

demostró que el tratamiento en el esquema propuesto: Es efectivo en más del 60% de los casos tratados. Es bien tolerado, y posible de ser implementado ambulatoriamente en niños residentes en área rurales. Aunque siempre los pacientes deben residir en viviendas bajo vigilancia entomológica y tener acceso al sistema de salud local para la supervisión médica. Es posible evaluar la efectividad con un marcador precoz, usando una molécula recombinante definida (F29), implementada a través de un rápido y simple procedimiento serológico (ELISA). Ofrece una buena oportunidad de tratar y obtener cura en las primeras décadas de la vida, reduciendo el riesgo del desarrollo de las lesiones viscerales de la fase crónica.

Funcionalidad de moléculas caracterizadas de protozoarios

MR7. Putative host cell receptors for tc-85 glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. MARIA JULIA MANSO ALVES.

Departamento de Bioquímica- Instituto de Química- USP, 05508-900, S. P.E-mail: mjmalves@quim.iq.usp.br

T. cruzi has to invade cells in order to survive in the mammalian host. As expected, much attention has been given to the identification of receptors and counter receptors involved in the interaction between both cells. Our laboratory described a monoclonal antibody (H1A10 MAb) able to inhibit the invasion of tissue-culture cells by *T. cruzi* (Alves *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 21, 75, 1986). H1A10 MAb recognizes a polymorphic 85 kDa surface glycoprotein from *T. cruzi* previously described as Tc-85 (Katzin & Colli, Biochim. Biophys. Acta 68, 208, 1983), suggesting its involvement in the invasion process. Tc-85 has a half-life of 3.5-4 h and is synthesized as a 95 kDa precursor (Abuin *et al.*, Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 335, 1996). Heterogeneity in molecular mass, isoelectric point and carbohydrate composition were identified (Abuin *et al.* Mol. Biochem. Parasitol. 35, 229, 1989; Couto *et al.* Mol. Biochem. Parasitol. 26, 145, 1987; Couto *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 39, 101, 1990). Tc-85 has a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Couto *et al.*, Eur. J. Biochem. 217, 597, 1993) and is shed into the medium within membrane vesicles, bearing an acyl-inositol modified anchor (Abuin *et al.*, Exp. Parasitol. 80, 605, 1996). The shedding mechanism is still unknown.

Cloning and characterization of a full length genomic DNA allowed us to include Tc-85 into the Sialidase/Trans-sialidase supergene family, with other members without enzymatic activity. Also, the epitope recognized by H1A10 MAb could be identified by competition assay with synthetic peptides. Sequencing of different clones showed heterogeneity among them, including the encoding region of the epitope recognized by H1A10 MAb. The data led us to propose that all members belong to a gene family, the so called Tc-85 gene family.

Tc-85 glycoproteins show a large pI range but only the acid portion binds in a carbohydrate-independent way to laminin, an important component of basal membrane (Giordano *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 65, 85, 1994). Anti-idiotypic antibodies (Id) raised against the Tc-85 monoclonal antibody recognize three polypeptides in the host cell (150-130, 73 and 43 kDa). Also the anti-Id antibodies do not react with laminin, suggesting that Tc-85 interacts with different host receptors. Anti-Id antibodies react with tissue culture cells, as well as with molecules present in liver, heart, muscles or spleen, an interesting observation, since *T. cruzi* invades different tissues in the mammalian host. The cloning of putative host cell receptors is being pursued to further characterize host-parasite interactions. Supported by: FAPESP, PADCT/CNPq

MR8. Estructura, antigenicidad y posibles funciones de la cruzipaina, la cisteína proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi*. J.J. CAZZULO, V. DUSCHAK, F. PARUSSINI, C. LABRIOLA Y J. MARTÍNEZ.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín. C.C. 30, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina. jcazzulo@inti.edu.ar

La cruzipaina es la cisteína proteinasa (CP) principal presente en el *Trypanosoma cruzi* (1). Su expresión está regulada durante el desarrollo y diferenciación, siendo los niveles en epimastigotes entre uno y dos órdenes de magnitud más altos comparados con las otras formas del parásito. La enzima está codificada por un número elevado de genes dispuestos en tandem (hasta 130 en la cepa Tul 2), localizados en dos a cuatro cromosomas, en diferentes stocks del parásito. La cruzipaina madura (una vez procesados el péptido señal y el dominio pro-) consiste de una parte catalítica, estructurada en dos dominios que dejan entre ellos el surco del sitio activo, y que presenta alta homología con otras CPs pertenecientes a la familia de la papaina, como las catepsinas S y L, y un dominio C-terminal (C-T), homólogo con el de las CPs de Tipo I (según la clasificación de Coombs y Mottram) presentes en varios otros Trypanosomatidos. El C-T, que puede ser purificado después de auto-proteólisis, contiene modificaciones post-traduccionales (N-glicosilación, pudiendo presentarse cadenas de alta manosa, híbridas monoantennarias o complejas biantennarias en el mismo residuo de Asn; probablemente cuatro puentes disulfuro; y modificaciones aún no identificadas en siete residuos de Thr, las cuales no parecen ser fosforilaciones ni O-glicosilaciones. Evidencias muy recientes sugieren la posible presencia de O-glicosilación, probablemente en otros residuos de Ser/Thr). El clonado y secuenciación de 34 cDNAs obtenidos de epimastigotes de Tul 2, así como de 14 cDNAs obtenidos a partir de las cuatro formas del parásito (cepa RA) indica la expresión simultánea de diferentes genes con polimorfismos en el C-T, que se traducen en cambios de residuos de aminoácidos que alteran el pI de la

molécula. Probablemente ambos factores, expresión simultánea de diferentes genes y variación en las modificaciones post-traduccionales, son responsables de las heterogeneidades en carga y tamaño aparente encontradas en preparaciones enzimáticas naturales. A esto debe sumarse la presencia de isoformas ligadas a la membrana plasmática, presumiblemente a través de un ancla de glicosil fosfatidil inositol (GPI), y de isoformas no glicosiladas o con un patrón de glicosilación muy diferente, pues no interactúan con Concanavalina A.

El C-T es responsable de la inmunoreactividad de la cruzipaina, que es un antígeno inmunodominante en la enfermedad de Chagas crónica. La inmunización de conejos con la enzima nativa conduce a la producción de anticuerpos dirigidos casi exclusivamente contra el C-T, en tanto que la inmunización con cruzipaina desnaturalizada induce, además, la producción de anticuerpos contra la parte catalítica.

Entre las funciones posibles de la cruzipaina podemos mencionar: (1) digestión proteica intralisosomal, encontrándose presente en los reservorios; (2) penetración del parásito en la célula huésped, en la que podrían estar involucradas las isoformas de membrana; (3) defensa del parásito contra el sistema inmune del huésped, a través de un proceso de «fabulación»; (4) participación en las etapas de diferenciación en el ciclo biológico del parásito, que pueden ser bloqueadas por inhibidores irreversibles específicos para CPs, los cuales son capaces de inhibir a la cruzipaina dentro de los parásitos vivos. Financiado por SAREC (Suecia), el TDR/WHO y la Universidad de Buenos Aires.

(1) Cazzulo, J. J., Stoka, V. & Turk, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the Protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.* 378 (1997) 1-10.

MR9. Anclaje de glicoproteínas por glicoinositolfosfolípidos y diferenciación en *Trypanosoma cruzi*. ROSA M. DE LEDERKREMER.

CIHIDECAR. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

El anclaje de proteínas a membrana por un glicoinositolfosfolípido (GPI) es particularmente frecuente en protozoarios parásitos. En *T. cruzi*, se identificó este tipo de anclaje en glicoproteínas caracterizadas en distintos estadios del parásito; algunas de ellas involucradas en el proceso de infección. Es interesante que mientras en glicoproteínas de mamíferos y también en *Trypanosoma brucei* se describió un glicerolípido como componente del ancla, en algunas glicoproteínas importantes de *T. cruzi*, se identificó una ceramida. Ssp4 es una glicoproteína marcadora de la diferenciación de tripomastigotes a amastigotes. Se ha demostrado por criterios inmunológicos y morfológicos que este proceso puede ocurrir *in vitro* (Andrews *et al* 1987, *Exp. Parasitol.* 64, 474-484). Ssp4 se libera progresivamente al medio por acción de una fosfolipasa C endógena específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) durante la diferenciación de amastigote a epimastigote (Andrews *et*

al, 1988, *J. Exp. Med.* 167, 300-314). Recientemente determinamos los lípidos libres que se biosintetizan en parásitos obtenidos después de 0, 24, 48 y 72 h de diferenciación de tripomastigotes seguida de incorporación de [³H]-palmitico por 2 h. Encontramos un máximo de ceramida libre a las 24 h, coincidente con el máximo de formas amastigote. Sólo trazas de ceramida estaban presentes en tripomastigotes. Se determinó que el lípido del ancla de Ssp4 es también una ceramida de la misma estructura, la palmitoildihidroesfingosina, lo cual confirmaría que la ceramida libre se origina en el proceso de liberación de la Ssp4 al medio (Bertello *et al*, 1996, *Mol. Biochem. Parasitol.* 143-151). Este resultado abre la posibilidad de que la ceramida juegue un papel importante en la diferenciación y proliferación celular como se había sugerido para células de mamífero. Relacionado con esto habíamos encontrado que PI-PLC bacteriana no sólo libera glicerolípidos de los glicoinositolfosfolípidos sino también ceramida en el caso de glicoinositolfosfoceramidas (Lederkremer *et al* 1990, *Eur. J. Biochem.* 192, 337-345). La enzima endógena de *T. cruzi* tampoco discrimina el lípido ya que incubando inositolfosfolípidos constituidos por ceramida o un glicerolípido, se libera en los dos casos el lípido por incubación con membranas de *T. cruzi*. (Bertello *et al*, trabajo en realización). Por otra parte, la transsialidasa de formas tripomastigote (Pollevic *et al* 1991, *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 247-250) está anclada por un GPI constituido por dos lípidos diferentes, liso-1-O-hexadecilglicerol y N-palmitoildihidroesfingosina, con preponderancia de la ceramida (Agusti *et al*, 1997, *Glycobiology*, en prensa). Liso-1-O-hexadecilglicerol es el componente lipídico del ancla de la glicoproteína Tc85 de tripomastigotes. Encontramos que la Tc85 se libera al medio con el ancla glicolípida lo cual indica que en el «shedding» no interviene una PI-PLC, sino que se liberaría formando parte de vesículas (Abuin *et al*, 1996, *Exp. Parasitol.* 82,290-297). Es interesante que en las mucinas, que serían las glicoproteínas aceptoras de ácido siálico se encontró que cuando los epimastigotes diferencian a tripomastigotes metacíclicos el lípido del ancla glicolípida cambia de 1-O-hexadecil-2-O-palmitoilglicerol a ceramida mientras que el oligosacárido no se modifica (Acosta Serrano *et al*, 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 27244-27253). Dado que la mayoría de las mucinas de metacíclicos son liberadas por el parásito durante la invasión celular los autores sugirieron que este fenómeno estaría relacionado con un remodelamiento del lípido. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que Ssp4 de amastigotes y la transsialidasa (SAPA) de tripomastigotes también tienen ceramida en el lípido del ancla. Sin embargo, también en epimastigotes, el glicoconjugado más importante de la superficie que es el lipopéptidofosfoglicano (LPPG) contiene una ceramida cuando se obtiene de parásitos en la fase estacionaria de crecimiento (4-5 días) pero se determinó 1-O-hexadecil-2-O-palmitoilglicerol en el LPPG aislado de parásitos en la fase logarítmica (2 días) (Lederkremer *et al*, 1993, *Eur. J. Biochem.*). El LPPG, cuya estructura está bien caracterizada es el primer glicoinositolfosfolípido purificado, que presenta gran homología con las anclas de proteínas de membrana de