

Vol. 7 No. 2

Julio - Diciembre 2002





TAMIZAJE DE UNA LIBRERÍA DE cDNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CON UNA MEZCLA DE SUEROS CHAGÁSICOS CRÓNICOS

Paula Pavía¹, Fernando Rosas², Víctor Velasco², Concepción Puerta^{1*}

¹Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología,
Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana,
Carrera 7ª N° 43-82, Edificio 50, Laboratorio 124, Bogotá, Colombia,
E-mail: cpuerta@javeriana.edu.co.

²Departamento de Electrofisiología, Fundación Clínica Shaio, Avenida 54 N° 104-50, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el tamizaje de una librería de cDNA de *Trypanosoma cruzi* con una mezcla de sueros chagásicos crónicos, seleccionándose cuatro clones (P1, P2, P3 y P4) con base en su mayor intensidad de reactividad. De estos clones, P2 y P4 resultaron ser idénticos. P1 se encontró que codifica para el extremo carboxilo-terminal de la proteína EF-Hand 5 variante 1 de *T. cruzi* y los clones P2 y P3 codifican para el extremo carboxilo terminal de "nuevas" proteínas del parásito que carecen de homología con proteínas previamente reportadas; siendo posiblemente P3 una proteína de membrana del parásito. La presencia de los productos codificados por estos clones en el estadio tripomastigote, sumado a su reactividad frente a sueros de pacientes chagásicos mas no de controles no infectados, hacen de estas proteínas candidatos para marcadores asociados a la fase crónica de la enfermedad de chagas.

Palabras clave: Clones, enfermedad de chagas, sueros chagásicos crónicos, tamizaje, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

In this work was carried out a screening of cDNA library of *Trypanosoma cruzi* with a pool of chronic chagasic sera. The P1, P2, P3, and P4 clones were selected based on its higher reactivity. Two of these clones were identical (P2 and P4). P1 codes for the carboxy-terminal of the EF-Hand 5 variant 1 protein of *T. cruzi*. P2 and P3 code for the carboxy-terminal of probably new parasite proteins that lack homology with previously reported proteins. Moreover, it is probably that P3 encodes a membrane protein of the parasite. The presence of the P1, P2, and P3 products in the trypomastigote stage of the parasite, and the immune recognition of them by chronic chagasic sera but not by healthy controls; make these proteins candidates for markers associated with chronic phase of Chagas disease.

Key words: Clones, Chagas disease, chagasic chronic sera, screening, *Trypanosoma cruzi*

INTRODUCCIÓN

Los protozoos parásitos pertenecientes a la familia *Tripanosomatidae* son responsables de un grupo de enfermedades que afectan al hombre y a varias especies animales salvajes y domésticas. Dentro de esta familia se

encuentra el *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas (Tanowitz, *et al.*, 1992). Enfermedad que afecta alrededor de 20 millones de personas en Latinoamérica, de las cuales un millón corresponde a la población colombiana (WHO 1991, PAHO 1994).

La enfermedad de chagas involucra tres fases distintas: una fase aguda media o inaparente, que ocasiona la muerte en aproximadamente el 10% de los casos, en su mayoría niños. Una fase indeterminada asintomática, en la cual debido a la ausencia de síntomas el paciente desconoce su infección y constituye un reservorio del parásito que ayuda al mantenimiento del ciclo de vida del mismo. Un 30% de los pacientes asintomáticos 10 a 20 años más tarde, desarrollan la tercera fase: la fase crónica de la enfermedad; la cual se manifiesta con alteraciones cardíacas, digestivas o neurológicas, que pueden conducir a la muerte (Tanowitz, *et al.*, 1992, WHO 1991).

Durante el transcurso de la infección, el parásito presenta un gran número de determinantes antigénicos al sistema inmune del huésped mamífero, cuyo reconocimiento varía dependiendo de la fase de la enfermedad (Frasch, *et al.*, 1989, Umezawa, *et al.*, 1996, Brodskyn, *et al.*, 1996). Por su parte, el huésped monta una respuesta inmune tanto humoral como celular que reduce los niveles de parasitemia, pero es incapaz de erradicar al parásito (Tanowitz, *et al.*, 1992, WHO 1991).

Varios antígenos de *T. cruzi* han sido aislados y estudiados mediante el tamizaje de librerías de expresión con el suero de pacientes chagásicos o animales infectados (Levin, *et al.*, 1989, Cotrim, *et al.*, 1990, Kerner, *et al.*, 1991, Tibbetts, *et al.*, 1994, Lesenechal, *et al.*, 1997).

Por otra parte, si bien el proyecto genoma de *T. cruzi* tiene por objeto la secuenciación del genoma del parásito y la identificación funcional de sus genes (Porcel, *et al.*, 2000); se requieren de otras aproximaciones, tales como el tamizaje inmunológico de librerías del parásito, para identificar antígenos del mismo implicados no solamente en la respuesta inmune, sino que puedan constituir marcadores asociados con la evolución de

la fase indeterminada a la fase crónica de la enfermedad.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se realizó el tamizaje de una librería de cDNA de *Trypanosoma cruzi*, con una mezcla de sueros chagásicos crónicos, con el fin de aislar clones del parásito que codifiquen antígenos inmunológicamente relevantes, que puedan constituir marcadores de la fase crónica de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sueros

Se trabajó con el suero de 10 pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica de la Clínica Shaio de Bogotá, Colombia; los cuales eran francamente positivos a la infección por *T. cruzi* tanto por pruebas de ELISA como de IFI. Como sueros control se utilizaron el suero de dos personas sanas no infectadas por el parásito, residentes de la ciudad de Bogotá, Colombia. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

Librería

Se utilizó una librería de cDNA cordialmente cedida por el Dr. Manuel Carlos López del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (Granada, España). Dicha librería fue construida en el vector pSPORT1 (Gibco-BRL), a partir del ARN mensajero de tripomastigotes de la cepa Tulahuen del parásito. En esta librería, los insertos clonados en el sitio NotI/SalI del vector, se expresan como una proteína de fusión con la β galactosidasa.

Tamizaje de la librería

Luego de titular la librería, ésta se amplificó obteniéndose alrededor de 200 colonias por placa de 87 mm, para un total de 1.000 placas

bacterianas. Una vez que las bacterias crecieron a 37°C, hasta alcanzar un diámetro de 0.1 a 0.2 mm, fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa y replicadas. Posteriormente, se realizó la inducción de la expresión de los genes clonados, mediante la incubación de los filtros sobre cajas de LB ampicilina con 1 mM de isopropiltio- β -galactósido (IPTG), durante 4 horas a 37°C (Sambrook, *et al.*, 1989). Los filtros fueron removidos y los productos génicos detectados inmunológicamente usando como primer anticuerpo una mezcla de 10 sueros de pacientes chagásicos crónicos, previamente absorbidos a *E. coli* DH5 α transformadas con pSPORT1.

Como segundo anticuerpo se usó un conjugado IgG antihumana acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma) y las señales fueron reveladas mediante adición del sustrato cloruro de nitroazul de tretazolium (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato sal disódica (BCIP). Finalmente, las señales positivas detectadas fueron aisladas, purificadas mediante dos rondas posteriores de tamizaje inmunológico y mantenidas en medio LB-glicerol a -70°C (Sambrook, *et al.*, 1989).

Caracterización de los clones

La caracterización de los clones se realizó mediante determinación del tamaño de los insertos clonados y secuenciación de nucleótidos de los mismos. Para ello, en primer lugar se extrajo el ADN de cada uno de ellos según la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook *et al.* (1989), con algunas modificaciones. Una vez obtenido el ADN plasmídico de cada uno de los clones, se realizaron digestiones de los mismos con las enzimas de restricción Sall y NotI (Gibco-BRL), para liberar los insertos y determinar su tamaño. 0.5 mg de ADN fueron digeridos al tiempo con ambas enzimas, utilizando el buffer "Multi-core" (Gibco-BRL) y una relación de unidades de enzima/mg de ADN a digerir, de diez, en un volumen final de reacción de 20 μ l, durante 3 horas (h) a 37°C. Finalmente, se

secuenciaron ambas hebras del ADN de los fragmentos clonados mediante la reacción de terminación de cadena de dideoxinucleótidos (Sanger, *et al.*, 1977), utilizando los cebadores M13 "forward" y M13 reverso. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un 373 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante los programas Translate Tool (ca.expasy.org/tools/dna.html), ScanProsite (ca.expasy.org/tools/scanprosite), FASTA (www.ebi.ac.uk/fasta33) y BLAST (www.ch.embnnet.org/software/bBLAST.html)

RESULTADOS

Tamizaje y aislamiento de clones recombinantes

El tamizaje de la librería se realizó con una mezcla de 10 sueros chagásicos crónicos, previamente absorbidos con bacterias DH5 α transformadas con pSPORT1. De los 1.000 clones examinados, se seleccionaron cuatro con base en su mayor intensidad de reactividad.

De modo que dichos clones (P1, P2, P3 y P4) fueron purificados tras dos rondas adicionales de tamizaje con la mezcla de sueros crónicos. Adicionalmente, no se observó reactividad de estos clones frente a los sueros control previamente absorbidos con *E. coli*, así como tampoco se observó reactividad de la mezcla de los sueros chagásicos crónicos frente a bacterias de *E. coli* transformadas con pSPORT1 (datos no mostrados).

Determinación del tamaño de los insertos

Una vez extraído el ADN del plásmido respectivo, se realizaron digestiones con las endonucleasas de restricción Sall y NotI. Tal como se muestra en la figura 1, los cuatro clones presentan fragmentos pequeños menores de 564 pb, llamando la atención que P2 (carril 3) y P4 (carril 5) presentan bandas del mismo tamaño.

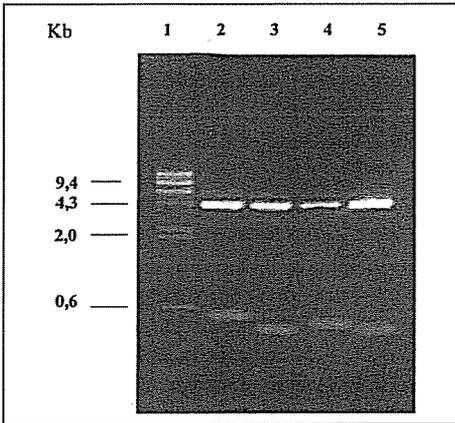


FIGURA 1. 1 mg de ADN de los clones P1 (2), P2 (3), P3 (4) y P4 (5), fueron digeridos con las enzimas NotI y SalI. Los fragmentos resultantes fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Como patrón de peso molecular (1) se utilizó ADN del fago lambda gt11 digerido con HindIII (Gibco-BRL).

Análisis de la secuencia de nucleótidos

Cada uno de los cuatro clones fue secuenciado en las dos direcciones 5'-3' y 3'-5' con los cebadores M13 "forward" y M13 reverso, cubriéndose la totalidad del inserto. Es así como en las figuras 2A, 2B y 2C se muestran las secuencias de P1, P2 y P3, respectivamente. La secuencia de P4 tal y como lo sugerían el tamaño de los clones y los mapas de restricción (datos no mostrados), resultó ser idéntica a la del clon P2.

Todos los clones se caracterizaron por tener insertos pequeños que codificaron para el extremo carboxilo terminal de su respectiva proteína, seguidos de la región 3' no traducida (3' UTR). Para el caso del clon P1, se encontró que éste codifica para 66 aminoácidos de una proteína que presenta motivos de unión a calcio, correspondientes a las proteínas "EF-Hand" (Strynadka y James, 1989). Adicionalmente, el producto codificado por el clon P1 presenta 5 sitios posibles de fosforilación, dos

de ellos dependientes de la proteína Cinasas C (aminoácidos 13-15 y 59-61, figura 3A) y los otros tres de la caseína Cinasas II (aminoácidos 23-26, 28-31 y 29-32, figura 3A).

Por su parte, P2 y P3 codifican para los últimos 31 y 59 aminoácidos de proteínas del parásito, respectivamente.

Vale la pena destacar en P3 la presencia de un sitio de fosforilación del tipo proteína Cinasas C (aminoácidos 34-36) y dos sitios posibles de miristilación (aminoácidos 30-35 y 34-36, figura 3B).

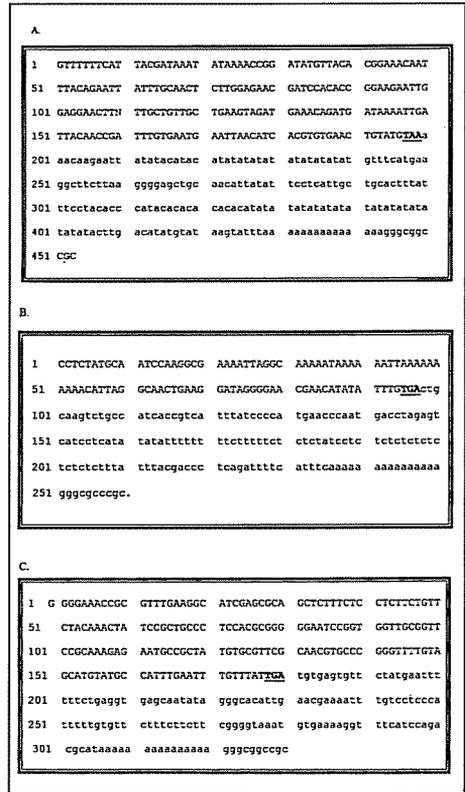


FIGURA 2. Secuencia de nucleótidos de los clones P1 (A), P2 (B) y P3 (C). En mayúsculas se denota la región codificante, y en minúscula la región no codificante. El codón de parada se encuentra resaltado y subrayado. N denota los nucleótidos que no pudieron ser identificados.

Adicionalmente, mediante los programas FASTA y BLAST (Altschul, *et al.*, 1997) se realizaron estudios de comparación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los clones recombinantes con las bases de datos de EMBL, GenBank, Swiss-Prot y KINETO (www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/index.html). Encontrándose con respecto a P1 una similitud altamente significativa con las secuencias de nucleótidos de proteínas de unión a calcio. Concretamente, un 99% de similitud con la proteína TCCBPA (EF-Hand 5 variante 1) y un 88% con la TCCBPB (EF-Hand 5 variante 2) de *T. cruzi* (Ajioca y Swindle, 1993) y 69% con la EF-H5 de *Trypanosoma brucei* (Wong, *et al.*, 1993). Como se muestra en la figura 4, TCCBPA y P1 son casi idénticos en su secuencia de nucleótidos. A excepción del sitio NotI presente en P1 (adicionado durante la construcción de la librería), una adición de una adenina en P1 y la sustitución de una timina por una adenina en P1. Mientras que a nivel de aminoácidos la secuencia compartida es idéntica.

Por su parte el análisis de los clones P2 y P3 no mostró homologías significativas con proteínas o genes previamente reportados en tripanosomátidos o en otros organismos eucariotes. Llama la atención no obstante, que estos clones presentan alrededor de un 60% de similitud con secuencias ESTs (Expressed sequence tags) del parásito. Es así como P2 muestra similitud con las secuencias con número de acceso al EMBL de AI078925 de *T. cruzi*, AL452882 y AL477450 de *T. brucei*. Mientras P3 presenta similitud con las secuencias con número de acceso AI664692, AI110377, AI668100, AI043481 y AI007354 de *T. cruzi*. Es importante destacar que la similitud de P3 con AI007354 es del 95%.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó el tamizaje de una librería de cDNA de *Trypanosoma cruzi* con una mezcla de sueros chagásicos

crónicos, con el objetivo de aislar clones codificantes para productos inmunológicamente relevantes. De los 1.000 clones examinados se seleccionaron cuatro basados en la mayor intensidad de reactividad presentada por los mismos.

De los cuatro, dos resultaron ser idénticos. Es decir, que dichos clones (P2/P4) se encuentran representados posiblemente más de una vez en el genoma o poseen niveles elevados de expresión en el estadio tripomastigote. Todo lo anterior está de acuerdo con el carácter repetitivo de los genes constitutivos de tripanosomátidos, los cuales en su mayoría forman agrupaciones en tándem y son regulados postranscripcionalmente (Thomas, *et al.*, 1993).

Por otra parte, la asignación del marco de lectura realizada para las secuencias de nucleótidos codificadas por estos clones, es respaldada por el hecho de que los tres clones contienen mayor porcentaje de adeninas y timinas en la región no codificante que en la codificante, mientras que el contenido de guaninas y citosinas es mayor en la región codificante que en la no codificante. Hecho observado en los genes constitutivos de tripanosomas (Porcel, *et al.*, 1996). Es así como, el clon P1 codifica para el extremo carboxilo terminal de una proteína de unión a calcio, la TCCBPA (Ajioca y Swindle, 1993), los clones P2 y P3 codifican parcialmente para proteínas "nuevas" del parásito, las cuales a diferencia de la mayoría de las proteínas halladas mediante tamizaje inmunológico, carecen, por lo menos en su extremo carboxilo terminal, de motivos repetidos de aminoácidos; los cuales por lo general enmascaran la respuesta contra los epítopes protectivos del parásito (Wrightsmann, *et al.*, 1994).

De otra parte, es importante tener en cuenta que en tripanosomátidos no se han detectado señales del sitio de poliadenilación tal como la secuencia AAUAAA de eucariotes superiores (Jackson y Standart, 1990). Por lo tanto,

no se puede asegurar que la región de poliadeninas al final de los clones estudiados sea efectivamente el sitio de adición del poli(A). Dicha región, puede simplemente constituir una zona rica en adeninas a las cuales se hibridó el iniciador poli(U) durante la construcción de la librería. Esta segunda opción parece ser lo correcto, al menos para el caso de P1, ya que la identidad de P1 con TCCBPA termina en el nucleótido 1159 de TCCBPA, y este gen continúa su 3'UTR hasta el nucleótido 1338. Es decir, TCCBPA tiene 179 pb más antes del sitio aparente en P1 de adición del poli (A).

Por otra parte, en cuanto al análisis teórico de modificaciones postraduccionales, se encontró por una parte que el clon P1 presenta 5 sitios posibles de fosforilación, dos de ellos dependientes de la proteína Cinasa C y los otros tres de la caseína Cinasa II. Por su parte, el clon P3 presenta un sitio de fosforilación dependiente de la proteína Cinasa C y dos sitios posibles de miristilaciones. La importancia de estas modificaciones radica en parte en que los grupos fosfatos asociados a cadenas peptídicas mediante enlace fosfodiéster son activadores proteicos que inducen cambios alostéricos en la proteína blanco, de manera que intervienen en diversos procesos celulares totales como la señalización intracelular (Bochart y Mottram, 1997). En este caso, llama la atención particularmente la presencia de los tres sitios de fosforilaciones dependientes de caseína Cinasa II, ya que esta enzima no ha sido descrita en tripanosomátidos, a diferencia de la proteína Cinasa C (Ser/Treo Cinasa) la cual ha sido detectada en epimastigotes de *T. cruzi* (Bochart y Mottram, 1997). No obstante, dada la presencia de actividad de la proteína Cinasa C en *T. cruzi*, es posible que la caseína Cinasa II también se encuentre entre las cinasas de este parásito.

Las miristilaciones por otra parte, involucran la adición del ácido graso mirístico de 14 carbonos mediante enlaces covalentes al N-terminal de un residuo de glicina (Godsel y

Engman, 1999). Esta modificación postraducciona está implicada en la asociación de algunas proteínas a la membrana celular, tales como la subunidad a de la proteína G y las tirosina Cinasas (Resh, 1993). Concretamente, en tripanosomátidos, se ha visto que el ácido mirístico hace parte del anclaje de glicofosfatidilinositol (GPI) de algunas proteínas como las VSGs (Glicoproteínas variantes de superficie) a la membrana celular del parásito (Colli y Alves, 1999).

Adicionalmente, vale la pena comentar como si bien otras proteínas que unen calcio descritas en *T. cruzi* (González, *et al.*, 1985, Engman, *et al.*, 1989, Ouaisi, *et al.*, 1992, Godsel, *et al.*, 1995), son reconocidas por sueros chagásicos crónicos; inducen la proliferación de linfocitos T (Taibi, *et al.*, 1993) y han sido ensayadas como marcadores de la infección en pruebas diagnósticas (Godsel, *et al.*, 1995, Krautz, *et al.*, 1995, Taibi, *et al.*, 1995); este es el primer reporte de reconocimiento inmune de la EF-H5 variante 1 de *T. cruzi*, por parte de los sueros chagásicos. Ubicándose en el extremo carboxilo terminal de la proteína (aminoácidos 144-210), la epítoto responsable de dicha reactividad.

Es importante destacar la presencia de los productos codificados por los clones P1, P2 y P3, en el estadio tripomastigote del parásito; fase parasitaria que se encuentra en contacto con el sistema inmune del huésped. Además, dado que estos productos son reconocidos por sueros chagásicos crónicos, mas no por sueros de personas no infectadas; se sugiere que las moléculas codificadas por P1, P2 y P3, pueden constituir marcadores asociados a la fase crónica de la enfermedad de chagas. Actualmente, en nuestro laboratorio se está llevando a cabo la búsqueda de los genes completos codificados por P2 y P3.

LITERATURA CITADA

ALJOCA, J. Y SWINDLE, J.T. *The calmodulin-ubiquitin associated genes from*

- Trypanosoma cruzi: *their identification and transcription*. Molecular and Biochemical Parasitology. 1993, 57: 127-136.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.M., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. Y LIPMAN, D.J. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Research. 1997, 25: 3389-3402.
- BOSHART, M. Y MOTTRAM, J.C. Protein phosphorylation and protein Kinases in Trypanosomatids. En: Hide, G., Mottram, J.C., Coombs, G.H. y Holmes, P.H. (eds.) *Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control*. Editorial Cab International, Wallingford, Reino Unido. 1997, 227-244.
- BRODSKYN, C.I., BARRAL, A., BULHOES M.A., SOUTO T., MACHADO, W.C. Y BARRAL-NETO, M. *Cytotoxicity in patients with different clinical forms of Chagas disease*. Clinical Experimental Immunology. 1996, 105: 450-455.
- COLLI, W. Y ALVES, M.J.M. *Relevant glycoconjugates on the surface of Trypanosoma cruzi*. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. 1999, 94: 37-49.
- COTRIM, P.C., PRANHOS, G.S., MORTARA, R.A., WANDERLEY, W., RASSI, A., CAMARGO, M.E. Y FRANCO DA SILVEIRA, J. *Expresion in Escherichia coli of a dominant immunogen of Trypanosoma cruzi recognized by human chagasic sera*. Journal of Clinical Microbiology. 1990, 28: 519-524.
- ENGMAN, D.M., KRAUSE, K.H., BLUMIN, J.H., KIM, K.S., KIRCHHOFF, L.V. Y DONELSON, J.E. *A novel flagellar Ca²⁺-binding protein in trypanosomes*. Journal of Biological Chemistry. 1989, 264: 18627-18631.
- FRASCH, A.C.C., AFFRANCHINO, J.L., IBÁÑEZ, C.F., REYES, M.B., MACINA, R.A., LUQUETTI, A.O., RASSI, A., ASLUND, L. Y PETTERSSON, U. *Analysis of cloned Trypanosoma cruzi proteins that are antigenic during the acute and chronic phase of Chagas disease*. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. 1989, 83: 345-346.
- GODSEL, L.M. Y ENGMAN, D.M. *Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism*. EMBO Journal. 1999, 18: 2057-2065.
- GODSEL, L.M., OLSON, C.L., LACAVA, Z.G.M. Y ENGMAN, D.M. *Comparison of 24 kDa flagellar calcium-binding protein cDNAs of two strains of Trypanosoma cruzi*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 1995, 42: 320-322.
- GONZÁLEZ, A., LERNER, T.J., HUECAS, M., SOSA-PINEDA, B., NOGUEIRA, N. Y LIZARDI, P.M. *Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Research. 1985, 13: 5789-5804.
- JACKSON, R.J. Y STANDART, N. *Do the Poly (A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation?* Cell. 1990, 62: 15-24.
- KRAUTZ, G.M., GALVAO, L.M. C., CANCADO, J.R., GUEVARA-ESPINOZA, A., OUAISSI, A. Y KRETTLI, A.U. *Use of a 24-Kilodalton Trypanosoma cruzi recombinant protein to monitor cure of human Chagas disease*. Journal of Clinical Microbiology. 1995, 33: 2086-2090.
- KERNER, N., LIGEARD, P., LEVIN, M.J., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi: Antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas disease cross-react with mammalian cytoskeleton*. Experimental Parasitology. 1991, 73: 451-459.

- LESENECHAL, M., DURET, L., CANO, M.I., MORTARA, R.A., JOLIVET, M., CAMARGO, M.E., DA SILVEIRA, J.F. Y PARANHOS-BACCALA, G. *Cloning and characterization of a gene encoding a novel immunodominant antigen of Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 1997, 87: 193-204.
- LEVIN, M.J., MESRI, E., BENAROUS, R., LEVITUS, G., SCHIJMAN, A., LEVY-YEYATI, P., CHIALE, P.A., RUIZ, A.M., KHAN, A., ROSEBAUM, M.B., TORRES, H.N. Y SEGURA, E.L. *Identification of mayor Trypanosoma cruzi antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease*. American Journal of Medicine Tropical and Hygiene. 1989, 41: 530-539.
- OUAISSI, A., AGUIRRE, T., PLUMAS-MARTY, B., PIRAS, M., SCHONECK, R., GRAS-MASSE, H., TAIBI, A., LOYENS, M., TARTAR, A., CAPRON, A. Y PIRAS, R. *Cloning and sequencing of a 24-kDa Trypanosoma cruzi specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibodies*. Biology of the Cell. 1992, 75: 11-17.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Chagas Disease and the nervous system*. Scientific Publication, No. 547. Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization. 527 Twenty third USA. 1994, 354.
- PORCEL, B.M., TRAN, A., TAMMI, M., NYARADY, Z., RYDAKER, M., URMENYI, T.P., RONDINELLI, E., PETTERSSON, U., ANDERSSON, B. Y ASLUND, L. *Gene survey of the pathogenic protozoan Trypanosoma cruzi*. Genome research, 2000, 10: 1103-1107.
- PORCEL, B.M., BONTEMPI, E.J., HENRIKSSON, J., RYDAKER, M., ASLUND, L., SEGURA, E.L., PETTERSSON, U. Y RUIZ, A.M. *Trypanosoma rangeli and Trypanosoma cruzi: Molecular characterization of genes encoding putative Calcium-binding proteins, highly conserved in trypanomatids*. Experimental Parasitology. 1996, 84: 387-399.
- RESH, M.D. *Interaction of tyrosine kinase oncoproteins with cellular membranes*. Biochimica and Biophysical Acta. 1993, 1155: 307-322.
- SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.T. Y MANIATIS, T. *Molecular cloning*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA. 1989.
- SANGER, F., NICKLEN, S. Y COULSON, A.R. *DNA sequencing with chain terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1977, 74: 5463-5467.
- STRYNADKA, N.C.J. Y JAMES, M.N.G. *Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins*. Annual Review of Biochemistry. 1989, 58: 951-998.
- TAIBI, A., GUEVARA-ESPINOZA, A., SHONECK, R., YAHIAOUI, B. Y OUAISSI, A. *Improved specificity of Trypanosoma cruzi identification by polymerasa chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein*. Parasitology 1995, 111: 581-590.
- TAIBI, A., PLUMAS-MARTY, B., GUEVARA-ESPINOZA, A., SHONECK, R., PESSOA, H., LOYENS, M., PIRAS, R., AGUIRRE, T., GRAS-MASSE, H., BOSSUS, M., TARTAR, A., CAPRON, A. Y OUAISSI A. *Trypanosoma cruzi. Immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity*. Journal of Immunology. 1993, 151: 2676-2689.
- TANOWITZ, H.B., KIRCHHOFF, L.V., SIMON, D., MORRIS, S.A., WEISS, L.M. Y WITHNER, M. *Chagas disease*. Clinical Microbiological Review. 1992, 5: 400-419.

- THOMAS, M.C., FERNÁNDEZ, A., MORO, A., GARCÍA-SALCEDO, A. Y GONZÁLEZ, A. BIOLOGÍA MOLECULAR DE TRIPANOSOMÁTIDOS. EN: RIVAS, L. Y LÓPEZ, M.C. (EDS.). *Parasitología molecular. Nuevas tendencias*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. 135-143.
- TIBBETTS, R.S., KIM, I.Y., OLSON, C.L., BARTHEL, L.M., SULLIVAN, M.A., WINQUIST, A.G., MILLER, S.D. Y ENGMAN, D.M. *Molecular cloning and characterization of the 78-Kilodalton glucose-regulated protein of Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity. 1994, 62: 2499-2507.
- UMEZAWA, E.S., SHIKANAI-YASUDA, M.A. Y STOLF, A.M.S. *Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-Trypanosoma cruzi antibodies from acute to chronic Chagas disease*. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 1996, 10: 407-413.
- WONG, S., MORALES, T.H., NEIGEL, J.E. Y CAMPBELL, D.A. *Genomic and transcriptional linkage of the genes for Calmodulin, EF-hand 5 protein, and Ubiquitin extension protein 52 in Trypanosoma brucei*. Molecular and Cellular Biology. 1993, 13: 207-216.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Control of Chagas' Disease*. WHO Technical Report Series No. 811. World Health Organization. Geneva. Switzerland. 1991.
- WRIGHTSMAN, R.A., DAWSON, B.D., FOUTS, D.L. Y MANNING, J.E. *Identification of immunodominant epitopes in Trypanosoma cruzi trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes*. Journal of Immunology. 1994, 153: 3049-3054.