

CONTRIBUCION DEL PROYECTO GENOMA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* A LA COMPRENSION DE LA PATOGENESIS DE LA CARDIOMIOPATIA CHAGASICA CRONICA

MARIANO J. LEVIN¹

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, (INGEBI, FCEyN UBA-CONICET), Buenos Aires

Resumen El proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi* (PGTc) es una iniciativa multinacional desarrollada dentro del marco de dos organizaciones internacionales OMS/TDR y CYTED. Debe considerarse como una herramienta de sumo valor para el estudio de diversos aspectos de la enfermedad de Chagas. Pone a disposición de investigadores básicos y clínicos una gran cantidad de información sobre los genes expresados por el parásito (ver base de datos de PGTc, <http://gene.dbbm.fiocruz.br>) y una importante cantidad de bibliotecas genómicas y sondas de genes expresados (ESTs). Presentamos cuatro ejemplos sobre el uso de este material en el estudio de la patogénesis de esta infección crónica. 1) Demostramos la posibilidad de derivar antígenos a partir de ESTs, tarea de relevancia para comprender la reactividad anti-receptores cardíacos presente en el suero de pacientes chagásicos. 2) Introducimos los conceptos de proteoma, vacunoma y patonoma, conjunción de técnicas necesarias para analizar la información que surge del PGTc. 3) Demostramos cómo las regiones ya secuenciadas del genoma dan claves sobre el carácter dinámico y flexible del mismo, y por último 4) mostramos cómo la información del PGTc puede ser utilizada para estudiar el ADN del parásito asociado a la lesión cardíaca crónica.

Abstract *Contribution of the Trypanosoma cruzi Genome Project to the understanding of Chagas disease pathogenesis.* The *Trypanosoma cruzi* Genome Project (TcGP) is developed by a consortium of laboratories brought together by two international agencies, WHO/TDR and CYTED. The TcGP is an important tool for the study of Chagas disease. It provides researchers and clinicians with information about expressed parasite genes (see TcGP database, <http://gene.dbbm.fiocruz.br>) and with an important number of genomic libraries and probes (ESTs). We show with four examples how the TcGP contributes to the understanding of the pathogenesis of this infection. 1) We demonstrate how to derive antigens from ESTs, an important feature regarding the generation of anti-cardiac receptor antibodies in chagasic patients. 2) We introduce concepts such as proteome, vaccinome and pathonome that include all techniques needed to analyze quickly the growing amount of genomic information. 3) We show that the genomic regions that have been already sequenced give clues as to the plastic nature of the parasite nuclear genome. Finally, 4) we show how the genome sequences can be used to study the parasite DNA that is associated to the cardiac lesions.

Key words: Chagas disease, inverse antigens, anti-cardiac receptor antibodies, SIRE associated sites, heart biopsies

El proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi* (PGTc) surgió en 1993 como resultado de la conjunción de varios factores, entre los cuales se destacan tres: a) los avances en el campo del proyecto genoma humano producto del trabajo de un equipo de investigadores franceses dirigidos por el Dr. Daniel Cohen¹, b) el deseo de un grupo importante de científicos latinoamericanos de incorporar las técnicas genómicas al estudio del *T. cruzi*, y c) el encuentro de los mismos con el Dr. Daniel Cohen y un numeroso grupo de investigadores franceses, en las Jornadas Franco-Latinoamericanas sobre los Avances de la Investigación Biomédica: Diagnóstico Molecular, Terapia Génica y Proyecto Genoma Humano realizadas

el 23 y 24 de noviembre de 1993 en la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina.

Hacia fines de 1993 Cohen y sus colaboradores demostraron la factibilidad de un enfoque de genoma total para la construcción del mapa físico del genoma humano¹. Para conseguirlo utilizaron técnicas de automatización sobre una biblioteca de grandes fragmentos de ADN obtenidos a partir del ADN genómico aislado de glóbulos

¹Son autores de este trabajo

Instituto de Investigaciones en Ingeniería y Biología Molecular, INGBI, FCEyN UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina; # Deutsches Rheuma Forschungszentrum, Berlín, Alemania; + Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", Granada, España. Sergio Ghio, Fernando Elías**, Pablo López Bergami*, Hernán Lorenzi*, Evelina Mahler*, Claudia Ben-Dov*, Juan Burgos*, Francisco Quintana*, Romina Volcovich*, Martín Vázquez*, Alejandro Schijman*, Gabriela Levitus*, Claudia Berek#, Antonio González* y Mariano J. Levin*.

blancos de un individuo. Durante las Jornadas Franco-Latinoamericanas el Dr. D. Cohen propuso una técnica semejante para comenzar el PGTc, tarea que comenzó en febrero del año siguiente^{2,3,4,5}. Esta y otras iniciativas fueron coordinadas por dos redes internacionales de laboratorios, las del CYTED y OMS^{2,4,6}, que cooperaron para construir las primeras bibliotecas genómicas, comenzar la secuencia en gran escala de marcadores derivados de genes expresados en el estadio epimastigote del parásito (ESTs, expressed sequence tags), y para construir el banco de datos del proyecto⁷.

En esta comunicación se presentan cuatro ejemplos que demuestran cómo el material y la información surgidos del PGTc aportan a la respuesta de preguntas sobre la inmunopatología de la enfermedad de Chagas, o sugieren nuevas formas para encararlas.

1. Reactividad anti-receptores cardíacos de pacientes chagásicos y antígenos de *T. cruzi* obtenidos a partir de ESTs (IA, inverse antigens)

En el año 1992, en colaboración con el Dr. Johan Hoebeke IBMC, Strasbourg, Francia, detectamos por primera vez en pacientes chagásicos la existencia de anticuerpos que reaccionaban con el segundo dominio extracelular del receptor β_1 adrenérgico⁸. Simultáneamente, uno de nosotros, MJL, descubrió la existencia de homología entre un pentapéptido, AESEE, de la región C-terminal del antígeno ribosomal P0 de *T. cruzi* y un pentapéptido, AESDE, presente en el mencionado dominio extracelular. Desde esa fecha en adelante nos abocamos, junto con los médicos del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina y varios equipos colaboradores, a la caracterización de las reacciones anti-receptores cardíacos en la enfermedad de Chagas^{8,9,10,11,12,13,14,15,16,17}. Del

conjunto de los resultados se desprende que este tipo de auto-reactividad es provocada por anticuerpos anti-epítopes parasitarios que tienen baja afinidad por los receptores cardíacos¹³. Los primeros epítopes parasitarios que inducen anticuerpos con propiedades auto-reactivas funcionales han sido caracterizados, y se encuentran en las regiones C-terminales, ricas en glutámico y aspártico, de las proteínas ribosomales TcP0, y TcP2 β de *T. cruzi*, ver Fig. 1^{10,12,13}. Sin embargo la variedad y el polimorfismo de la respuesta anti-receptores cardíacos en pacientes chagásicos son tales¹², que resulta difícil explicarlas como producto de la acción de anticuerpos dirigidos sólo contra dos proteínas, por más antigénicas que sean. Esto nos llevó a postular la existencia de otros antígenos parasitarios ricos en residuos ácidos. Inicialmente propusimos que éstos deberían tener trechos de hasta 20 o más glutámicos y/o aspárticos seguidos¹⁸. Sin embargo, luego de dos años de rastrear diferentes bibliotecas de expresión con sueros de pacientes chagásicos no pudimos detectar ningún antígeno con estas características.

Ante este fracaso, decidimos recurrir a los útiles generados por el PGTc buscando secuencias de EST que pudieran codificar para un péptido con las características mencionadas. Finalmente, en la colección de ESTs del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", Granada, España, encontramos un EST que codificaba un péptido con varias seguidillas de aminoácidos ácidos, Fig. 2. Para probar su antigenicidad se intentó expresar el producto de este EST en bacterias, pero probablemente por su acidez extrema esto no fue posible¹⁹. Indirectamente esto indica por qué no se pueden aislar este tipo de péptidos en rastreos inmunológicos convencionales, y demuestra la utilidad del PGTc al proveer colecciones extensivas de genes parasitarios.

Ante esta dificultad, la única solución fue expresar (Fig. 2) en el contexto del gen entero. Para ello usamos el EST como sonda para rastrear la biblioteca de cósmidos del PGTc⁴. Esto permitió identificar un fragmento

Secuencias derivadas del segundo dominio extracelular de los receptores cardíacos

β_1 : HWWRAAESEDEARRCYNDPKCCDFVTN
 β_2 : HWYRATHQEAINCYANETCCDFNTQ
 M2: VRTVEDGECYIQFFSNAAVTFGTAI

Secuencias derivadas del extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*:

TcP2 β : EEEEDDMGFGLFD
 TcP0: AESEEDDDDFGMGALF

Fig. 1.— Secuencias aminoacídicas de los segundos dominios extracelulares de los receptores cardíacos humanos y de los epítopes C-terminales de las proteínas ribosomales TcP0 y TcP2 β ^{8,9,10,11,12,13}. Estos últimos inducen anticuerpos que poseen la propiedad de reaccionar con los receptores cardíacos^{10,12,13}.

EST que codifica un péptido rico en residuos ácidos

```

1  V K A A A T A A E D D D D D E E E E E E E A D G V D A V
29  G E E A A E E E E N E E E E E E E E V K P A R G G K Q
57  K S A A A K H K T D T V N E D E E N E E V E E E E E E
85  E E D E E Q K A G N G E E E D D E E Q E E E E E A P R E
113 P P T I S G N S R R H S S P A P V K G R S A R G G A H P
141 A E D A K K M R E K D E E Y D G E G D G D E P P R Q V Q
169 H V Q Q R A P P L R R T S H A G K R A P P P P P P A A
197 S G D D N D D D D D A S D A D D N K E E E V H A Q P Q S
225 Q Q H
    
```

Fig. 2.- Secuencia del péptido ácido derivado de la colección de ESTs del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" (Granada, España). Se resaltan en negro los residuos ácidos (E: ácido glutámico y D: ácido aspártico).

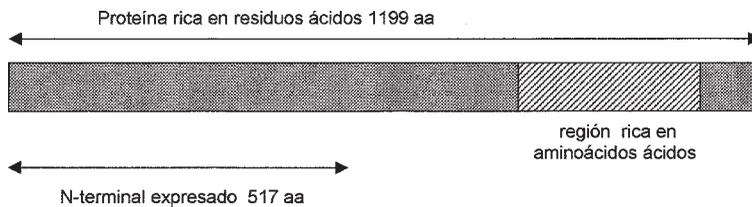


Fig. 3.- Esquema que muestra la localización de la región ácida en PA. Las flechas indican los péptidos expresados y usados para evaluar la reactividad anti-PA de sueros chagásicos.

genómico positivo a partir del cual se obtuvo el gen completo, que codifica para una proteína de PM 130 kDa que denominamos proteína ácida, o PA. La secuencia de aminoácidos de PA estableció que la región ácida derivada del EST se encuentra en la región C-terminal de la proteína. A diferencia del fragmento ácido, la proteína completa se expresó en bacterias (ver esquema en la Fig. 3). También se expresó el fragmento correspondiente al extremo N-terminal, Fig. 3. El análisis de Western blots demostró que la PA es antigénica en pacientes con enfermedad de Chagas, y que la antigenicidad se encuentra confinada al extremo C-terminal de la proteína, ya que los sueros no reconocen el fragmento N-terminal.

En resumen, este ejemplo demuestra la utilidad del PGTc que puso a nuestra disposición colecciones de EST, y de cósmidos que fueron usadas para obtener el gen PA, luego expresarlo y demostrar su antigenicidad (Fig. 4). El procedimiento empleado para encontrar este antígeno es el inverso del que usamos clásicamente²⁰ ya que primero se predijo la antigenicidad de un péptido parasitario, y recién después de clonar el gen entero se demostró que era antigénico en la enfermedad; por esta razón denominamos a este tipo de antígenos "inverse antigens" (IA)²¹.

Queda por demostrar si los anticuerpos inducidos por PA tienen alguna acción sobre los receptores cardíacos.

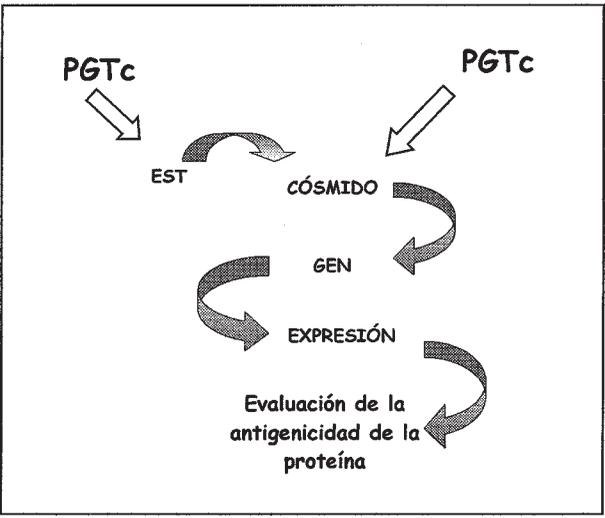


Fig. 4.- Esquema de la utilización de ESTs y bibliotecas genómicas del PGTc en la búsqueda de IA (inverse antigens). El EST proviene de la colección de ESTs del PGTc y el cósmido de la biblioteca que se menciona en Zingales *et al.*⁴.

Un esquema semejante al que utilizamos para evaluar la actividad funcional de los anticuerpos inducidos por la proteína TcP2β será usado también en este caso²².

2. Proteoma, Vacunoma, Patonoma

Para analizar rápidamente la información procedente de los proyectos genoma se han comenzado a implementar técnicas de análisis que combinan la información experimental en un campo dado con el cúmulo de datos aportados por el proyecto genoma correspondiente. En el caso de analizar el comportamiento de la dotación proteica de una célula para identificar proteínas que existen o desaparecen ante un estímulo determinado, se combinan las técnicas de electroforesis bidimensional (EBD), con el análisis por espectroscopia de masa de las proteínas identificadas por EBD, y con la información de los bancos de datos del proyecto genoma correspondiente, en lo que se denomina Proteoma (Fig. 5). Un esquema de combinación de técnicas también se podrá aplicar para estudiar la patogénesis de la enfermedad de Chagas una vez que el genoma de *T. cruzi* esté completamente secuenciado, ver Patonoma en la Fig. 5. Entretanto se puede prever cómo podría plantearse un estudio semejante. En colaboración con el equipo del Dr. Franco da Silveira (ESP, São Paulo, Brasil) hemos construido un mapa físico de un tercio de la banda cromosómica XVI del genoma nuclear de *T. cruzi*²³ sobre el que ubicamos 112 genes. ¿Cómo hacer para rastrear la capacidad patogénica de alguna o de todas las proteínas codificadas por estos genes? ¿Cómo hacer para analizar la capacidad inmunoproliférica de alguna o de varias proteínas codificadas por estos genes (Vacunoma en Fig. 5)?

La complementación de técnicas que conforman el patonoma y el vacunoma nos permiten adaptar lo conocido para el análisis de un gen a la masividad de la información genómica. Así, una vez identificados los genes completos se amplificarán usando las técnicas de amplificación génica, y se clonarán en plásmidos vacunantes aptos para dirigir la expresión de los genes parasitarios en células de mamíferos²⁴.

Estos plásmidos permiten a) inmunizar ratones con un mínimo de costo operativo en comparación con las inmunizaciones convencionales, b) inmunizar con "pool" de plásmidos y c) evaluar rápidamente sus consecuencias, ya sea en estudios de patogénesis como en los relacionados con inmunoprotección. En el campo de la patogénesis la inmunización con plásmidos se podrá seguir por monitoreo electrocardiográfico²², mientras que en el caso del estudio inmunoproliférico, se evaluará la capacidad protectora del o los antígenos inmunizantes²⁴.

3. SIRE y SAS, marcadores genéticos de *T. cruzi* que revelan un genoma dinámico

Entender la capacidad adaptativa del genoma parasitario es fundamental para el análisis de la patogenia de la infección. Uno de nuestros aportes al PGTC ha sido la caracterización de una serie de marcadores genéticos que han resultado claves para la interpretación de una serie de estudios genómicos^{25, 26} y para el análisis de los resultados de secuenciación en gran escala²⁷.

El primer marcador genético que describimos fue un elemento repetitivo de 428 pb llamado SIRE, short interspersed repetitive element, Fig. 6²⁸. Se usó para caracterizar cromosomas y en el clonado de grandes fragmentos genómicos^{5, 29}. Como está polidisperso en el genoma nuclear decidimos utilizarlo como base para definir una serie de nuevos marcadores: las secuencias asociadas a SIRE, SAS³⁰. Los SAS se conocen también como SZ y uno fue llamado VIPER. Todos ellos fueron depositados en el banco de datos del PGTC a medida que fueron secuenciados y/o analizados.

Además de contribuir a la identificación de determinadas bandas cromosómicas^{23, 29}, VIPER y SIRE fueron fundamentales en el análisis del primer continuo de 90 000 pb de *T. cruzi* que fue secuenciado²⁷. Esta región

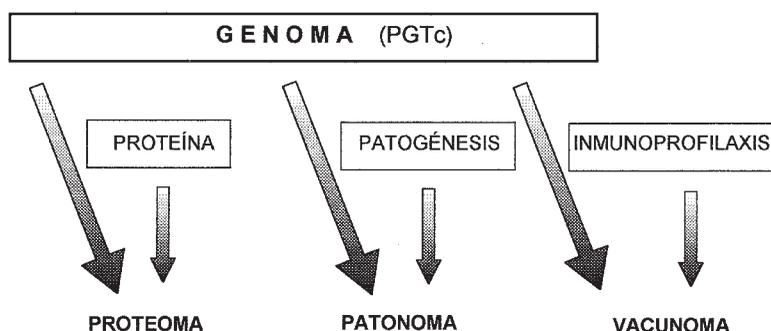


Fig. 5.— Conceptos de proteoma, vacunoma y patonoma, conjunción de técnicas necesarias para analizar la información que surge del PGTc.

SIRE 428 pb

```

1  AGGAGCTTGT  GAAAAGAATG  ATCGTGGGAG  AGCTGGCTAA  CTTAATTAAT
51  GTATGTGTAT  ATCCTGATAA  ATGAATGCAT  TC'TTTATGAT  ACTTTCTACC
101 GTATGAATCT  TTTGGGAAGA  ACGCGACTTT  GTAGGGGCGG  GAGCCGATAG
151 AGGCCAGATA  ATATTTTAA  TTTTATTTTG  CCATCCCACC  CACCCCTTG
201 ATTCCACCA  CGCGCGGGG  TCTTGTTGTT  GGAGGACCCC  AAAGTCTGCC
251 ACTTCGTAAG  TAATAATATT  TCAAATCCCA  ACTGAGGACA  AAGGACCATG
301 CTAATGGTCC  ACAGAATTCT  ATATATTGAA  TGAGAATAAA  ACATTGAGGC
351 AATTAATAA  AGAACCTTTT  TTCCTAACTT  GTTGGTTTC  CATAGATAAT
401 TTCAGGATCC  GGCCAGCTGC  CCGGAGGA

```

Fig. 6.— Secuencia nucleotídica de SIRE, short interspersed repetitive element, tal como se describió en Vázquez *et al.* 1994²⁸.

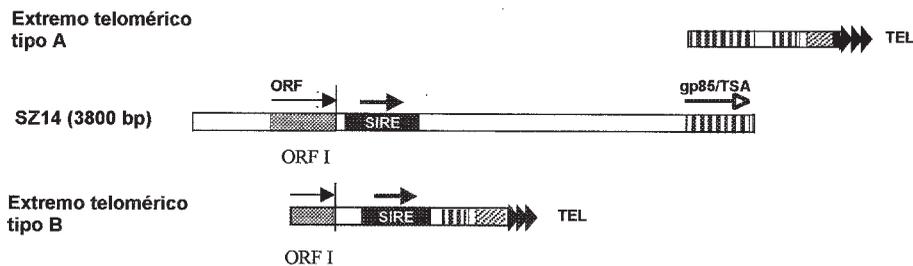


Fig. 7.— Los 2 tipos de telómero de *T. cruzi* ordenados sobre el marcador SZ14. Este diagrama esquematiza la hipótesis que implica a los extremos teloméricos que contienen a SIRE y al ORF1, presente también en marcador SZ23, como sitios de expresión^{26, 30}.

pertenece al cromosoma 3, de aproximadamente 0.5 Mb. Dentro de la misma, VIPER marca un cambio en la orientación del sentido de la transcripción de los genes²⁷.

Recientemente un equipo norteamericano identificó una proteína de superficie llamada VP85 como factor de virulencia parasitario²⁵. Al comparar sus secuencias descubrieron que dos SAS eran miembros de esta familia de genes. Lo que equivale a decir que algunos miembros de esta familia están asociados a SIRE. Mientras que el equipo del Dr. J.L. Ramírez (USB, Caracas, Venezuela) describió la presencia de SIRE y el SAS SZ23 (ORF1) en los telómeros, Fig. 7²⁶. El conjunto de nuestros resultados nos llevan a sugerir que SIRE y SZ23 definirían una región de expresión de ciertos telómeros³⁰. Dentro de esta hipótesis SIRE podría mediar, por recombinación homóloga, el desplazamiento de genes de proteínas de superficie, tales como VP85, hacia sitios de expresión teloméricos.

En definitiva el conjunto de los resultados analizados^{25, 26, 27, 30} sugiere que el genoma de *T. cruzi* es más dinámico de lo que, a veces, el mismo PGTc induce a pensar. En la composición del genoma de este parásito se es-

conden las bases de los mecanismos adaptativos que le permiten colonizar un individuo. Quizás el PGTc sea importante porque provee una información marco que permitirá estudiar el genoma que más nos interesa, el del parásito que infecta y produce la lesión.

4. Resultado del estudio simultáneo de dos genomas

Hace varios años que demostramos la factibilidad de estudiar el genoma humano y el genoma del parásito a partir de tejido cardíaco obtenido de necropsias de pacientes³¹. Inicialmente el estudio se restringía a amplificar genes humanos, β globina, y regiones variables del minicírculo del parásito³¹. Actualmente trabajando con biopsias y utilizando técnicas de micromanipulación se puede llegar a obtener material genético de hasta una célula y secuenciarlo³². En colaboración con el Dr. R. Laguens y su grupo en Fundación Favaloro (Buenos Aires, Argentina) usamos esta técnica para analizar biopsias cardíacas de pacientes chagásicos que presentaban un infiltrado inflamatorio leve.

El análisis histológico no reveló presencia *T. cruzi*. Sin embargo, micromanipulando diversas regiones, preparando el ADN correspondiente y realizando reacciones de amplificación génica anidada, o de nested PCR, se lograron amplificar diversas regiones variables de minicírculo del parásito que fueron secuenciadas. Las secuencias presentaron una gran variabilidad y se reconocieron como pertenecientes a minicírculo por su muy bajo contenido en citidinas, menor al 5%³³. También se pudieron amplificar secuencias de SIRE, que luego de su secuenciación sólo presentaron una mutación con respecto a la secuencia de la Fig. 6.

La micromanipulación también permite analizar el genoma del paciente. Dado nuestro interés en los anticuerpos que se producen en los sitios de la lesión cardíaca, estudiamos las regiones variables de los genes que los codifican. Esto permitió en principio, el análisis de las mutaciones somáticas de las regiones variables de las inmunoglobulinas, y permitirá en un futuro próximo, el clonado del anticuerpo correspondiente para analizar su especificidad. La gran cantidad de mutaciones acumuladas en las regiones variables de los anticuerpos indica que las células plasmáticas presentes en la lesión han estado activadas desde mucho antes del momento de la biopsia.

Las técnicas de micromanipulación ofrecen una nueva forma de encarar el estudio de la lesión cardíaca del enfermo chagásico. En la medida en que se puedan identificar regiones del genoma de *T. cruzi* implicadas en diversos aspectos de su ciclo de vida, éstas se podrán caracterizar en el genoma del parásito que se encuentra en la lesión.

A modo de conclusión, estos ejemplos demuestran que el PGTc aporta información, almacenada en la base de datos del proyecto, y material, bajo forma de bibliotecas y marcadores, que sirven para encarar los estudios en el campo de la enfermedad de Chagas con más y mejores herramientas. La complejidad de esta infección crónica nos impulsa a utilizarlas.

Agradecimientos: Agradecemos la muy eficiente tarea de la bioquímica Cecilia Medrano y la técnica Mariana Catalani en el PGTc. Este trabajo contó con el apoyo de UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; European Commission contract 936018 AR; Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED); ICI (Madrid, España); Project genome *T. cruzi* INGEBI-Foundation Jean Dausset-CEPH (95-97); Proyectos de investigación de la UBA; Programa Genoma de *T. cruzi* asociado al proyecto genoma humano de la UBA, Proyecto Genoma de *T. cruzi* del CABBIO (96-98); CONICET y FONCYT BID 802/OC-AR PICT 01421 y PICT 02030. MJL es becario de John Simon Guggenheim Memorial Foundation (98-99).

Bibliografía

1. Cohen D, Chumakov I, Weissenbach J. A first-generation physical map of the human genome. *Nature* 1993; 336: 698-701.
2. Levin MJ, Ferrari I, Vázquez M, et al. Toward the physical map of the *Trypanosoma cruzi* nuclear genome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89-Suppl.: 17-8.
3. Brandáriz S, Ferrari I, Saumier M, et al. The *Trypanosoma cruzi* genome project: Genome Sequence Sampling (GSS) strategy for high resolution physical mapping. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90- Suppl.: 20-1.
4. Zingales B, Rondinelli E, Degraive W, et al. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. *Parasitol. Today* 1997; 13: 16-22.
5. Ferrari I, Lorenzi H, Santos MR, et al. Towards the physical map of the *Trypanosoma cruzi* nuclear genome: construction of YAC and BAC libraries of the reference clone *T. cruzi* CL-Brener. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 843-62.
6. Degraive W, Levin MJ, da Silveira JF. Parasite genome projects and the *Trypanosoma cruzi* initiative. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 859-62.
7. Degraive W, de Miranda AB, Amorim A, Brandão A, Aslett M, Vandeyar M. TcruziDB, an integrated Database, and the WWW information server for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 805-9.
8. Rosenbaum MB, Chiale PA, Schejtman D, Levin MJ, Elizari MV. Antibodies to β -adrenergic receptors disclosing agonist-like properties in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994; 5: 367-75.
9. Chiale PA, Feigelson EA, Levin MJ, Elizari MV, Hoebcke J, Rosenbaum MB. Anticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos en la enfermedad de Chagas crónica. *Rev Arg Cardiol* 1994; 62: 31-8.
10. Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, et al. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *T. cruzi* and a functional epitope on the human beta1-adrenergic receptor. *J Exp Med* 1995; 182: 59-65.
11. Chiale PA, Vallaza M, Feigelson E, et al. Anticuerpos anti-receptores adrenérgicos beta con actividad agonista parcial en pacientes con cardiopatía eléctrica primaria. *Rev Argent Cardiol* 1996; 64: 119-27.
12. Elies R, Ferrari I, Wallukat G, et al. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* 1996; 157: 4203-11.
13. Kaplan D, Ferrari I, López Bergami P, et al. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in Lupus. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 10301-6.
14. Ferrari I, Levin MJ, Elizari M, Rosenbaum M, Chiale P. Cholinergic autoantibodies in sinus node dysfunction. *Lancet* 1997; 350: 262-3.
15. Kaplan D, Ferrari I, López Bergami P, et al. Los anticuerpos antiproteínas ribosomales P estimulan el receptor β adrenérgico en la Enfermedad de Chagas pero no en el lupus eritematoso sistémico. *Rev Argent Cardiol* 1998; 66: 127-37.

16. Masuda M, Levin MJ, Farías de Oliveira S, *et al.* Functionally active cardiac antibodies in Chronic Chagas Disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J* 1998; 12: 1551-8.
17. Ferrari I, Kaplan D, Mahler E, *et al.* Generation of antibodies with functional autoreactive properties in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; Suppl. 93: 83-4.
18. Ghio S. Antígenos de *Trypanosoma cruzi* obtenidos por rastreo inmunológico. Tesis de licenciatura. Dpto. de ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1996.
19. Hanakahi LA, Dempsey LA, Li MJ, Maizels N. Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3605-10.
20. Levin MJ, Mesri E, Benarous R, *et al.* Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 530-9.
21. Ghio S, Lorenzi H, Brandao A, *et al.* Inverse antigens: a solid link between the *Trypanosoma cruzi* genome project and Chagas' heart disease. Tenth International Genome Sequencing and Analysis Conference, Miami, FL, USA September 18-21, 1998.
22. López Bergami P, Cabeza Meckert P, Kaplan D, *et al.* Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 18: 75-85.
23. Santos M, Lorenzi H, Do Carmo M, *et al.* Physical Map of a 650 kb chromosomal region encompassing the genes of two immunodominant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi*. 1999, (submitted for publication).
24. Azevedo V, Levitus G, Miyoshi A, Cândido AL, Goes AM, Oliveira SC. Main features of DNA-based immunization vectors. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 147-53.
25. Weston D, Patel B, Van Voorhis W. Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 98: 105-16.
26. Chiurillo M, Cano I, da Silveira J, Ramirez JL. Organization of telomeric and subtelomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1999; (in press).
27. Anderson B, Aslund L, Tammi M, *et al.* Complete sequence of a 93.4-kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand-switch region. *Genome Res* 1998; 8: 809-16.
28. Vázquez MP, Schijman AG, Levin MJ. A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-splicing in certain ribosomal P2 β protein genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 64: 327-36.
29. Cano MI, Gruber A, Vazquez M, *et al.* Molecular karyotype of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener reference clone of the *T. cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 71: 273-8.
30. Vázquez M, Lorenzi H, Schijman A, Ben-Dov C, Levin MJ. Analysis of the distribution of SIRE in the nuclear genome of *Trypanosoma cruzi* reveals its linkage to other repetitive sequences and protein coding genes. *Gene* 1999, (submitted for publication).
31. Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Viotti R, Levin MJ. Role of parasites in the pathogenesis of Chagas cardiomyopathy. *Lancet* 1996; 347: 913-4.
32. Berek C, Kim HJ. B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis. *Seminars in Immunology* 1997; 9: 261-8.
33. Macina R. Diversidad de secuencia de los minicírculos de *T. cruzi*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1990.

Non, mille fois non, il n'existe pas une catégorie de sciences auxquelles on puisse donner le nom de sciences appliquées. Il y a la Science et les applications de la Science, liées entre elles comme le fruit à l'arbre qui l'a porté.

No, mil veces no, no existe una categoría de ciencias a las que se les puede dar el nombre de ciencias aplicadas. Existe la Ciencia y las aplicaciones de la Ciencia, ligadas entre ellas como el fruto del árbol que lo ha portado.

Louis Pasteur (1822-1895)

Pasteur, un homme, une oeuvre. *La lettre de l'Institut Pasteur* 1995; 9: 17