de Souza Lao, A. Szabo, J. G. Guillet, J. C. Antoine.** 1993. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol.* **151**:2050-61.
- Prioli, R. P., E. Ortega-Barria, J. S. Mejia, M. E. Pereira.** 1992. Mapping of a B-cell epitope present in the neuraminidase of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **52**:85-96.
- Prioli, R. P., J. S. Mejia, M. E. Pereira.** 1991. On the interaction of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase human lipoproteins. *Eur J Epidemiol.* **7**:344-8.
- Quintana, F. J., A. Rotem, P. Carmi, I. R. Cohen.** 2000. Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J Immunol.* **165**:6148-55.
- Rammensee, H. G., T. Friede, S. Stevanoviic.** 1995. MHC ligands peptide motifs: first listing. *Immunogenetics.* **41**:178-228.

- Ramshaw, I. A., S. A. Fordham, C. C. Bernard, D. Maguire, W. B. Cowden, D. O. Willenborg.** 1997. DNA vaccines for the treatment of autoimmune disease. *Immunol Cell Biol.* **75**:409-13.
- Raz, E., D. A. Carson, S. E. Parker, T. B. Parr, A. M. Abai, G. Aichinger, S. H. Gromkowski, M. Singh, D. Lew, M. A. Yankauckas, S. M. Baird, G. H. Rhodes.** 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:9519-23.
- Raz, E., D. A. Carson, S. E. Parker, T. B. Parr, A. M. Abai, G. Aichinger, S. H. Gromkowski, M. Singh, D. Lew, M. A. Yankauckas, et al.** 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:9519-23.
- Raz, E., H. Tighe, Y. Sato, M. Corr, J. A. Dudler, M. Roman, S. L. Swain, H. L. Spiegelberg, D. A. Carson.** 1996. Preferential induction of a Th1 immune response inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:5141-5.
- Reddy, A., M. Sapp, M. Feldman, M. Subklewe, N. Bhardwaj.** 1997. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood.* **90**:3640-6.
- Reed, S. G.** 1988. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, prevents acute disease, immune suppression, death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* **140**:4342-7.
- Reed, S. G., C. E. Brownell, D. M. Russo, J. S. Silva, K. H. Grabstein, P. J. Morrissey.** 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* **153**:3135-40.
- Reis e Sousa, C., R. N. Germain.** 1995. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med.* **182**:841-51.
- Reis e Sousa, C., P. D. Stahl, J. M. Austyn.** 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med.* **178**:509-19.
- Rescigno, M., S. Citterio, C. Thery, M. Rittig, D. Medaglini, G. Pozzi, S. Amigorena, P. Ricciardi-Castagnoli.** 1998. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5229-5234.
- Rico, A. I., G. Del Real, M. Soto, L. Quijada, A. C. Martinez, C. Alonso, J. M. Requena.** 1998. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal nu/nu BALB/c mice. *Infect Immun.* **66**:347-52.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, P. Matzinger.** 1998. A conditional dendritic cell can become a temporary bridge between a CD4⁺ T-helper a T-killer cell. *Nature* **393**: 474-478.
- Rizzo, L. V., E. Cunha-Neto, A. R. Teixeira.** 1989. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4⁺ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **57**:2640-4.
- Roake, J. A., A. S. Rao, P. J. Morris, C. P. Larsen, D. F. Hankins, J. M. Austyn.** 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, interleukin 1. *J Exp Med.* **181**:2237-47.
- Robertson, C. R., D. S. Pisetsky.** 1992. Specificity analysis of antibodies to single-stranded micrococcal DNA in the sera of normal human subjects patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* **10**:589-94.
- Robertson, J. S.** 1994. Safety considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine.* **12**:1526-8.
- Rodrigues, M. M., M. Ribeiro, S. B. Boscardin.** 2000. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett.* **73**:43-50.
- Rodrigues, M. M., M. Ribeiro, V. Pereira-Chiocola, L. Renia, F. Costa.** 1999. Predominance of CD4 Th1 CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun.* **67**:3855-63.

- Roman, M., E. Martin-Orozco, J. S. Goodman, M. D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R. S. Kornbluth, D. D. Richman, D. A. Carson, E. Raz. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med.* **3**:849-54.
- Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser, G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* **196**:137-51.
- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* **180**:83-93.
- Rosner J. M., J. Bellasai, A. Schinini, T. Rovira, A. R. de Arias, E. A. Ferro, E. Ferreira, G. Velazquez, M. I. Monzon, M. Maldonado, R. Galeano. 1989. Cardiomyopathy in *Cebus apella* monkeys experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine and Parasitology* **40**: 24-31.
- Rossi, M. A., R. B. Bestetti. 1995. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms microvascular changes, therapeutic implications. *Cardiology.* **86**:1-7.
- Rottenberg, M. E., M. Bakhiet, T. Olsson, K. Kristensson, T. Mak, H. Wigzell, A. Orn. 1993. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun.* **61**:5129-33.
- Rottenberg, M., C. Lindqvist, A. Koman, E. L. Segura, A. Orn. 1989. Modulation of both interleukin 2 receptor expression interleukin 2 production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.* **30**:65-72.
- Rottenberg, M., R. L. Cardoni, R. Andersson, E. L. Segura, A. Orn. 1988. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.* **28**:573-82.
- Rowland, E. C., D. M. Ritter. 1984. Corpus Christi strain-induced protection to *Trypanosoma cruzi* infection in C3H(He) mice: transfer of resistance to Brazil strain challenge with lymphocytes. *J Parasitol.* **70**:760-6.
- Ruiz, A. M., M. Esteva, E. Subias, M. Moreno, A. Rosenstein de Campanini, E. Velazquez, E. L. Segura. 1990. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* : immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity-purified antigen. *Mol Biochem Parasitol.* **39**:117-25.
- Russo, M., N. Starobinas, P. Minoprio, A. Coutinho, M. Hontebeyrie-Joskowicz. 1988. Parasitic load increases myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi* -infected mice after inactivation of helper T cells. *Ann Inst Pasteur Immunol.* **139**:225-36.
- Saibil, H. R. 1996. What can electron microscopy tell us about chaperoned protein folding? *Fold Des.* **1**:R45-9.
- Sallusto, F., A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* **179**:1109-18.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines bacterial products. *J Exp Med.* **182**:389-400.
- Salomone OA, Juri D, Omelianiuk MO, Sembaj A, Aguerri AM, Carriazo C, Barral JM, Madoery R. 2000 Prevalence of circulating *Trypanosoma cruzi* detected by polymerase chain reaction in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* May 15;85(10):1274-6.
- Salvetti, M., G. Ristori, C. Buttinelli, P. Fiori, M. Falcone, W. Britton, E. Adams, G. Paone, M. G. Grasso, C. Pozzilli. 1996. The immune response to mycobacterial 70-kDa heat shock proteins frequently involves autoreactive T cells is quantitatively disregulated in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* **65**:143-53.
- Sambroock, J., Maniatis, T. Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Samudio, M., S. Montenegro-James, E. Kasamatsu, M. Cabral, A. Schinini, A. Rojas De Arias, M. A. James.** 1999. Local systemic cytokine expression during experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in a Cebus monkey model. *Parasite Immunol.* **21**:451-60.
- Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**:5463-7.
- Santrich, C., L. Moore, T. Sherwin, P. Bastin, C. Brokaw, K. Gull, J. H. LeBowitz.** 1997. A motility function for the paraflagellar rod of Leishmania parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. *Mol Biochem Parasitol.* **90**:95-109.
- Sarin, V. K., S. B. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield.** 1981. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem.* **117**:147-57.
- Sato, Y., M. Roman, H. Tighe, D. Lee, M. Corr, M. D. Nguyen, G. J. Silverman, M. Lotz, D. A. Carson, E. Raz.** 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* **273**:352-4.
- Scharfstein, J., A. Luquetti, A. C. Murta, M. Senna, J. M. Rezende, A. Rassi, L. Mendonca-Previato.** 1985. Chagas' disease: serodiagnosis with purified Gp25 antigen. *Am J Trop Med Hyg.* **34**:1153-60.
- Schirmbeck, R., W. Bohm, J. Reimann.** 1997. Stress protein (hsp73)-mediated, TAP-independent processing of endogenous, truncated SV40 large T antigen for Db-restricted peptide presentation. *Eur J Immunol.* **27**:2016-23.
- Schoenberger, S. P., E. I. van der Voort, G. M. Krietemeijer, R. Offringa, C. J. Melief, R. E. Toes.** 1998. Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells. *J Immunol.* **161**:3808-12.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, C. J. Melief.** 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**: 480-483.
- Schofield CJ, Dias JC.** 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol.*;42:1-27. Review.
- Schwartz, R. H.** 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, B7/BB1 in interleukin-2 production immunotherapy. *Cell.* **71**:1065-8.
- Sedegah, M., R. Hedstrom, P. Hobart, S. L. Hoffman.** 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:9866-70.
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, A. Sher, W. E. Paul.** 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:10188-92.
- Selmaj, K., C. F. Brosnan, C. S. Raine.** 1991. Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:6452-6.
- Shapira, M., J. G. McEwen, C. L. Jaffe.** 1988. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in Leishmania. *EMBO J.* **7**:2895-901.
- Sheikh N. A., P. Rajanathanan, G. S. Attard, W. J. Morrow.** 1999. Generation of antigen specific CD8+ cytotoxic T cells following immunization with soluble protein formulated with novel glycoside adjuvants. *Vaccine* **17**:2974-82.
- Sherman, M. Y., A. L. Goldberg.** 1996. Involvement of molecular chaperones in intracellular protein breakdown. *Exs.* **77**:57-78.
- Shimada, S., O. Yano, T. Tokunaga.** 1986. In vivo augmentation of natural killer cell activity with a deoxyribonucleic acid fraction of BCG. *Jpn J Cancer Res.* **77**:808-16.
- Shimada, S., O. Yano, H. Inoue, E. Kuramoto, T. Fukuda, H. Yamamoto, T. Kataoka, T. Tokunaga.** 1985. Antitumor activity of the DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors. *J Natl Cancer Inst.* **74**:681-8.
- Silva, J. S., G. N. Vespa, M. A. Cardoso, J. C. Aliberti, F. Q. Cunha.** 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* **63**:4862-7.

- Silva, L. H. P. Nussenzweig, V.** 1953. Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* **23**: 197-203.
- Simone, E. A., D. R. Wegmann, G. S. Eisenbarth.** 1999. Immunologic "vaccination" for the prevention of autoimmune diabetes (type 1A). *Diabetes Care.* **22 Suppl 2**:B7-15.
- Simpson, A. A., Y. Tao, P. G. Leiman, M. O. Badasso, Y. He, P. J. Jardine, N. H. Olson, M. C. Morais, S. Grimes, D. L. Anderson, T. S. Baker, M. G. Rossmann.** 2000. Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Nature.* **408**:745-50.
- Simpson, A. M., Y. Suyama, H. Dewes, D. A. Campbell, L. Simpson.** 1989. Kinetoplastid mitochondria contain functional tRNAs which are encoded in nuclear DNA also contain small minicircle maxicircle transcripts of unknown function. *Nucleic Acids Res.* **17**:5427-45.
- Simpson, L.** 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, evolution. *Annu Rev Microbiol.* **41**:363-82.
- Simpson, L., J. Shaw.** 1989. RNA editing the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell.* **57**:355-66.
- Sin, J. I., M. Bagarazzi, C. Pachuk, D. B. Weiner.** 1999. DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2 gD vaccine model. *DNA Cell Biol.* **18**:771-9.
- Singh-Jasuja, H., H. U. Scherer, N. Hilf, D. Arnold-Schild, H. G. Rammensee, R. E. Toes, H. Schild.** 2000. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol.* **30**:2211-5.
- Singh-Jasuja, H., R. E. M. Toes, P. Spee, C. Münz, N. Hilf, S. P. Schoenberger, P. Ricciardi-Castagnoli, J. Neefjes, H. G. Rammensee, D. Arnold-Schild, H. Schild.** 2000. Cross-presentation of gp96-associated antigens on MHC class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.* **191**: 1965-1974.
- Soeiro, M., M. M. Paiva, H. S. Barbosa, M. Meirelles, T. C. Araujo-Jorge.** 1999. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion is down-modulated after infection. *Cell Struct Funct.* **24**:139-49.
- Soeiro, M., M. M. Paiva, M. C. Waghabi, M. Meirelles, K. Lorent, A. Henriques-Pons, C. M. Coutinho, F. Van Leuven, T. C. Araujo-Jorge.** 2000. *Trypanosoma cruzi* : acute infection affects expression of alpha-2-macroglobulin A2MR/LRP receptor differently in C3H C57BL/6 mice. *Exp Parasitol.* **96**:97-107.
- Sousa, C. R., S. Hieny, T. Scharon-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, A. Sher.** 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells their redistribution to T cell areas. *J Exp Med.* **186**:1819-29.
- Souto-Padron, T., W. de Souza.** 1989. The effect of tunicamycin monensin on the association of *Trypanosoma cruzi* with resident macrophages. *Parasitol Res.* **76**:98-106.
- Souto-Padron, T., G. Dreyer, L. D. Andrade, A. Rocha, W. De Souza.** 1993. Immunocytochemical localization of surface intracellular antigens recognized by human sera in microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *J Submicrosc Cytol Pathol.* **25**:79-83.
- Souto-Padron, T., I. C. Almeida, W. de Souza, L. R. Travassos.** 1994. Distribution of alpha-galactosyl-containing epitopes on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote amastigote forms from infected Vero cells detected by Chagasic antibodies. *J Eukaryot Microbiol.* **41**:47-54.
- Souto-Padron, T., M. B. Reyes, S. Leguizamon, O. E. Campetella, A. C. Frasch, W. de Souza.** 1989. *Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite. *Eur J Cell Biol.* **50**:272-8.
- Sparwasser, T., E. S. Koch, R. M. Vabulas, K. Heeg, G. B. Lipford, J. W. Ellwart, H. Wagner.** 1998. Bacterial DNA immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol.* **28**:2045-54.
- Srivastava, P. K., H. Udon.** 1994. Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* **6**:728-32.
- Stebeck CE, G. S. Baron, R. P. Beecroft, T. W. Pearson.** 1996. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 from African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **81**: 81-8.

- Stevenson, F. K., G. J. Silverman.** 1997. Expression of anti-DNA antibodies. *Lupus*. **6**:321-3.
- Stewart-Tull DES.** The theory practical application of adjuvants, Wiley, Chichester, 1994, p. 1.
- Stinissen, P., C. Vandevyver, R. Medaer, L. Vandegaer, J. Nies, L. Tuyls, D. A. Hafler, J. Raus, J. Zhang.** 1995. Increased frequency of gamma delta T cells in cerebrospinal fluid peripheral blood of patients with multiple sclerosis. Reactivity, cytotoxicity, T cell receptor V gene rearrangements. *J Immunol*. **154**:4883-94.
- Street, N. E., T. R. Mosmann.** 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *Faseb J*. **5**:171-7.
- Suto, R., P. K. Srivastava.** 1995. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*. **269**:1585-8.
- Suzue, K., R. A. Young.** 1996. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral cellular immune responses to HIV-1 p24. *J Immunol*. **156**:873-9.
- Suzue, K., X. Zhou, H. N. Eisen, R. A. Young.** 1997. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:13146-51.
- Svensson, M., B. Stockinger, M. J. Wick.** 1997. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I MHC-II presentation to T cells. *J Immunol*. **158**:4229-36.
- Syrengeles, A. D., T. T. Chen, R. Levy.** 1996. DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma. *Nat Med*. **2**:1038-41.
- Tamura, Y., P. Peng, K. Liu, M. Daou, P. K. Srivastava.** 1997. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*. **278**:117-20.
- Tang, D. C., M. DeVit, S. A. Johnston.** 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. **356**:152-4.
- Tanowitz, H. B., L. V. Kirchhoff, D. Simon, S. A. Morris, L. M. Weiss, M. Wittner.** 1992. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*. **5**:400-19.
- Tanowitz, H. B., N. Minato, R. Lalonde, M. Wittner.** 1981. *Trypanosoma cruzi*: correlation of resistance susceptibility in infected bred mice with the in vivo primary antibody response to sheep red blood cells. *Exp Parasitol*. **52**:233-42.
- Tarleton, R. L.** 1988. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol*. **140**: 2769-2773.
- Tarleton, R. L.** 1995. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Today* **11**: 7-9
- Tarleton, R. L.** 1990. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. **144**:717-24.
- Tarleton, R. L., B. H. Koller, A. Latour, M. Postan.** 1992. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. **356**:338-40.
- Tarleton, R. L., M. J. Grusby, M. Postan, L. H. Glimcher.** 1996. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- class II-restricted T cells in immune resistance disease. *Int Immunol*. **8**:13-22.
- Tarleton, R. L., Sun, J., Zhang, L. Postan, M.** 1994. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun*. **62**: 1820-1829.
- Tarleton, R. L., Zhang, L. Down, M. O.** 1997. "Autoimmune rejection" of neonatal transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3932-3937.
- Tascon, R. E., M. J. Colston, S. Ragno, E. Stavropoulos, D. Gregory, D. B. Lowrie.** 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med*. **2**:888-92.
- Thomas, M. C., J. L. Garcia-Perez, C. Alonso, M. C. Lopez.** 2000. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol*. **19**:47-57.
- Thomas, M. C., M. V. Longobardo, E. Carmelo, C. Maranon, L. Planelles, M. E. Patarroyo, C. Alonso, M. C. Lopez.** 2001. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-

11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clin Exp Immunol.* **123**:465-71.
- Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo, N. Makiguchi, T. Suganuma.** 1984. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, antitumor activity. *J Natl Cancer Inst.* **72**:955-62.
- Tokunaga, T., O. Yano, E. Kuramoto, Y. Kimura, T. Yamamoto, T. Kataoka, S. Yamamoto.** 1992. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons activate natural killer cells. *Microbiol Immunol.* **36**:55-66.
- Tolson, D. L., A. Jardim, L. F. Schnur, C. Stebeck, C. Tuckey, R. P. Beecroft, H. S. Teh, R. W. Olafson, T. W. Pearson.** 1994. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun.* **62**:4893-9.
- Torres, C. A., A. Iwasaki, B. H. Barber, H. L. Robinson.** 1997. Differential dependence on target site tissue for gene gun intramuscular DNA immunizations. *J Immunol.* **158**:4529-32.
- Torrico, F., H. Heremans, M. T. Rivera, E. Van Marck, A. Billiau, Y. Carlier.** 1991. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* **146**:3626-32.
- Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**:4350-4.
- Trinchieri, G.** 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* **13**:251-76.
- Trischmann, T. M.** 1986. *Trypanosoma cruzi*: early parasite proliferation host resistance in inbred strains of mice. *Exp Parasitol.* **62**:194-201.
- Trischmann, T., H. Tanowitz, M. Wittner, B. Bloom.** 1978. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp Parasitol.* **45**:160-8.
- Trujillo, C., R. Ramirez, I. D. Velez, C. Berberich.** 1999. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis Chagas disease: prevalence of IgG subclasses mapping of epitopes. *Immunol Lett.* **70**:203-9.
- Tyler K. M., D. E. Engman.** 2000. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **46**: 269-278.
- Tyler K. M., D. M. Engman.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology* **31**: 472-481.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, L. A. Hawe, K. R. Leander, D. Martinez, H. C. Perry, J. W. Shiver, D. L. Montgomery, M. A. Liu.** 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* **259**:1745-9.
- Ulmer, J. B., R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, J. J. Donnelly, M. A. Liu.** 1994. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine.* **12**:1541-4.
- Ulmer, J. B., R. R. Deck, C. M. Dewitt, J. I. Donnhly, M. A. Liu.** 1996. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology.* **89**:59-67.
- Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazardi K, Piras MM, Piras R, Perez N, Wincker P, Ryley JF.** 1996. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science.* Aug 16;273(5277):969-71.
- Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D.** 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* Jul;42(7):1771-7.
- Urbina JA.** 2001. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis.* Dec;14(6):733-41. Review
- Urbina JA.** 2002. Chemotherapy of Chagas disease.

- Curr Pharm Des.;8(4):287-95. Review
- Urbina JA, Docampo R.** 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol. Nov;19(11):495-501.
- van Eden, W.** 1991. Heat-shock proteins as immunogenic bacterial antigens with the potential to induce regulate autoimmune arthritis. Immunol Rev. **121**:5-28.
- Van Gool, S. W., P. Vandenberghe, M. de Boer, J. L. Ceuppens.** 1996. CD80, CD86 CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. Immunol Rev. **153**:47-83.
- Van Overtvelt, L., N. Vanderheyde, V. Verhasselt, J. Ismaili, L. De Vos, M. Goldman, F. Willems, B. Vray.** 1999. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, costimulatory molecules. Infect Immun. **67**:4033-40.
- Van Voorhis, W. C., Schlekewy, L. Eisen H.** 1991. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 5993-5997.
- Van Voorhis, W. C., H. Eisen.** 1989. F1-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. J Exp Med. **169**:641-52.
- Vespa, G. N., F. Q. Cunha, J. S. Silva.** 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* - induced parasitemia directly kills the parasite in vitro. Infect Immun. **62**:5177-82.
- Villalta, F., Y. Zhang, K. E. Bibb, J. M. Burns, M. F. Lima.** 1998. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. Biochem Biophys Res Commun. **249**:247-52.
- Villalta, F., Y. Zhang, K. E. Bibb, S. Pratap, J. M. Burns, M. F. Lima.** 1999. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. Mol Cell Biol Res Commun. **2**:64-70.1991.
- Viotti, R., C. Vigliano, H. Armenti, E. Segura.** 1994. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical serologic evolution of patients with long-term follow-up. Am Heart J. **127**:151-62.
- Vitiello, A., D. Marchesini, J. Furze, L. A. Sherman, R. W. Chesnut.** 1991. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. J Exp Med. **173**:1007-15.
- von Herrath, M. G., J. L. Whitton.** 2000. DNA vaccination to treat autoimmune diabetes. Ann Med. **32**:285-92.
- Wagner, H.** 1999. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. Adv Immunol. **73**:329-68.
- Waisman, A., P. J. Ruiz, D. L. Hirschberg, A. Gelman, J. R. Oksenberg, S. Brocke, F. Mor, I. R. Cohen, L. Steinman.** 1996. Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis activates Th2 immunity. Nat Med. **2**:899-905.
- Walker, P. S., T. Scharton-Kersten, A. M. Krieg, L. Love-Homan, E. D. Rowton, M. C. Udey, J. C. Vogel.** 1999. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- IFN-gamma-dependent mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A. **96**:6970-5.
- Walker, P. S., T. Scharton-Kersten, E. D. Rowton, U. Hengge, A. Bouloc, M. C. Udey, J. C. Vogel.** 1998. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response protection in a murine model of leishmaniasis. Hum Gene Ther. **9**:1899-907.
- Wang, B., J. Boyer, V. Srikantan, K. Ugen, L. Gilbert, C. Phan, K. Dang, M. Merva, M. G. Agadjanyan, M. Newman, R. Carrano, D. McCallus, L. Coney, W. V. Williams, D. B. Weiner.** 1995. Induction of humoral and cellular immune responses to the human immunodeficiency type 1 virus in nonhuman primates by in vivo DNA inoculation. Virology. **211**:102-12.
- Wang, B., J. Boyer, V. Srikantan, L. Coney, R. Carrano, C. Phan, M. Merva, K. Dang, M. Agadjanyan, L. Gilbert, K. E. Ugen, W. V. Williams, D. B. Weiner.** 1993. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. DNA Cell Biol. **12**:799-805.

- Wang, B., M. Merva, K. Dang, K. E. Ugen, J. Boyer, W. V. Williams, D. B. Weiner. 1994. DNA inoculation induces protective in vivo immune responses against cellular challenge with HIV-1 antigen-expressing cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **10**:S35-41.
- Watanabe, A., E. Raz, H. Kohsaka, H. Tighe, S. M. Baird, T. J. Kipps, D. A. Carson. 1993. Induction of antibodies to a kappa V region by gene immunization. *J Immunol*. **151**:2871-6.
- Webster, R. G., E. F. Fynan, J. C. Santoro, H. Robinson. 1994. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine*. **12**:1495-8.
- Welch, W. J. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, implications for medicine disease. *Physiol Rev*. **72**:1063-81.
- Weston, D., A. C. La Flamme, W. C. Van Voorhis. 1999. Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic, the coding regions. *Mol Biochem Parasitol*. **102**:53-66.
- Wigand, R., R. Gottschalk, A. Falkenbach, T. Matthias, J. P. Kaltwasser, D. Hoelzer. 1997. [Detection of dsDNA antibodies in diagnosis of systemic lupus erythematosus--comparative studies of diagnostic effectiveness of 3 ELISA methods with different antigens a Crithidia luciliae immunofluorescence test]. *Z Rheumatol*. **56**:53-62.
- Wildbaum, G., J. Westermann, G. Maor, N. Karin. 2000. A targeted DNA vaccine encoding fas ligand defines its dual role in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. **106**:671-9.
- Winfield, J., W. Jarjour. 1991. Do stress proteins play a role in arthritis autoimmunity? *Immunol Rev*. **121**:193-220.
- Wingren, A. G., E. Parra, M. Varga, T. Kalland, H. O. Sjogren, G. Hedlund, M. Dohlsten. 1995. T cell activation pathways: B7, LFA-3, ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit Rev Immunol*. **15**:235-53.
- Wizel, B., M. Palmieri, C. Mendoza, B. Arana, J. Sidney, A. Sette, R. Tarleton. 1998. Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Clin Invest*. **102**:1062-71.
- Wizel, B., N. Garg, R. L. Tarleton. 1998. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. **66**:5073-81.
- Wolff, J. A., J. J. Ludtke, G. Acsadi, P. Williams, A. Jani. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*. **1**:363-9.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, P. L. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. **247**:1465-8.
- Wrightsman, R. A., J. E. Manning. 2000. Paraflagellar rod proteins administered with alum IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*. **18**:1419-27.
- Wrightsman, R. A., M. J. Miller, J. L. Saborio, J. E. Manning. 1995. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. **63**:122-5.
- Wrightsman, R. A., S. M. Krassner, J. D. Watson, J. E. Manning. 1984. Role of the H-2s haplotype in survival of mice after infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. **44**:351-4.
- Wrightsman, R., S. Krassner, J. Watson. 1982. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia survival. *Infect Immun*. **36**:637-44.
- Xiang, R., S. Silletti, H. N. Lode, C. S. Dolman, J. M. Ruehlmann, A. G. Niethammer, U. Pertl, S. D. Gillies, F. J. Primus, R. A. Reisfeld. 2001. Protective immunity against human carcinoembryonic antigen (CEA) induced by an oral DNA vaccine in CEA-transgenic mice. *Clin Cancer Res*. **7**:856s-864s.
- Xiang, Z. Q., B. B. Knowles, J. W. McCarrick, H. C. Ertl. 1995. Immune effector mechanisms required for protection to rabies virus. *Virology*. **214**:398-404.
- Xiang, Z. Q., S. L. Spitalnik, J. Cheng, J. Erikson, B. Wojczyk, H. C. Ertl. 1995. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology*. **209**:569-79.

- Xiang, Z. Q., S. Spitalnik, M. Tran, W. H. Wunner, J. Cheng, H. C. Ertl.** 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*. **199**:132-40.
- Xiang, Z., H. C. Ertl.** 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity*. **2**:129-35.
- Xu, D., F. Y. Liew.** 1995. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*. **84**:173-6.
- Yaegashi, Y., P. Nielsen, A. Sing, C. Galanos, M. A. Freudenberg.** 1995. Interferon beta, a cofactor in the interferon gamma production induced by gram-negative bacteria in mice. *J Exp Med*. **181**:953-60.
- Yamamoto, S., E. Kuramoto, S. Shimada, T. Tokunaga.** 1988. In vitro augmentation of natural killer cell activity production of interferon-alpha/beta -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res*. **79**:866-73.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka, T. Tokunaga.** 1992. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol*. **36**:983-97.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano, T. Tokunaga.** 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol*. **148**:4072-6.
- Yang, O. O., S. A. Kalams, M. Rosenzweig, S. Trocha, N. Jones, M. Koziel, B. D. Walker, R. P. Johnson.** 1996. Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol*. **70**: 5799-5806.
- Yang, O. O., S. A. Kalams, S. Trocha, H. Cao, A. Luster, R. P. Johnson, B. D. Walker.** 1997. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8⁺ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic noncytolytic mechanisms. *J. Virol* **71**: 3120-3128.
- Yokoyama, M., J. Zhang, J. L. Whitton.** 1995. DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol*. **69**:2684-8.
- Yoshino, I., P. S. Goedegebuure, G. E. Peoples, K. Y. Lee, T. J. Eberlein.** 1994. Human tumor-infiltrating CD4⁺ T cells react to B cell lines expressing heat shock protein 70. *J Immunol*. **153**:4149-58.
- Young, D. B., A. Mehlert, V. Bal, P. Mendez-Samperio, J. Ivanyi, J. R. Lamb.** 1988. Stress proteins the immune response to mycobacteria--antigens as virulence factors? *Antonie Van Leeuwenhoek*. **54**:431-9.
- Youssef, S., G. Wildbaum, G. Maor, N. Lanir, A. Gour-Lavie, N. Gracie, N. Karin.** 1998. Long-lasting protective immunity to experimental autoimmune encephalomyelitis following vaccination with naked DNA encoding C-C chemokines. *J Immunol*. **161**:3870-9.
- Zal, T., A. Volkmann, B. Stockinger.** 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med*. **180**:2089-99.
- Zarozinski, C. C., E. F. Fynan, L. K. Selin, H. L. Robinson, R. M. Welsh.** 1995. Protective CTL-dependent immunity enhanced immunopathology in mice immunized by particle bombardment with DNA encoding an internal virion protein. *J Immunol*. **154**:4010-7.
- Zhang, J., Z. A. Andrade, Z. X. Yu, S. G. Andrade, K. Takeda, M. Sadirgursky, V. J. Ferrans.** 1999. Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. **31**:581-96.
- Zhang, L., R. L. Tarleton.** 1996. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility type 2 cytokine production. *Eur J Immunol*. **26**:102-9.
- Zhu, N., D. Liggitt, Y. Liu, R. Debs.** 1993. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science*. **261**:209-11.
- Zuber, B., J. Hinkula, D. Vodros, P. Lundholm, C. Nilsson, A. Morner, M. Levi, R. Benthin, B. Wahren.** 2000. Induction of immune responses break of tolerance by DNA against the HIV-1 coreceptor CCR5 but no protection from SIVsm challenge. *Virology*. **278**:400-11.
- 1995, Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*. **811**:1-95.