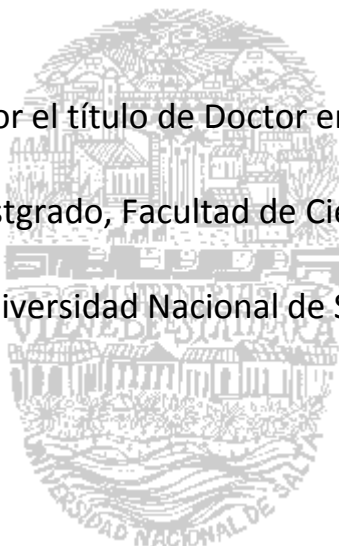


TcTASV: Familia de proteínas de superficie de *Trypanosoma cruzi*. Su aplicación en el inmunodiagnóstico de la infección chagásica en humanos y reservorios domésticos

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas

Escuela de Postgrado, Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Nacional de Salta



Tesista: Lic. Noelia Florida Yapur

Director: Dr. Julio Rubén Nasser

Co-directora: Dra. Valeria Tekiel

Salta, 2018

Agradecimientos

A mi director, el Dr. Julio Nasser, por abrirme las puertas de la cátedra hace ya varios años. Gracias por acompañarme en este largo proceso con enorme generosidad y entrega. Gracias por confiar en mí desde un principio, continuamente impulsándome a crecer y a ser independiente. Siempre pragmático y criterioso, mucho de lo que aprendí con vos va más allá de lo científico y académico. La cátedra siempre será mi casa y ustedes mi familia “de Biológica”.

A mi codirectora, la Dra. Valeria Tekiel, gracias por acceder a la co-dirección de esta tesis, invitándonos a conocer el mundo de las TcTASV! Gracias por recibirme siempre tan predispuesta en el Instituto, por tantas enseñanzas, generosidad y enorme paciencia en el laboratorio. Siempre al pie del cañón, fuiste un soporte fundamental en esta tesis acompañándome desde la distancia y a la vez desde tan cerca.

A todo el equipo de Química Biológica, Adri A., Rubén, José, Pedrín, Agus, Sabri, Cristinita, Adri E. y Noe, gracias por todos los momentos compartidos en el laboratorio y por darme una mano cada vez que lo necesité. En especial, a mis amigas Pao, Cris, Guadita, Miry e Inesa gracias por el empuje constante, por las risas, por las palabras de aliento y por estar siempre a mi lado.

A mis compañeros del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas: Lucas, Carito, Mai, Albert, Gise, Ani, Maty, Yamil y Lea. Por recibirme tan bien siempre y hacerme una más del grupete, por las risas y toda la ayuda que me dieron en cada pasantía. Agradezco haber tenido la oportunidad de conocerlos y compartir con Uds.

Al Dr. Daniel Sánchez por apoyar el desarrollo de cada pasantía en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas.

A los jurados de esta tesis el Dr. Diego Marco, el Dr. Alejandro Schijman y el Dr. Iván Marcipar, por tomarse el tiempo de evaluar este trabajo y por sus valiosas contribuciones a la mejora del mismo.

A las instituciones que permitieron el desarrollo de esta tesis: la Universidad Nacional de Salta (UNSa), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-Intech), sede San Martín, UNSAM-CONICET y el Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (IIET), Sede Regional Orán, UNSa.

Al Dr. Patricio Diosque, al Dr. Diego Marco y a la Bqca. Irma Torrejón por proveer de material biológico fundamental para el desarrollo de esta tesis.

A esas amigas de la vida, que tengo la dicha de tener: Maru, Roxs, Andre, Vicky, Anto T., Coty, Sole, Anto L., Andy y Gi. Gracias por estar, por escuchar, por el apoyo constante.

A mi amada familia. A mis padres, simplemente gracias por TODO. A mis “bros”, por estar siempre y a cada momento. A mis tíos Betty y Fer y a mi prima “pervers”, por recibirme siempre y hacerme sentir como en casa.

Por último, a Juan, mi compañero de vida, por ser mi mayor sostén en todo momento. Gracias por comprenderme y apoyarme en este proceso. Gracias por el día a día, por hacerme feliz con tu forma tan sencilla de ver y vivir la vida. Tu apoyo es, para mí, imprescindible.

Índice de contenidos

Resumen.....	1
Abstract	4
Introducción General	6
Enfermedad de Chagas-Mazza: generalidades	6
Etiología de la Enfermedad	7
<i>Trypanosoma cruzi</i>	7
Situación epidemiológica	14
Respuesta inmune del hospedador.....	16
Inmunopatogenia y manifestaciones clínicas	19
Tratamiento.....	21
Diagnóstico.....	23
Proteínas de superficie de <i>T. cruzi</i>	26
Mucinas	27
Trans-sialidasas	28
MASP: Proteínas de superficie asociadas a mucinas	29
La Familia Proteica TcTASV.....	30
Hipótesis de trabajo	33
Objetivo general:.....	34
Objetivos específicos:.....	34
Capítulo I : Producción heteróloga de miembros de la familia proteica TcTASV de <i>T. cruzi</i>	35
I.1. Introducción	35

Primeras aproximaciones al estudio de la familia TcTASV: Clonado y estudio de patrones de expresión	35
Objetivo general:.....	39
Objetivos específicos:.....	39
I.2. Resultados	40
I.3. Discusión	45
Capítulo II : Determinación de la utilidad de los antígenos TcTASV en la detección de la infección por <i>T. cruzi</i> en humanos	46
II.1. Introducción	46
Proteínas recombinantes para el diagnóstico de la infección en humanos	46
Determinación de cura y seguimiento serológico de pacientes tratados.....	48
Objetivo General:	50
Objetivos específicos:.....	50
II.2. Resultados	51
Desempeño diagnóstico de los ELISAs con antígenos TcTASV.....	51
Detección de anticuerpos anti-TcTASV en sueros de niños con infección congénita.....	54
ELISA-Mix A+C para el seguimiento serológico de pacientes tratados	56
II.3. Discusión	60
Capítulo III : Utilidad diagnóstica de TcTASV en perros infectados naturalmente por <i>T. cruzi</i> ...	66
III.1. Introducción	66
Papel epidemiológico de los perros	66
Diagnóstico de la infección en perros	68
Objetivo general:.....	69
Objetivos Específicos:.....	69
III.2. Resultados	70

III.2. Sección 1. Evaluación de la capacidad diagnóstica de los antígenos TcTASV mediante ensayos de ELISA para la detección de la infección chagásica en perros	70
Reactividad de los sueros de perros infectados (PTc+) y no infectados (PTc-) contra las proteínas TcTASVs.....	71
Reactividad diferencial del ELISA TcTASV-A+C en perros con resultados positivos por PCR y/o xenodiagnóstico.....	72
III.2. Sección 2. Mapeo de epítopes de TcTASV-C mediante ELISA.....	74
III.2. Sección 3. Estudio de TcTASV-C como un biomarcador serológico de la infección chagásica en perros.....	77
Detección de TcTASV-C en sueros de perros infectados mediante Western- Blot.....	77
Captura de TcTASV-C a partir de sueros de perros infectados con T. cruzi mediante columna de afinidad.....	81
III.3. Discusión	83
Discusión General y Conclusiones.....	88
Perspectivas Futuras	97
Materiales y Métodos	98
Capítulo I	98
MyM.I.1.i. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	98
MyM.I.1.ii. Plásmidos:.....	99
MyM.I.1.iii. Obtención y Clonado del ADN codificante de TcTASV-A y TcTASV-B.	100
Procedimientos de ADN recombinante	102
MyM.I.2. Tailing y Ligación de los productos de PCR en plásmidos pGEM-Teasy	102
MyM.I.3. Trasformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> competentes por shock térmico ...	103
MyM.I.4. PCR colony	103
MyM.I.5. Electroforesis en gel de agarosa	104
MyM.I.6. Mini (o midi) preparaciones de ADN plasmídico	105
MyM.I.7. Secuenciación de mini-preparaciones de plásmidos.....	105

MyM.I.8. Digestión del ADN plasmídico.....	106
MyM.I.9. Purificación de los productos de digestión a partir de geles de agarosa	106
MyM.I.10. Ligación de los insertos de interés en plásmidos de expresión pGEX y transformación de BL21 codon plus.....	106
Expresión y purificación de las proteínas TcTASV-A, TcTASV-B y TcTASV-C y GST	107
MyM.I.11. Inducción de la expresión de las proteínas heterólogas	107
MyM.I.12. Purificación de las proteínas recombinantes	109
MyM.I.13. Análisis de proteínas.....	109
Capítulo II	112
MyM.II.1. Muestras de sueros	112
MyM.II.1.i. Sueros para determinación de parámetros de eficacia diagnóstica:	112
MyM.II.1.ii. Sueros de niños con infección congénita	114
MyM.II.1.iii. Sueros de pacientes tratados.....	115
MyM.II.2. Serología convencional.....	115
MyM.II.3. ELISA Indirecto con antígenos TcTASV para sueros de humanos.....	116
Estandarización de los ensayos de ELISA con antígenos TcTASV	116
MyM.II.4. Determinación de eficacia diagnóstica de los ELISAs con TcTASV	119
MyM.II.5. Análisis estadístico y parámetros de eficacia diagnóstica.....	119
Capítulo III	121
MyM.III. Sección 1. Evaluación de la capacidad diagnóstica de los antígenos TcTASV mediante ensayos de ELISA para la detección de la infección chagásica en perros	121
MyM.III.1.1. Sueros	121
MyM.III.1.2. ELISA Indirecto con antígenos TcTASV para sueros de perros	122
MyM.III.1.3. Evaluación del panel de sueros	124
MyM.III.1.4. Análisis estadístico de los datos	125
MyM.III. Sección 2. Mapeo de epítopes de TcTASV-C mediante ELISA	125

MyM.III.2.1. Péptidos	125
MyM.III.2.2. Ensayos de ELISA-péptidos de TcTASV-C.....	126
MyM.III. Sección 3. Estudio de TcTASV-C como un biomarcador serológico de la infección chagásica en perros.....	127
MyM.III. Sección 3. A. Ensayos de Western Blot para detección de TcTASV-C en sueros de perros infectados	127
MyM.III. Sección 3. B. Captura de TcTASV-C a partir de sueros de perros infectados con <i>T. cruzi</i> mediante columna de afinidad	129
Bibliografía	132
Anexo	153

Resumen

La enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi* afecta actualmente a millones de personas en América Latina y el mundo. El apropiado diagnóstico del paciente chagásico, cualquiera sea su edad y etapa infectiva, es fundamental para el pronóstico, tratamiento y prevención de la transmisión. La Organización Mundial de la Salud ha resaltado la necesidad del perfeccionamiento de las herramientas diagnósticas disponibles para la infección por este parásito o el desarrollo de nuevas. Las técnicas serológicas convencionales además de llevar a resultados inconclusos, resultan inespecíficas ante infecciones con patógenos emparentados y co-endémicos como *Leishmania spp.* Estudios multicéntricos han reportado que el desempeño de los kits convencionales, además, varía según la procedencia de las muestras. Este fenómeno se atribuye a que las muestras en estudio pertenezcan a individuos infectados con distintos linajes de diferentes regiones. Se requiere de plataformas diagnósticas sensibles y específicas que superen estas dificultades y puedan ser utilizadas en centros sin especialización y en zonas rurales (técnicas POC, “Point of care”). A esto, se suman la falta de una prueba que permita la determinación de cura en pacientes tratados y las limitaciones a la hora de detectar la infección en pacientes congénitos durante los primeros meses de vida. Por otro lado, se requieren de herramientas para la vigilancia epidemiológica en áreas endémicas en donde la detección de la infección en reservorios domésticos, como ser los perros, es fundamental para evaluar el riesgo de transmisión al hombre. La descripción de la familia TcTASV, la última familia multigénica de *T. cruzi* en ser descubierta, devino en el planteamiento de esta tesis. Los miembros TcTASV se agrupan en cuatro subfamilias: A, B, C y W, y, en general, poseen características potencialmente útiles para el diagnóstico serológico de la infección chagásica: se expresan en la superficie del parásito, diferencialmente en el tripomastigote, y no comparten homología de secuencias con los genomas de *Leishmania spp.* El objetivo de esta tesis, en vista de las problemáticas especificadas, fue estudiar la aplicabilidad de estas proteínas recientemente descubiertas para la detección de la infección chagásica tanto en humanos como en reservorios domésticos.

En la resolución de este trabajo, en primer lugar, nos enfrentamos al desafío de clonar y expresar estas proteínas en estado soluble para poder utilizarlas en los ensayos de inmunodiagnóstico. Una vez ajustados los protocolos de producción de las proteínas recombinantes estandarizamos los ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos anti-TcTASV en humanos y en perros. Hemos demostrado que los antígenos TcTASV-A y TcTASV-C son específicos para la determinación de la infección tanto en humanos como en perros, ya que ninguno de los sueros de individuos sanos, leishmaniásicos o con estrongiloidosis estudiados reaccionaron ante los mismos. Si bien la sensibilidad de los antígenos individualmente evaluados resultó de baja a moderada, la combinación de los mismos en el ensayo de ELISA-Mix A+C permitió la detección de un alto porcentaje de muestras de individuos infectados tanto para el caso de humanos como para los reservorios domésticos estudiados aquí. Además, el ELISA-Mix A+C demostró ser una técnica de elevado desempeño para el caso particular de pacientes pediátricos. Sumado a esto, logró detectar de forma temprana el impacto del tratamiento en mencionados pacientes: la disminución de anticuerpos anti-TcTASV se evidenció en un mayor porcentaje de pacientes, con respecto a la disminución de anticuerpos anti-*T. cruzi* totales, determinados por serología convencional.

Por otro lado, siendo los perros el reservorio de mayor importancia en el ciclo doméstico de este parásito, estudiamos el desempeño diagnóstico de los antígenos TcTASVs para la detección de la infección por *T. cruzi* en perros infectados naturalmente de áreas endémicas. En concordancia con otros resultados de nuestro grupo observamos que TcTASV-C, principalmente, y TcTASV-A, serían indicadores de infección activa. Por lo tanto, los perros reactivos ante los antígenos TcTASV-A y -C podrían tener un mayor impacto epidemiológico al representar una fuente mayor de parásitos para un vector no infectado que se alimente de éstos. Dada su liberación al medio tanto en forma soluble como contenida en vesículas, estudiamos la presencia de TcTASV-C en el suero de perros infectados a modo de un biomarcador de infección, mediante un ensayo de Western Blot. Los resultados positivos fueron corroborados mediante la captura del antígeno en el suero de perros infectados utilizando columnas de afinidad específicas preparadas en el laboratorio. Los resultados obtenidos podrían derivar en el uso de TcTASV-C como candidato para el desarrollo de pruebas diagnósticas rápidas a ser aplicadas en zonas endémicas para detectar reservorios con infección activa.

Los resultados de este trabajo, demuestran que los antígenos TcTASV, o péptidos derivados de sus secuencias, podrían ser sumados a plataformas de diagnóstico contribuyendo positivamente a las problemáticas planteadas. Por otro lado, y no menos importante, aportan evidencia sobre la expresión de estas proteínas recientemente descubiertas durante el curso natural de la infección por *T. cruzi* en los distintos hospedadores del ciclo doméstico. Se requieren de mayores estudios para confirmar la utilidad diagnóstica de las proteínas TcTASV y para elucidar su rol en la biología de *T. cruzi* y en su interacción con los hospedadores mamíferos.

Abstract

Chagas' disease produced by *Trypanosoma cruzi* currently affects millions of people in Latin America and the world. The proper diagnosis of chagasic patients, regardless of age and infective stage, is essential for the prognosis, treatment and prevention of transmission of the disease. The World Health Organization has highlighted the need to improve the diagnostic tools available for the detection of the infection by this parasite or the development of new ones. Conventional serological techniques, besides leading to inconclusive results, are non-specific to infections with related and co-endemic pathogens such as *Leishmania spp.* Multicenter studies have reported that the performance of conventional kits also varies according to the provenance of the samples. This phenomenon is attributed to the fact that the samples under study belong to individuals infected with different lineages from different regions. Sensitive and specific diagnostic platforms able to overcome these difficulties and applicable in non-specialized centers and in rural areas (POC techniques, Point of care), are needed. In addition, there is a lack of a test that allows the determination of cure in treated patients and there are serious limitations in detecting infection in congenital patients during the first months of life. On the other hand, tools are needed for epidemiological surveillance in endemic areas where the detection of infection in domestic reservoirs, such as dogs, is essential to evaluate the risk of transmission to humans. The description of the TcTASV family, the last multigenic family of *T. cruzi* to be discovered, encouraged the presentation of this thesis. The TcTASV members are grouped into four subfamilies: A, B, C and W, and, in general, have potentially useful characteristics for the serological diagnosis of chagasic infection: they are differentially expressed in the trypomastigote stage, mostly on the surface of parasites, and do not share sequence homology with the genomes of *Leishmania spp.* The objective of this thesis, in view of the mentioned problems, was to study the applicability of these recently discovered proteins for the detection of chagasic infection in both humans and domestic reservoirs.

In the resolution of this work, we first faced the challenge of cloning and expressing these proteins in a soluble state for its use in immunodiagnostic assays. Once the production protocols of the recombinant proteins were adjusted we standardized ELISA assays for the detection of anti-

TcTASV antibodies in humans and dogs. We showed that the TcTASV-A and TcTASV-C antigens are specific for the determination of infection in both humans and dogs, since none of the sera from healthy, *Leishmania spp.* or *Strongyloides stercoralis* infected patients studied here reacted against them. Although the sensitivity of the antigens individually evaluated was low to moderate, their combined use in the ELISA-Mix A+C assay allowed the detection of a high percentage of samples from infected individuals both for humans and dogs. In addition, the ELISA-Mix A+C proved to be a high performance technique for the particular case of pediatric patients. Also, it was able to detect early the impact of treatment in the mentioned patients: the reduction of anti-TcTASV antibodies was evidenced in a greater number of patients, compared to the decrease of anti-*T. cruzi* antibodies determined by conventional serology, in the follow up period studied.

On the other hand, since dogs are the most important reservoir in the domestic cycle of this parasite, we studied the diagnostic performance of TcTASVs antigens for the detection of *T. cruzi* infection in naturally infected dogs from endemic areas. In agreement with other results of our group we observed that TcTASV-C, mainly, and TcTASV-A, would be indicators of active infection. Therefore, dogs reactive to the TcTASV-A and -C antigens may have a greater epidemiological impact as they represent a larger source of parasites for an uninfected vector that feeding from them. Due to its release into the medium both in soluble form and contained in vesicles, we studied the presence of TcTASV-C in the serum of infected dogs as a biomarker of infection by a Western Blot assay. Positive results were corroborated by capture of the antigen in the serum of infected dogs using specific affinity columns prepared in the laboratory. The results obtained could lead to the use of TcTASV-C as a candidate for the development of rapid diagnostic tests to be applied in endemic areas to detect reservoirs with active infection.

The results of this work demonstrate that TcTASV antigens, or peptides derived from their sequences, could be added to diagnostic platforms contributing positively to the problems raised. On the other hand, and not least, these results provide evidence on the expression of these newly discovered proteins during the natural course of *T. cruzi* infection in the different hosts of the domestic cycle. Further studies are needed to confirm the diagnostic utility of TcTASV proteins and to elucidate their role in the biology of *T. cruzi* and in their interaction with mammalian hosts.

Introducción General

Enfermedad de Chagas-Mazza: generalidades

Hacia 1909, el médico brasileño Carlos Chagas logró desenmascarar las manifestaciones clínicas, el parásito responsable y el principal vector de la enfermedad que lleva su nombre. Sin embargo, años después del descubrimiento sobrevino una etapa en la que la opinión de los investigadores de la época estaba impregnada de escepticismo sobre la existencia de la enfermedad. Kraus y Rosenbusch, hacia 1914 detectaron vinchucas infectadas en Argentina, pero ningún enfermo, lo que les llevó a pensar que la enfermedad de Chagas se encontraba ausente en nuestro país. Fue el intenso trabajo del médico e investigador argentino, Salvador Mazza, y su minuciosa recolección de datos de pacientes sintomáticos en el norte del país, lo que hizo resurgir el interés por la enfermedad y demostró su presencia en dicha zona (Storino & Milei, 1994).

La enfermedad de Chagas representa hoy la afección parasitaria más importante, no sólo en Argentina sino también en todo Latinoamérica. Han transcurrido ya más de 100 años desde que esta enfermedad fue descubierta y si bien disponemos de un enorme conocimiento gracias a los innumerables estudios que se han realizado por investigadores alrededor del mundo, aún quedan aspectos sin resolver y preguntas sin responder. En el año 2007, la Organización Mundial de la Salud, en reconocimiento de la situación epidemiológica de la enfermedad, planteó necesidades de investigación entre las que se encuentran (World Health Organization, 2007):

- Investigación para abordar cifras reales de la magnitud y distribución de la enfermedad de Chagas y su carga (incluidos los Estados Unidos de América y Europa);
- Investigación para lograr la perdurabilidad de las estrategias de control de los insectos vectores domiciliados y abordaje del reto que implican los vectores peridomiciliarios y silvestres;
- Perfeccionamiento en las herramientas para diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la infección y la enfermedad:
 - Investigación en patogénesis (relación de los linajes infectantes con las manifestaciones clínicas de la enfermedad)

- Nuevas herramientas diagnósticas
- Nuevos medicamentos
- Nuevos paradigmas en el tratamiento de la enfermedad crónica.

En esta tesis se indagará en el estudio de alternativas para el diagnóstico de la infección tanto en humanos como en reservorios domésticos. En este primer capítulo, introduciremos aspectos generales de la enfermedad de Chagas como ser su etiología, epidemiología, manifestaciones, clínicas, tratamiento y diagnóstico, para luego plantear la importancia de la respuesta inmune del hospedador en la patología resultante la infección chagásica y el rol de las distintas proteínas de superficie del parásito en este sentido. Finalizaremos esta introducción describiendo la familia de proteínas de superficie TcTASV descubiertas recientemente para el planteo de hipótesis y objetivos de este trabajo. A la Introducción, le siguen tres capítulos experimentales que tratan sobre: el clonado y la producción de los antígenos recombinantes TcTASV (Capítulo I), el estudio de la utilidad de las proteínas TcTASV para la detección de la infección en humanos y como marcador de seguimiento en pacientes tratados (Capítulo II) y, por último, la aplicabilidad de estos antígenos para la detección de la infección en perros infectados naturalmente (Capítulo III). Este trabajo concluye con una Discusión General de los resultados obtenidos y, finalmente, con una sección de descripción de los materiales y metodologías empleadas.

Etiología de la Enfermedad

Trypanosoma cruzi

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Taxonómicamente, se ubica en (Pechenik, 2005):

Dominio: Eukarya

Reino: Protozoa

Phylum: Euglenozoa

Orden: Kinetoplastea

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Subgénero: *Schizotrypanum*

Especie: *cruzi*

Dentro de la Familia Trypanosomatidae, se encuentran también los parásitos del género *Leishmania*. Al igual que el resto de los kinetoplástidos, *T. cruzi* se caracteriza por tener una única mitocondria con una gran concentración de ADN kinetoplástico (kDNA). El ADN de esta organela se organiza a modo de una red compleja de miles de anillos: maxicírculos (con un tamaño de 20–40 kb) y minicírculos (de aproximadamente 1.4 kb). Los maxicírculos se encuentran en un número de 25 a 50 copias y los minicírculos, entre 10.000 y 30.000. El ADN de los minicírculos codifican para ARN guías (gRNA) que intervienen en la edición post-transcripcional de ARN mensajeros mitocondriales (Aphasizhev & Aphasizheva, 2012); mientras que, los maxicírculos codifican para proteínas mitocondriales importantes como ser subunidades de la cadena respiratoria.

El parásito atraviesa un ciclo de vida complejo que incluye distintos estadios de desarrollo

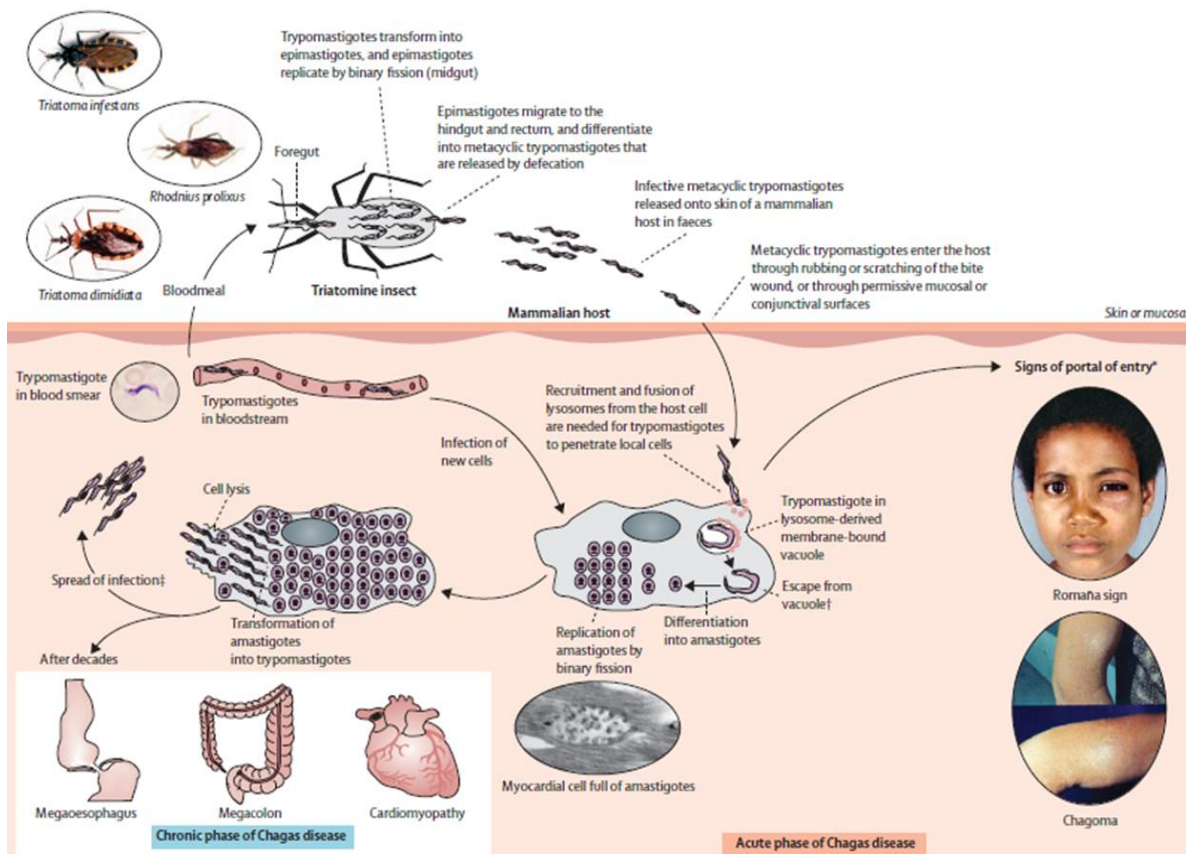


Figura 1 Ciclo biológico de *T. cruzi* y transmisión vectorial. Extraído de Rassi et al., 2010.

en el insecto vector y en el hospedador mamífero, que se diferencian en cuanto a su morfología, patogenia y modo de reproducción distintos (Figura 1). Los epimastigotes proliferan en el intestino medio del vector triatomino y se caracterizan por presentar flagelo con membrana ondulante corta con origen anterior al núcleo. Hacia el tracto digestivo posterior los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Estos últimos carecen de capacidad replicativa, poseen una membrana ondulante larga y el origen del flagelo es posterior al núcleo. El insecto hematófago los libera con sus heces mientras se alimenta del mamífero, tras lo cual ingresan por la herida ocasionada o por las mucosas interiorizándose en las células nucleadas del huésped (principalmente fagocitos). Estas formas metacíclicas se diferencian a amastigotes aflagelados esféricos que constituyen la etapa replicativa del parásito en el interior del hospedador. Una vez que se ha formado un gran número de amastigotes en el interior de la célula, estos se diferencian nuevamente a tripomastigotes que rompen la célula hospedadora y se liberan a la circulación invadiendo otras células y repitiendo el ciclo. Cuando un triatomino libre de infección se alimenta sobre un mamífero parasitado, los tripomastigotes ingeridos se diferencian en esferomastigotes (formas esféricas con flagelo que rodea el cuerpo del parásito), que se multiplican en el estómago y son los responsables de la persistencia de la infección en el insecto vector. Parte de estos, se diferenciarán a epimastigotes que también se multiplican mientras progresan por el tubo digestivo hasta llegar a la ampolla rectal y allí se diferencian en parte a metacíclicos, reiniciando el ciclo.

Del ciclo biológico del parásito se desprende la diferenciación de las dos fases claramente distinguibles durante el transcurso de la enfermedad: la fase aguda y la fase crónica (Figura 1). Durante la fase aguda, que inicia con la primoinfección, cualquier tipo de célula nucleada puede ser infectada por *T. cruzi*. El desarrollo de la respuesta inmune por parte del hospedador disminuye la parasitemia a niveles subpatentes, marcando el final de esta primera fase hacia las 4-6 semanas y dando inicio a la fase crónica de la infección. En esta última, el parásito, que no ha sido completamente eliminado, persiste indefinidamente durante toda la vida en el hospedador infectando tejidos específicos como músculo esquelético o cardíaco o ganglios entéricos (Rassi et al., 2010). En la fase crónica de la infección pueden a su vez diferenciarse dos períodos: período crónico sin patología aparente (ex-período indeterminado) y período crónico con patología aparente (Mitelman et al., 2012). En los apartados siguientes se describirán en detalle las manifestaciones clínicas de cada etapa.

Diversidad genética

La elevada diversidad genética entre parásitos pertenecientes a la especie *T. cruzi* permitió su clasificación en seis Unidades Discretas de Tipificación (DTUs): TcI-TcVI (Zingales et al., 2012). Las DTUs se definen como sets de stocks de parásitos que están más emparentados genéticamente entre ellos que con cualquier otro stock y que son identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes (Tibayrenc, 1998). Las distintas DTUs muestran características biológicas, bioquímicas y moleculares distintivas que, en conjunto con los factores relacionados al hospedador, tendrían un rol preponderante en la determinación del curso clínico e histopatología de la infección (Ragone et al., 2012, 2015; Monteiro et al., 2013; Meza et al., 2014; de Oliveira et al., 2017). Recientemente, se aislaron parásitos de *T. cruzi* a partir de murciélagos en Brasil que no podían ser tipificados dentro de ningún DTU y que presentaban características biológicas distintivas (morfología determinada, baja virulencia y parasitemia) por lo que se llamó a este nuevo linaje Tcbat (Marcili et al., 2009). Este nuevo DTU estaría cercanamente emparentado con TcI, compartiendo ambos linajes un ancestro común reciente (Lima et al., 2015).

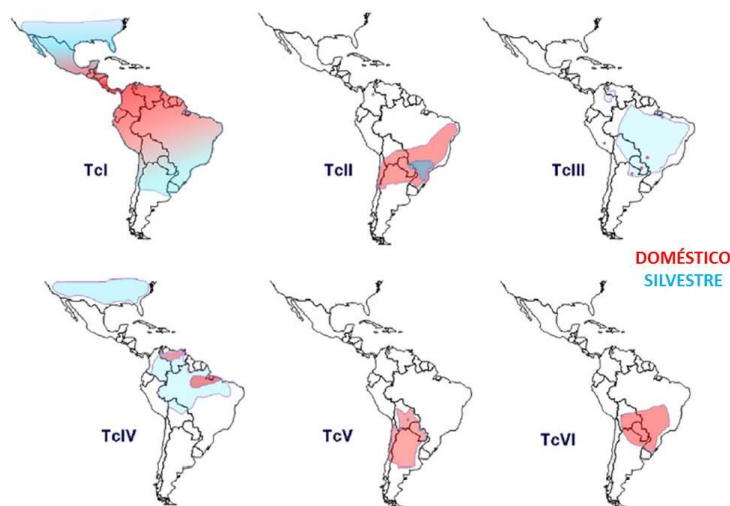


Figura 2 Distribución geográfica aproximada de los distintos DTUs de *T. cruzi* en los ciclos doméstico y silvestre. Extraído de Zingales et al., 2012.

Los distintos linajes de *T. cruzi* muestran patrones filogeográficos y eco-epidemiológicos característicos que han sido revisados detalladamente por Zingales *et al.*, 2012 (Figura 2). El linaje TcI se distribuye por toda América y se asocia tanto al ciclo doméstico como silvestre. Las infecciones en humanos con este linaje se concentran en la Amazonia, países andinos, América Central y México, siendo la cardiopatía chagásica la manifestación clínica más común, mientras

que megaesófago y megacolon están ausentes o son muy raros. En la Región del Cono Sur los linajes TcII, TcV y TcVI son los principales responsables de la enfermedad de Chagas. TcII predomina en el este y centro de Brasil, TcV en Argentina, Bolivia, y Paraguay, y TcVI en el Gran Chaco. Los pacientes infectados con estos linajes por lo general desarrollan cardiopatía chagásica severa y en algunos casos, megaesófago y megacolon. Por su parte, TcIII se asocia mayormente con el ciclo silvestre en Brasil, Venezuela y parte del Chaco Argentino, siendo las infecciones humanas raras encontrándose TcIII ocasionalmente en perros. TcIV tiene un patrón similar de distribución que TcIII, estando ausente en el Chaco. Sin embargo, es más frecuente su presencia en humanos siendo la segunda causa de enfermedad de Chagas en Venezuela. Por último, Tcbat se ha reportado en murciélagos en Brasil, Colombia y Panamá e inclusive en un niño en Colombia, siendo este el primer reporte de un humano infectado con este DTU (Ramírez et al., 2014; Lima et al., 2015).

Con el pasar de los años distintas metodologías fueron diseñadas para la tipificación de *T. cruzi* (Zingales et al., 2012). Todas involucran el análisis de más de un blanco genético y en algunos casos dos o más técnicas de biología molecular. Entre las distintas técnicas y algoritmos para la tipificación se pueden mencionar: PCR convencional para amplificar los genes correspondientes a splice leader (SL), 24S α ADNr y 18S ADNr (Brisse et al., 2001); análisis de polimorfismo de 12 loci mediante PCR-RFLP; esquema de MLST (Diosque et al., 2014); hibridación con sondas de ADNk (Solari et al., 1998; Monje-Rumi et al., 2015; Bontempi et al., 2016) y PCR anidada para amplificar distintas regiones del espaciador no transcripto (NTS) de los genes SL y una región dimórfica del fragmento nuclear A10 (Marcet et al., 2006; Cardinal et al., 2008; Duffy et al., 2013).

Mecanismos de transmisión y reservorios

La transmisión vectorial es la principal forma de adquirir la infección en zonas endémicas. En estas áreas el ciclo vital de *T. cruzi* ocurre simultáneamente en tres escenarios que se solapan: el ciclo silvestre del parásito, en el que pasa de los vectores infectados a pequeños mamíferos en el ámbito silvestre; el ciclo domiciliario, en el que el parásito circula entre los triatomíneos domiciliados, el hombre y los animales domésticos; y el ciclo peridomiciliario, en el que el parásito circula entre los vectores del peridomicilio y animales de corral, como ser cerdos y cabras (las aves de corral funcionan como fuente de alimento para los insectos pero no son reservorios del

parásito). En todos los ciclos participan insectos hematófagos de la Familia Reduviidae (huésped intermediario o vector) y mamíferos (huésped definitivo) y se diferencian en las especies que intervienen y sus nichos ecológicos (Rodrigues Coura y Pinto Dias, 2009; Storino y Milei, 1994).

Se han descrito unas 66 especies de insectos triatominos infectados naturalmente con el parásito. Sólo unas 20 especies de los géneros *Triatoma spp*, *Rhodnius spp* y *Panstrongylus spp* son particularmente relevantes para la transmisión del *T. cruzi* a los seres humanos, y la mayoría de los estudios se centran en estas especies (Gourbière et al., 2012) (Figura 3). Una de las especies más importantes desde el punto de vista epidemiológico es *T. infestans*, que en los países del Cono Sur, corresponde a la especie blanco de las acciones de control dado que representa el mayor riesgo de transmisión de *T. cruzi* por su alto grado de domiciliación. Mientras que, en Venezuela, Colombia y en regiones de Centroamérica, el vector más relevante es *R. prolixus* que es esencialmente una especie doméstica asociada a poblaciones de palmeras.

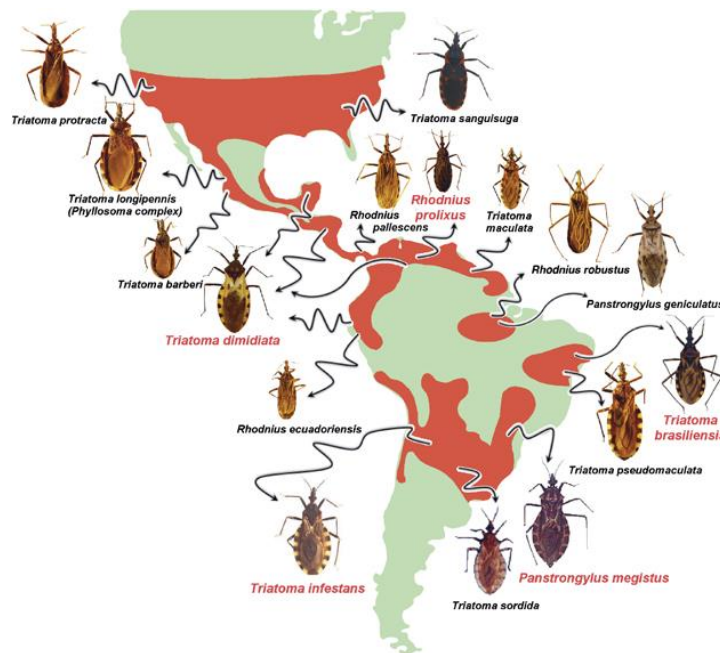


Figura 3 Distribución de especies de triatominos de mayor relevancia epidemiológica. Las áreas rojas indican la distribución geográfica aproximada de las especies. Las especies destacadas en rojo se consideran los vectores más importantes del parásito (Extraído de Gourbière et al., 2012).

Se han descrito más de 100 especies de mamíferos salvajes que actúan como reservorios de *T. cruzi*, entre los que se encuentran especies de marsupiales (de gran importancia las comadrejas), xenartros, murciélagos, lagomorfos, roedores y primates no humanos (Coura et al.,

2009). Las aves, los reptiles y los peces no actúan como reservorios debido a que no pueden infectarse porque tienen “lisinas” que destruyen el parásito (Coura et al., 2009). En el ciclo domiciliario de la infección, los animales domésticos como perros y gatos actúan como reservorios del parásito. Otros animales, como porcinos y caprinos, también se han encontrado infectados. Los perros son de gran importancia debido no sólo a su permanencia en el interior de la vivienda o en sus alrededores sino también a la elevada parasitemia que los convierte en una fuente abundante en parásitos para el vector (Castañera et al., 1998; Gürtler et al., 2007). Sumado a esto, los triatominos prefieren alimentarse de perros antes que de gatos, gallinas o del humano (Gurtler et al., 2007; Ceballos et al., 2009). En el capítulo III de esta tesis, se describirá con mayor profundidad el papel epidemiológico de estos animales y la importancia de la detección de la infección en los mismos para poder estimar el riesgo de transmisión de la infección a humanos y para evaluar la efectividad de las campañas de rociamiento de insecticidas.

La infección por *T. cruzi* puede adquirirse también por mecanismos no vectoriales como ser la vía transfusional, la vía congénita, la vía oral o mediante trasplante órganos de donantes infectados. Hacia finales del siglo XX la Iniciativa del Cono Sur logró, mediante la legislación para el control serológico en los bancos de sangre, que el 90% de los bancos de sangre de la Región (a excepción de Bolivia con un 35% de cobertura) llevaran a cabo el screening obligatorio en los donantes para la detección de *T. cruzi* (Pinto Dias, 2007). Si bien en los últimos 20 años la prevalencia de la infección chagásica ha disminuido en los países endémicos, contribuyendo así también a la disminución de la transmisión transfusional, las elevadas tasas de migración de latinoamericanos hacia países no endémicos que desconocen la enfermedad representa un gran problema de salud a nivel mundial (Wendel, 2010).

La transmisión congénita es otra vía no vectorial de adquirir el parásito a la que se debe prestar atención y que constituye una amenaza tanto en regiones endémicas como no endémicas. En esta vía de transmisión los parásitos atraviesan la placenta de la madre chagásica infectando al feto. En promedio un 5% de las madres infectadas transmiten el parásito a sus hijos, siendo incluso probable que una madre transmita el parásito a más de un hijo en siguientes embarazos (Diez et al., 2008; Carlier et al., 2015). La probabilidad de transmitir el parásito depende de una serie de factores relacionados con el parásito (genotipo, tropismo tisular y capacidad de invadir las células de la placenta, virulencia o nivel de parasitemia), el estado inmunológico de la madre (efectividad de la respuesta celular T en el control de la parasitemia), factores placentarios o características del feto (Carlier et al., 2015; Juiz et al., 2017).

A pesar de que la transmisión oral había sido reportada por varios investigadores desde mediados del siglo XX, los brotes de infección oral ocurridos en Brasil y Venezuela en los últimos años volvieron a poner bajo la lupa a este modo de transmisión (Rodríguez-Morales, 2008; Pereira et al., 2009; Alarcón de Noya et al., 2015). La ingestión de tripomastigotes metacíclicos puede ocurrir a partir de jugos o alimentos contaminados con triatomínicos o heces de triatomínicos infectados, a partir de la leche materna o incluso de alimentos contaminados con secreciones de las glándulas anales de marsupiales. Esta vía de transmisión produce una enfermedad de Chagas aguda severa y con mayor número de casos fatales debido probablemente a la ingestión de una carga de parásitos mayor que pueden penetrar las membranas mucosas del estómago (Pereira et al., 2009; Robertson et al., 2016).

Por último, la infección puede adquirirse también mediante el trasplante de órganos (vía trasplantaría) desde un donante infectado (Machado et al., 2009). Se han reportado casos de transmisión en trasplante de medula ósea, corazón, hígado o riñón (Villalba et al., 1992; Barcán et al., 2005; Kun et al., 2009).

Situación epidemiológica

En 2010, se estimó que un alarmante número de 5.7 millones de personas estaban infectadas por *T. cruzi* en América Latina de las cuales el 62.4% (3.6 millones) correspondían a países del Cono Sur (World Health Organization, 2015). El número de nuevos casos anuales de infección debidos a transmisión vectorial estimado en el mismo relevamiento epidemiológico fue 29925 y, 8668 el número anual de casos nuevos de Chagas congénito. En las dos últimas décadas la incidencia de la enfermedad ha disminuido considerablemente y de forma conjunta en los 21 países latinoamericanos donde es endémica gracias a los programas de eliminación y control del vector domiciliado (World Health Organization, 2007). Particularmente para Argentina, Chile, Bolivia, Uruguay, Paraguay y Brasil, se creó en 1991 el programa multinacional denominado Iniciativa del Cono Sur con el fin de eliminar no sólo la transmisión vectorial por *T. infestans* y sino también aumentar el control de la transmisión transfusional en los bancos de sangre. La Iniciativa del Cono Sur logró la interrupción de la transmisión vectorial en Uruguay, Chile, trece estados de Brasil, seis provincias de Argentina y un departamento de Paraguay (Pinto Dias, 2007). Además, gracias a este programa se introdujo la legislación para la obligatoriedad y estandarización de los métodos de control serológicos en los bancos de sangre en todos los países involucrados. Sin

embargo, a pesar de los logros alcanzados, la transmisión mediada por triatominos todavía origina casi 30000 nuevos casos de infección en regiones endémicas, pudiendo ser responsable de más del 70% de los casos en países donde no hay un control sistemático del vector (Coura et al., 2009).

La falta de aplicación de programas de control o su discontinuidad por problemas políticos es una de las razones por las cuales no se ha logrado aún la eliminación completa del vector en muchas regiones endémicas. En esas zonas, la vivienda precaria representa un ambiente propicio para los vectores por lo que la enfermedad de Chagas es una afección que está íntimamente asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vida que sufre una parte importante de la población de América Latina (World Health Organization, 2007). La región conocida como El Gran Chaco presenta altos niveles de prevalencia de infección por *T. cruzi* en humanos, mayormente debido a la vía de transmisión vectorial, aún activa, como consecuencia de la infestación domiciliaria con *T. infestans*, el principal vector en esta área (Gürtler, 2009; Moretti et al., 2010; Samuels et al., 2013). Esta ecorregión incluye, además de ciertas regiones de Bolivia y Paraguay, parte del norte de Argentina abarcando las provincias de Salta, Santiago del Estero y Chaco (Figura 4). En comunidades rurales de Bolivia se han reportado alarmantes seroprevalencias desde el 66.2% en mayores de 10 años hasta cercanas al total de la población (97%) en adultos mayores de treinta años (Samuels et al., 2013; Fernandez et al., 2015). En el Gran Chaco argentino, persisten regiones rurales y periurbanas con altos índices de infestación domiciliaria por triatominos y elevadas prevalencias de infección. Moretti *et al.* (2010) reportaron prevalencias medias del 21%



Figura 4 Países y provincias que abarca la Región del Gran Chaco.

en niños de entre 0-5 años, mayores al 50% en el grupo de 6 a 20 años y alrededor del 70% en adultos mayores de 30 años en comunidades rurales y urbanas al norte de la provincia de Chaco, localidad de Misión Nueva Pompeya. Recientemente, se ha reportado una prevalencia del 24.1% en adultos mayores de 18 años en Pampa del Indio, provincia de Chaco (Sartor et al., 2017).

Por otro lado, la migración de personas infectadas desde zonas rurales a zonas urbanas y hacia áreas no endémicas y la consecuente introducción de *T. cruzi* en los bancos de sangre posibilitaron la adquisición de la enfermedad en las ciudades por vía transfusional y su extensión hacia países que carecen de la vía vectorial de infección como Estados Unidos, Canadá y muchos países de Europa, principalmente España (Schmunis & Yadon, 2010). Unos 300000 individuos infectados por *T. cruzi* viven en los Estados Unidos, en su mayoría inmigrantes de México y Centroamérica; mientras que, España tiene el segundo mayor número de inmigrantes infectados, estimándose alrededor de 67000, originarios en su mayoría de Ecuador, Argentina, Bolivia y Perú (WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). La infección por *T. cruzi* debe ser considerada, por lo tanto, como un problema de Salud Global.

Respuesta inmune del hospedador

Diversos estudios han demostrado que la variabilidad de la patogenicidad resultante de la infección por *T. cruzi* depende tanto de la respuesta inmune del hospedador como de la heterogeneidad de los parásitos (dos Santos et al., 2009; Bryan et al., 2010). Estos últimos cuentan con una infinidad de mecanismos para evadir el gran despliegue de respuestas innatas y adquiridas del hospedador mamífero (Junqueira et al., 2010; DosReis, 2011; Cardoso et al., 2016). Durante la fase aguda de la infección, se ponen en juego los mecanismos de inmunidad innata para eliminar el parásito disminuyendo su replicación y expansión a los tejidos mediante el desencadenamiento de una importante reacción inflamatoria. A su vez, durante esta etapa se inicia la activación de las células T CD4+, T CD8+ y células B del sistema inmune adquirido. Los tripomastigotes de *T. cruzi* pueden adherirse e invadir cualquier tipo de célula nucleada del hospedador, incluyendo las fagocíticas del sistema inmune, gracias a sus moléculas de superficie, especialmente las trans-sialidasas. En el caso de haber invadido células no fagocíticas, estas enzimas también intervendrían en el escape del parásito desde la vacuola parasitófora hacia el citosol, mientras que en el caso de macrófagos el parásito pone en marcha una serie de enzimas antioxidantes para protegerse de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Piacenza et al.,

2008; Cardoso et al., 2016; Nardy et al., 2016). Una vez en el citoplasma, los tripomastigotes se transforman a amastigotes y se replican en cantidad.

Los principales componentes celulares innatos que intervienen en la primera etapa de la infección son los macrófagos, las células natural killer y las células dendríticas. La elevada parasitemia durante la fase aguda es eventualmente controlada por las citoquinas proinflamatorias y moléculas microbidas liberadas por macrófagos y células natural killer. Los receptores de patrones asociados a patógenos tipo Toll (TLR, *Toll like receptor*) que se encuentran tanto en la superficie como en el interior de las células del sistema inmune del hospedador juegan un papel fundamental en la activación de los macrófagos y liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α (Junqueira et al., 2010; DosReis, 2011). Los receptores TLR2/6 y TLR-4 en la superficie de células del sistema inmune innato promueven la activación de macrófagos mediante su unión a las mucinas con anclaje GPI y a la porción ceramida de los GIPLs de la superficie de *T. cruzi* (Junqueira et al., 2010; Cardoso et al., 2016). Por otro lado, los receptores TLR-7 y TLR-9 en los endosomas de las células dendríticas son activados por el ARN o sitios CpG del ADN provenientes de los tripomastigotes que llegan a ser lisados en los lisosomas, respectivamente (Junqueira et al., 2010; Cardoso et al., 2016). La activación de estos receptores vía MyD88, conduce a la activación de la inmunidad adquirida mediante la secreción de IL-12 por parte de la célula dendrítica que consecuentemente inducirá la diferenciación de células Th0 en un perfil Th1. Los linfocitos Th1 secretan IFN- γ que contribuye a la activación de más macrófagos, células natural killer y linfocitos T CD8+ incrementando así la inflamación y, en consecuencia, la patogenia de la infección. Para evitar el daño tisular producido por las respuestas proinflamatorias se desencadena hacia el final de la fase aguda una respuesta anti-inflamatoria mediada por la liberación de IL-10 y TGF- β , que contribuiría a la persistencia del parásito durante toda la vida del hospedador (DosReis, 2011).

Por su parte, los antígenos provenientes de los amastigotes en el citosol de las células del mamífero se procesan por la vía endógena y se presentan a través del CMH de clase I (Cardoso et al., 2016). Esta presentación estimula una respuesta de linfocitos citotóxicos que si bien es fuerte, es tardía, demorando entre 5-6 días post-infección con lo que su inicio coincide con la primera ronda de replicación y emergencia del parásito (Tarleton, 2015). Así, *T. cruzi* cuenta con tiempo suficiente para dispersarse por el cuerpo hospedador sin restricciones iniciales por parte del sistema inmune (Tarleton, 2015). Además, muy pocos antígenos son capaces de activar la

respuesta de células T citotóxicas, incluso el repertorio de T CD8+ está restringido a pocos péptidos inmunodominantes principalmente correspondientes a las secuencias de las trans-sialidasas (Martin et al., 2006). Por lo tanto, si bien los linfocitos T CD8+ son capaces de eliminar efectivamente células infectadas mediante perforinas y su actividad citotóxica, sumado a la producción de IFN- γ (lo que favorece aún más las respuestas inflamatorias) (De Alencar et al., 2009), no logran eliminar la infección debido al retraso en su accionar y al fenómeno de inmunodominancia. Recientemente, se ha descubierto que los linfocitos Th17 tendrían un rol protectoro frente a la infección al contribuir a la activación de los linfocitos TCD8+ vía secreción de IL-21 que permite mantener la respuesta de estos linfocitos durante la fase crónica (Cai et al., 2016).

Por otro lado, la respuesta humoral específica mediada por linfocitos B también se ve retrasada. Esto se debe a que *T. cruzi* expone una amplia variedad de proteínas antigénicas en su superficie entre las que se encuentran las grandes familias proteicas como las mucinas, las MASPs y las trans-sialidasas codificadas por grupos de genes muy polimórficos, que se expondrán más adelante. La presencia de esta gran cantidad de antígenos produce una serie de respuestas de anticuerpos no neutralizantes lo que funciona como una pantalla de humo retrasando la producción de anticuerpos específicos (Cardoso et al., 2016). En este sentido es fundamental el rol del antígeno T-independiente SAPA, región repetitiva de las trans-sialidasas, que actúa como un activador policlonal de linfocitos B que conduce a una hipergammaglobulinemia contra este antígeno protegiendo la actividad del dominio catalítico (Buscaglia et al., 1999; Nardy et al., 2016). Se ha demostrado que las cepas de ratones resistentes a la infección producen una elevada respuesta de IgM totales seguida de una respuesta IgG2b contra antígenos específicos del parásito, sumado a un perfil de citoquinas tendiente a una respuesta Th1 celular para eliminar células infectadas. Mientras que en las cepas susceptibles, se desarrolla una elevada hipergammaglobulinemia (IgG1, IgG2a) con baja producción de anticuerpos específicos contra parásito, y con un perfil de citoquinas circulantes tipo Th2 (Bryan et al., 2010). Por lo tanto, no solo la activación policlonal de linfocitos B por parte de superantígenos o mitógenos, estaría asociado a los distintos patrones de respuesta humoral en hospedadores susceptibles y resistentes, sino también los perfiles de citoquinas que llevan a respuestas Th1 o Th2 (Bryan et al., 2010).

Como se ha expuesto de forma breve, *T. cruzi* tiene una enorme cantidad de mecanismos de evasión de la respuesta inmune muchos no mencionados incluso aquí como ser los mecanismos de evasión del sistema del complemento (Lidani et al., 2017; Wyllie & Ramirez, 2017).

Inmunopatogenia y manifestaciones clínicas

Después de un período de incubación de 2-3 semanas, la infección por *T. cruzi* se manifiesta por la presencia de un gran número de parásitos en el torrente sanguíneo y en diversos tejidos. Como se mencionó anteriormente, la infección aguda produce una activación excesiva del sistema inmune que incluye: citoquinemia (altos niveles plasmáticos de citoquinas), activación intensa de células B y T, linfadenopatía, esplenomegalia y procesos inflamatorios intensos asociados con nidos de parásitos dentro de los tejidos (Junqueira et al., 2010). Los síntomas de la fase aguda aparecen entre 1-2 semanas de la infección produciéndose desde un cuadro febril hasta miocarditis o meningoencefalitis severas (5-10% de casos sintomáticos) o incluso puede ser asintomática (Rassi et al., 2010). Entre los síntomas típicos, se incluyen: fiebre prolongada, malestar, agrandamiento del hígado, bazo y ganglios linfáticos, edema subcutáneo (localizado o generalizado); y, en el caso particular de transmisión por vectores, también se observan los signos de entrada de *T. cruzi* a través de la piel (chagoma) o a través de las mucosas oculares (Rassi et al., 2010) (Figura 1).

El desarrollo de una inmunidad adquirida efectiva, con una fuerte respuesta tipo T-helper-1 con células tanto CD4 como CD8, y la producción de citoquinas tales como IFN- γ , TNF- α , e IL-12, conduce al control de la parasitemia y el parasitismo (niveles de parásitos en los tejidos) (Junqueira et al., 2010). Sin embargo, el parásito no es eliminado completamente debido a la respuesta de IL-10 y TNF- β para disminuir la inflamación y el daño tisular, lo que se relaciona con la continuidad de replicación del parásito por la inhibición de la actividad tripanomicida de los macrófagos (Rassi et al., 2010). Así, la infección avanza hacia la fase crónica que perdura durante toda la vida del hospedador y se mantiene con escasa parasitemia y parasitismo. Los resultados de investigaciones en modelos murinos y de estudios clínicos humanos apoyan la hipótesis de que tanto una respuesta autoinmune como la respuesta inmune de citoquinas inflamatorias y quimiocinas impulsada por el parasitismo de bajo grado pero incesante, desempeñan un papel

fundamental en la generación de las lesiones del corazón que conducen a la cardiopatía chagásica (Bilate & Cunha-Neto, 2008).

Durante la infección crónica, el equilibrio entre la contención del parásito mediada por el sistema inmune y la inflamación dañina de los tejidos del huésped probablemente determina el curso de la enfermedad. Al comienzo de la fase crónica, la infección por *T. cruzi* es asintomática en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, a medida que avanza, el curso clínico se vuelve variable, desde la ausencia de síntomas hasta el desarrollo de una enfermedad grave con afectación cardiovascular y/o gastrointestinal en un 30% de los pacientes crónicos (Rassi et al., 2010). La patología del corazón se asocia a menudo con una miocarditis intensa, y con frecuencia conduce a cardiomegalia, insuficiencia cardíaca congestiva y arritmias (Bilate & Cunha-Neto, 2008). Si la respuesta inmunológica es ineficaz o, paradójicamente, conduce al daño tisular, tanto la carga parasitaria como la inflamación inmunomediada aumentan. Por el contrario, una respuesta inmune bien ejecutada, en la que se reduce la carga parasitaria y las consecuencias inflamatorias se reducen al mínimo, da como resultado un menor daño tisular (Rassi et al., 2010). La evaluación de las respuestas de citoquinas humanas durante la enfermedad de Chagas ha demostrado que los pacientes asintomáticos tienen una mayor proporción de IL-10 que TNF- α , en comparación con los pacientes cardíacos (Souza et al., 2007). Además, los altos niveles de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF- α están asociados con una patología grave (Cunha-Neto et al., 2009), estableciendo que el equilibrio entre las citocinas anti-inflamatorias y las citocinas inflamatorias es un determinante clave en la patogénesis de la enfermedad de Chagas (Junqueira et al., 2010; Medeiros et al., 2017).

Como se mencionó, las manifestaciones clínicas de la fase crónica de la infección van desde la ausencia de síntomas (forma indeterminada de la infección) hasta enfermedad severa agrupándose en formas clínicas cardíacas, digestivas y cardiodigestivas (Rassi et al., 2010). La forma digestiva se observa principalmente en Argentina, Brasil, Chile y Bolivia, siendo rara en el norte de Sudamérica, Centroamérica y México (Rassi et al., 2010). La disparidad en la distribución geográfica de los megasíndromes puede reflejar las divergentes filogeografías de los DTUs de *T. cruzi* (Zingales et al., 2012). La disfunción gastrointestinal (principalmente megaesófago, megacolon o ambos) se desarrolla aproximadamente en el 10-15% de los pacientes crónicamente infectados (Rassi et al., 2010). El megaesófago causa disfagia con odinofagia, combinada con dolor epigástrico, regurgitación, salivación excesiva y desnutrición en casos graves; mientras que el

megacolon frecuentemente produce constipación, distensión abdominal, diarrea y ocasionalmente obstrucción del intestino grueso (Pinazo et al., 2010; Rassi et al., 2010). Por otro lado, la forma cardíaca es la manifestación más grave y frecuente de la enfermedad de Chagas crónica. Se desarrolla en el 20-30% de los individuos y típicamente conduce a anomalías del sistema de conducción del corazón (típicamente, bloqueo de rama derecha y bloqueo fascicular anterior izquierdo), bradiarritmias y taquiarritmias, aneurismas apicales, insuficiencia cardíaca, tromboembolismo y muerte súbita, siendo esta última la principal causa de muerte en pacientes con cardiopatía chagásica (Rassi et al., 2010). La muerte cardíaca súbita puede ocurrir incluso en pacientes que fueron previamente asintomáticos. La asociación de enfermedad cardíaca con megaesófago o megacolon, o ambas define la forma cardiodigestiva de la enfermedad de Chagas pero la prevalencia exacta de la forma cardiodigestiva no se conoce debido a la escasez de estudios apropiados (Rassi et al., 2010).

Tratamiento

El tratamiento de la infección por *T. cruzi* tiene como objetivo la eliminación del parásito del individuo infectado para disminuir la probabilidad de desarrollar enfermedad chagásica sintomática y de transmisión a individuos sanos. Los fármacos utilizados para el tratamiento desde finales de la década de los 60' son el nifurtimox y/o el benznidazol (Sosa-Estani et al., 2009; WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). En un principio el tratamiento era aplicado sólo en pacientes cursando la fase aguda de la infección y en bebés infectados por vía congénita con hasta un 80% y 99% de curación (seroconversión y parasitemia negativa), respectivamente. Varios estudios clínicos demostraron luego que ambos fármacos son altamente efectivos también en niños con infección crónica (hasta 70% de efectividad) (Sgambatti de Andrade et al., 1996; Sosa-Estani & Segura, 2006).

Por otro lado, el tratamiento de pacientes adultos en fase crónica es un tema muy controversial debido a la frecuencia de los efectos secundarios y a las dificultades para evaluar la efectividad del tratamiento (Sosa-Estani & Segura, 2006; Viotti et al., 2014). Durante años prevaleció, además, la idea de la inutilidad de la terapia antiparasitaria en estos pacientes basado en la teoría de que la fisiopatología de la enfermedad es debida a procesos autoinmunes y no a procesos inflamatorios disparados por la persistencia del parásito en los tejidos (Sosa-Estani &

Segura, 2006; Sosa-Estani et al., 2009; Viotti et al., 2014). La evidencia actual apunta a que ambos procesos tienen relevancia en la patología de la cardiopatía chagásica (Bilate & Cunha-Neto, 2008; Urbina, 2010). Varios estudios tanto en Argentina como otros países han demostrado que los pacientes tratados demuestran no sólo seroconversión y/o cura parasitológica sino también una disminución del progreso de la condición clínica demostrando inclusive cambios electrocardiográficos, en comparación a pacientes no tratados (Viotti et al., 1994, 2006; Fabbro De Suasnábar et al., 2000). Estos trabajos apoyan la hipótesis de que la persistencia del *T. cruzi* es un estímulo necesario para la respuesta inflamatoria crónica que resulta en daño tisular y que, por lo tanto, el tratamiento etiológico en pacientes crónicos debe ser indicado (Urbina, 2010; Viotti et al., 2014). Se esperaba que el BENEFIT (Evaluación de Benznidazol para Interrumpir la Tripanosomiasis), que fue un ensayo intencional a gran escala, multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo, pruebe la hipótesis de que la terapia con benznidazol es beneficiosa para pacientes con enfermedad cardíaca chagásica crónica (WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). Sin embargo, este trabajo demostró en base al análisis de casi 3000 pacientes con cardiomiopatía chagásica procedentes de distintos países, que la terapia tripanomicida con benznidazol si bien redujo significativamente la detección del parásito en suero, no disminuyó el deterioro en la condición clínica cardíaca tras 5 años de tratamiento (Morillo et al., 2015). Por lo que, la controversia continúa y el cambio de paradigma sobre el tratamiento etiológico en pacientes crónicos no es tan sencillo debido a la cantidad de estudios discordantes. Estas discordancias podrían deberse a diferencias en: las poblaciones estudiadas, los métodos de evaluación utilizados, los esquemas terapéuticos aplicados, la duración del seguimiento, el criterio de cura o posibles diferencias regionales tanto de hospedador como de cepas de parásitos (Viotti et al., 2014; Morillo et al., 2015; Pecoul et al., 2016).

Los resultados del BENEFIT si bien son desalentadores, representan un llamado de atención sobre la urgencia de investigación en nuevas terapias y mejoras en el diagnóstico de la infección (Pecoul et al., 2016). Las principales limitantes del uso del nifurtimox y el benznidazol se deben a que se aplican en tratamientos prolongados (60 días) y tienen efectos secundarios frecuentes que pueden conducir a la discontinuación del tratamiento. Además, ambos fármacos son genotóxicos, lo que impide el tratamiento durante el embarazo. Otra limitante del uso de estos fármacos principalmente en la fase crónica, es la falta de herramientas diagnósticas para seguir el tratamiento y evaluar la curación (WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). Las pruebas parasitológicas si bien pueden indicar falla terapéutica cuando son

positivas, dado su baja sensibilidad no aseguran ausencia del parásito cuando son negativas. Mientras que la serología puede permanecer reactiva en los pacientes durante varios años después del tratamiento, incluso en aquellos que están curados. Otras limitaciones básicas en el manejo de los pacientes infectados son la baja cobertura de medicamentos y la falta de una prueba diagnóstica adecuada para los bebés nacidos de madres infectadas (WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). Además, la Organización Mundial de la Salud establece que es prioritaria la producción de nuevos fármacos que proporcionen un tratamiento más corto con menos efectos secundarios y la elaboración de formulaciones pediátricas (WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). Entre los enfoques más prometedores en este sentido, se encuentran: los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol, como el posaconazol y el ravuconazol; inhibidores de cruzipaína, la principal cisteín-proteasa de *T. cruzi*; bisfosfonatos, que inhiben la farnesil-pirofosfato sintasa del parásito; e inhibidores de la síntesis de tripanotión (Urbina, 2010).

Diagnóstico

Existen distintos métodos de diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, cuya efectividad y aplicabilidad depende en gran parte de la fase de la infección. En humanos, durante la fase aguda en la que los parásitos circulan en la sangre, el diagnóstico se basa en métodos parasitológicos, como el Strout, microhematocrito, microtubo, gota fresca, gota gruesa (estos cuatro últimos apropiados en niños y neonatos por el bajo volumen de sangre que emplean, ~0.3 mL), xenodiagnóstico o hemocultivo («Programa Nacional de Chagas», 2006). Estas técnicas a pesar de ser específicas poseen baja sensibilidad (20-50%) y, además, pueden requerir largos tiempos de incubación. En esta fase también pueden aplicarse métodos serológicos, especialmente aquellos que utilizan antígenos marcadores de infección temprana (Mallimaci et al., 2010; Volta et al., 2015). Mientras que la fase crónica de la enfermedad, se caracteriza por una baja parasitemia que impide la detección de parásitos por métodos directos. El diagnóstico en esta fase es esencialmente serológico incluyendo básicamente tres tipos de pruebas convencionales: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Hemoaglutinación Indirecta (HAI) y Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) (Balouz et al., 2017). La mayoría de estas pruebas de serología convencional tienen sensibilidades de entre 94-99.5% y especificidades de 94-96% (WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). Para que el diagnóstico

de la infección chagásica sea certero en un 95% es recomendable aplicar dos ensayos de serología convencional y tres ensayos para que lo sea en un 98% (World Health Organization, 2007). Por lo tanto, la confirmación de la infección en un paciente requiere de al menos dos de tres pruebas serológicas positivas.

Las pruebas serológicas comerciales disponibles en la actualidad emplean ya sea homogenados proteicos totales (extractos crudos) de *T. cruzi*, fracciones del parásito semi-purificadas o antígenos recombinantes (kits de primera, segunda y tercera generación, respectivamente). Estos últimos, empezaron a producirse hacia finales de los 80', con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante que permitió la generación de bibliotecas de ADN o ADNc del parásito y, en consecuencia, el descubrimiento y clonado de numerosos antígenos de *T. cruzi* (Da Silveira et al., 2001; Balouz et al., 2017). El uso de los antígenos recombinantes en las técnicas serológicas, trajo ventajas en relación a los homogenados totales o fracciones antigénicas del parásito, como ser la facilidad de producción y su mayor especificidad a la hora de discriminar entre infecciones con parásitos emparentados y con áreas endémicas solapadas como *Leishmania spp.* (Umezawa et al., 1999, 2009; Da Silveira et al., 2001; Caballero et al., 2007; Gil et al., 2011). Hoy en día muchos de los kits de inmunodiagnóstico comerciales utilizan antígenos recombinantes resultando en elevados valores de especificidad y sensibilidad (Balouz et al., 2017). Sin embargo, se han reportado discordancias al estudiar con un mismo kit, muestras provenientes de distintos países que difieren en los linajes del parásito circulantes. El kit de ELISA Chagatest recombinante de Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina), por ejemplo, demuestra una sensibilidad del 100% en pacientes chagásicos de países del Cono Sur pero al ser evaluado en sueros de pacientes de Centro América tiene una sensibilidad menor, de entre 81% (pacientes crónicos de Panamá) y 95% (pacientes crónicos de Colombia) según un estudio realizado previamente (Ramírez et al., 2009). Otros estudios multicéntricos han corroborado que hay diferencias de reactividad ante los distintos antígenos recombinantes según el origen de las muestras de sueros (Da Silveira et al., 2001; Otani et al., 2009). De manera similar, los kits que utilizan extractos proteicos de epimastigotes como antígeno, sumado a su baja especificidad principalmente frente a infecciones con parásitos emparentados, presentan sensibilidades variables que llevan a resultados discrepantes e inconclusos (faltos negativos y/o falsos positivos) (Otani et al., 2009). En los capítulos II y III, se tratarán en mayor detalle los antecedentes sobre el uso de antígenos recombinantes para el inmunodiagnóstico de la infección en humanos y en reservorios domésticos (perros), respectivamente.

El diagnóstico de la infección también puede lograrse mediante la detección de material genético del parásito por la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction). Las secuencias blanco de amplificación mediante esta técnica más utilizadas son la regiones hipervariables del minicírculo (ADNk) y una región con repeticiones en tándem del ADN nuclear (stDNA) del parásito (Ramírez et al., 2009). Si bien la PCR (ya sea convencional o cuantitativa) es una técnica 100% específica, no es tan sensible como los métodos serológicos convencionales. Su sensibilidad depende en gran parte de los target escogidos para la amplificación, de la parasitemia y, por lo tanto, de la fase de la infección variando alrededor del 45%-75%, mediante PCR convencional, y alcanzando hasta el 80%-84% mediante qPCR, en pacientes crónicos (Castro et al., 2002; Ramírez et al., 2009; Schijman et al., 2011; Ramirez et al., 2015). La detección del ADN del parásito en pacientes infectados puede ser incrementada mediante la evaluación de muestras seriadas (Castro et al., 2002; Bisio et al., 2011). Por su parte, en bebés congénitos de hasta 6 meses de vida se ha reportado un 100% de sensibilidad en la detección de *T. cruzi* mediante PCR (Schijman et al., 2003).

Lo mencionado da cuenta de que se requieren herramientas diagnósticas sensibles y específicas que utilicen reactivos que no sean susceptibles al origen geográfico y/o a las cepas infectantes de los pacientes evaluados. La secuenciación del genoma de *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005), los avances bioinformáticos para análisis genómicos o proteómicos y el desarrollo de las tecnologías de generación de péptidos sintéticos representan una combinación de estrategias útiles para la identificación y construcción de nuevos candidatos vacunales y de diagnóstico (Cooley et al., 2008; Carmona et al., 2015). Como se ha demostrado recientemente, la construcción de péptidos sintéticos conteniendo epítopes claves de ciertos antígenos de *T. cruzi*, resulta no sólo en una facilidad de producción de los reactivos sino también en una elevada eficiencia diagnóstica en ensayos de ELISA de “nueva generación” (Balouz et al., 2015; Durante et al., 2017; Mucci, Carmona, et al., 2017). La investigación en nuevos antígenos de *T. cruzi* ya sea completos o péptidos de su secuencia, y su aplicación como herramientas diagnósticas o inmunizantes, es necesaria para superar las limitaciones mencionadas.

El perfeccionamiento de las herramientas diagnósticas disponibles para la infección por *T. cruzi* y/o el desarrollo de nuevas, se encuentran entre las prioridades de investigación sobre la enfermedad propuestas por la Organización Mundial de la Salud (2007). Como se ha mencionado, por un lado, es frecuente la ocurrencia de resultados inconclusos en la serología de pacientes crónicos por lo cual se requieren de dos o más pruebas serológicas, y en algunos casos, de la

confirmación por PCR (Modolo-Picka et al., 2007). Probablemente esto sea debido a la variación genética entre los distintos linajes de *T. cruzi* o a la capacidad del parásito de evadir la respuesta inmune del hospedador mediante mecanismos diversos. A estas problemáticas se suma la necesidad de nuevas herramientas para el seguimiento y confirmación de cura en pacientes en tratamiento así como la falta de un ensayo que permita predecir la evolución clínica de las formas crónicas (Sosa-Estani et al., 2009). Si bien la técnica de PCR es útil para confirmar falla terapéutica, su baja sensibilidad en la etapa crónica de la infección puede conducir a falsos negativos que se interpreten incorrectamente como cura tras la terapia antiparasitaria. En este sentido, es necesaria la búsqueda de antígenos que funcionen como marcadores biológicos de carga parasitaria y que puedan ser utilizados en técnicas de inmunodiagnóstico para mencionado propósito (Santamaría et al., 2013). Este tema se ampliará en el capítulo II de esta tesis.

Otra de las prioridades de investigación sugeridas por la OMS es desarrollar nuevos modelos de vigilancia epidemiológica y modelos que permitan evaluar la efectividad de los programas de control (World Health Organization, 2007). En este sentido, se ha demostrado que los perros actúan como verdaderos centinelas de la transmisión de la infección por *T. cruzi* debido al papel epidemiológico que cumplen como reservorios en el ciclo de transmisión doméstica (Gürtler et al. 2005; Gürtler et al. 2007; Gürtler et al. 2009). Por ello, el diagnóstico adecuado de la infección en estos animales constituye una herramienta importante para el seguimiento de programas de rociamiento con insecticidas en aquellas áreas de transmisión activa y para estimar el riesgo de transmisión al hombre (Gürtler et al. 1990; Cardinal et al. 2006). Se profundizará en estos aspectos en el capítulo III.

Proteínas de superficie de *T. cruzi*

A medida que *T. cruzi* atraviesa los distintos estadios de su ciclo vital sufre modificaciones morfológicas y bioquímicas, entre ellas el remodelado de la cubierta proteica que expresa en su superficie. La cubierta de *T. cruzi* está formada principalmente por glucoconjugados con anclaje glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) organizadas en dos capas yuxtapuestas de mucinas O-glicosiladas en la parte superior y, por debajo, gluco-inositol-fosfolípidos (GPILs). En menor proporción y esparcidos en la superficie, se encuentran otras glucoproteínas como: trans-sialidasas (TS), proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASPs), glucoproteínas Gp85, el antígeno TSSA

(antígeno pequeño de superficie de tripomastigote) y antígenos ToIT (Mucci, Lantos, et al., 2017). Esta gran cantidad de proteínas se disponen de manera organizada en balsas lipídicas o “lipid rafts” donde proteínas y lípidos se agregan para cumplir funciones específicas en la superficie del parásito (Mucci, Lantos, et al., 2017). A continuación se describirán brevemente las familias de proteínas de superficie de *T. cruzi* más relevantes.

Mucinas

En la actualidad se considera que las mucinas son las proteínas de composición mayoritaria en la superficie de *T. cruzi*. Estas glucoproteínas O-ligadas tienen una secuencia con extremos N-terminal (péptido señal) y C-terminal (anclaje GPI) conservados y un núcleo variable de entre 50-200 aminoácidos rico en residuos de Serina y Treonina, que se O-glicosilan con oligosacáridos (Buscaglia et al., 2006). El genoma de *T. cruzi* (CL Brener) contiene 863 genes de mucinas que se agrupan en dos familias: TcMUC (844 genes) y TcSMUG (19 genes), que se diferencian según el estadio del parásito en el que se expresan, ya sea en los estadios del hospedador mamífero o del vector (El-Sayed et al., 2005). Por su parte, la familia TcMUC incluye proteínas que se expresan en los estadios tripomastigote o amastigote del mamífero y se subdivide en tres grupos: TcMUC I, TcMUC II y TSSA (TcMUC III) (Buscaglia et al., 2006). Las proteínas de TcMUC I se caracterizan por un núcleo central con repeticiones en tándem que principalmente se expresan en amastigotes. Por su parte, los miembros de TcMUC II carecen de las repeticiones en la región central y se expresan principalmente en tripomastigotes. Una característica distintiva de la familia TcMUC II es que una proporción de sus genes están ligados en el genoma a los genes de las trans-sialidasas, que se discutirán más adelante. Por último, el antígeno TSSA, a pesar de pertenecer a la familia TcMUC, se diferencia de los grupos I y II en que consiste en polipéptidos cortos que carecen de regiones ricas en Treonina (Buscaglia et al., 2006). Este antígeno es altamente inmunogénico y es codificado por un gen de copia única con dos isoformas que se diferencian en la secuencia de la región central: el alelo TSSA-I se restringe a los linajes TcI, TcIII y TcIV (previamente linajes TcI, TcIIb y TcIIc), mientras que el alelo TSSA-VI (denominado en un principio como TSSA-II) se restringe a los linajes TcII, TcV y TcVI (previamente, TcIIa, TcIIId y TcIIe) (Di Noia et al., 2002; Bhattacharyya et al., 2010). En consecuencia, se propuso a este antígeno como el primer marcador inmunológico de linaje infectante mediante técnicas serológicas. Se ha comprobado experimentalmente que TSSA VI reacciona con sueros de humanos

infectados con TcII, TcV y TcVI y con sueros de ratones infectados experimentalmente con TcII y TcVI; mientras que TSSA I reacciona con pacientes, ratones y conejos infectados con TcI aunque con menor reactividad (Di Noia et al., 2002; Bhattacharyya et al., 2010; Risso et al., 2011; Balouz et al., 2015). Por último, las mucinas de la familia TcSMUG se caracterizan por un núcleo central con secuencia más corta que el resto de las mucinas comentadas anteriormente y se expresan en el estadio epimastigote (Buscaglia et al., 2006).

La heterogeneidad y diversidad de la capa de mucinas expresadas en la superficie de los estadios de *T. cruzi* presentes en el vector y en los estadios presentes en el hospedador mamífero tienen grandes implicancias a nivel biológico (Buscaglia et al., 2006). Las mucinas que se expresan en la superficie de los estadios epimastigote y tripomastigote metacíclico, tendrían un rol protectorio contra las proteasas presentes en el tracto digestivo del vector insecto triatomino. Por otro lado, en el caso de los tripomastigotes metacíclicos y de tripomastigotes sanguíneos, las mucinas, además, estarían implicadas en la adhesión e invasión de las células del hospedador mamífero. Uno de los roles más destacados de las mucinas es funcionar como aceptoras del ácido siálico que es transferido desde la superficie de las células hospedadoras por la enzima trans-sialidasa, lo que les permite evadir el sistema inmune del mamífero como se verá en la sección siguiente. Por otro lado, se ha reportado que el antígeno TSSA VI funcionaría como una adhesina facilitando también la internalización de *T. cruzi* en las células hospedadoras (Cánepa et al., 2012; Cámara et al., 2017).

Trans-sialidasas

Las trans-sialidasas (TS) constituyen el principal factor de virulencia de *T. cruzi* y son unas de las enzimas más estudiadas de este parásito (Freire-De-Lima et al., 2015). Estas enzimas forman parte de la superfamilia de las trans-sialidasas (TcTS) formada por 1430 genes con 693 pseudogenes (El-Sayed et al., 2005). Los genes TcS se agrupan en 8 grupos o subfamilias (TcTS I-VIII), donde el grupo TcTS I incluye las 19 secuencias que codifican para TS enzimáticamente activa y el resto incluye genes relacionados con la adhesión celular e invasión (TcTS II), inhibición del sistema del complemento (TcTS III) o genes de función desconocida (TcTS IV-VIII) (Freitas et al., 2011). Las trans-sialidasas (TcTS-I) tienen una estructura particular con un dominio N-terminal responsable de la función catalítica y C-terminal con un anclaje GPI. Esta última región C-terminal

se denominó SAPA (shed acute phase antigen) y se compone de repeticiones en tándem de 12 aminoácidos (Affranchino et al., 1989). Como se mencionará más adelante, SAPA tiene un papel fundamental en prolongar la vida media de la enzima en la sangre (Buscaglia et al., 1999).

El accionar de la enzima trans-sialidasa se basa en transferir el ácido siálico presente en la superficie de las células del mamífero a los glicoconjugados en la superficie del parásito (Previato et al., 1985). Este ácido es fundamental para las interacciones célula-célula de estas especies y de otros eucariotas (Frasch, 2000). *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico *de novo* por lo que utiliza la trans-sialidasa para transferir este monosacárido desde los sialil-glucoconjugados en la superficie de las células del hospedador a las B-galactosas terminales de las mucinas presentes en su superficie. Esta estrategia permite al parásito evadir tanto las barreras innatas como adaptativas del sistema inmune (Nardy et al., 2016). Por un lado, una vez cubierto con moléculas de ácido siálico del hospedador, *T. cruzi* evita la formación de la convertasa de C3 sobre su superficie previniendo así la lisis mediada por el complemento. Además, la unión del ácido siálico a receptores específicos en la superficie de las células dendríticas inhibe la producción de la citoquina proinflamatoria IL-12, inhibiendo así la activación de las células Th1 y, por lo tanto, la activación del sistema inmune adquirido (Erdmann et al., 2009). Por último, la región repetitiva SAPA es altamente inmunogénica y actúa como una “pantalla de humo”, engañando al sistema inmune adaptativo del hospedador, induciendo la producción de anticuerpos no protectivos contra la región repetitiva encubriendo la actividad de la trans-sialidasa y aumentando su vida media en la sangre (Nardy et al., 2016).

MASP: Proteínas de superficie asociadas a mucinas

Los miembros de la familia proteica MASP (*mucin-associated surface protein*) tienen también dominios N- y C-terminales conservados que codifican para un péptido señal y un sitio de anclaje GPI, respectivamente. La región central es variable en secuencia y longitud y contiene una gran cantidad de motivos repetitivos. Esta familia contiene una gran cantidad de genes (representan el 6% del genoma de *T. cruzi*) que están asociados espacialmente a los genes de TcMUCII (corriente arriba de los genes MASP) y también frecuentemente a los genes de la superfamilia gp85/TS-like (corriente debajo de los genes MASP) (Bartholomeu et al., 2009). Las MASPs se expresan en la superficie del estadio tripomastigote infeccioso del parásito durante la

fase aguda de la infección pudiendo también ser secretadas al torrente sanguíneo quedando expuestas al sistema inmune del hospedador (Bartholomeu et al., 2009; dos Santos et al., 2012). Los miembros de esta familia proteica contribuirían, junto con otros antígenos repetitivos como ser SAPA, a la activación policlonal de linfocitos B que lleva a una hipergammaglobulinemia durante la fase aguda de la infección retrasando la respuesta humoral específica y neutralizante contra el parásito y, por lo tanto, evadiendo su eliminación (Bermejo et al., 2011; dos Santos et al., 2012).

La Familia Proteica TcTASV

Hace no más de una década, la familia proteica TcTASV fue descubierta en el marco de un proyecto de investigación cuyo objetivo era la búsqueda de nuevos antígenos para diagnóstico o control del parásito centrando la atención en el estadio infectivo tripomastigote (Tekiel et al., 2009; García et al., 2010). La construcción de bibliotecas substractivas de ADNc de tripomastigotes resultó en una estrategia valiosa para detectar transcritos de ARNm que se expresan en mayor medida en éste estadio del parásito y cuya expresión le permitirían invadir y diseminarse en el huésped evadiendo la respuesta inmune del mismo. García *et al.*, 2010, construyeron una biblioteca de ADNc de tripomastigotes substraída con ADNc de epimastigotes (*TcT-E library*) a partir de la cual lograron identificar esta nueva familia de genes. De los 403 clones secuenciados de esta biblioteca, el 46% no tenía homología con ninguna secuencia de las bases de datos de proteínas ni de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de tripanosomátidos estudiadas, por lo que se trataba de secuencias nunca antes descritas. El análisis posterior logró identificar que un gran número de los componentes de la biblioteca tenían parte de una secuencia consenso de 280pb con características de 3'UTR, a la cual llamaron TcT-Eelem (Figura 5).

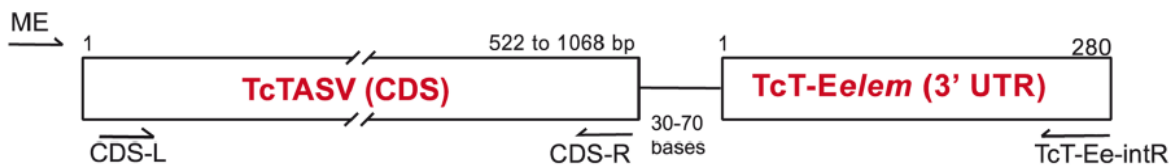


Figura 5 Esquema de las posiciones relativas de las secuencias codificantes (CDS) de la familia TcTASV y el TcT-Eelem. El TcT-Eelem se localiza 30-70 pb río abajo del codón de finalización de la traducción en varias secuencias codificantes. Extraído de (García *et al.*, 2010).

La secuencia del elemento TcT-Eelem fue utilizada para una búsqueda en la primera versión “borrador” del genoma de *T. cruzi* (versión no ensamblada) y se determinó la posición del elemento río abajo de algunos ORFs (marcos abiertos de lectura, por sus iniciales en inglés, *Open Reading Frame*). El TcT-Eelem fue siempre localizado 30-70 pb río abajo del codón de finalización de la traducción de las secuencias codificantes (CDS), en diferentes contigs del genoma (Figura 5). Algunos de los fragmentos de las CDS asociados al TcT-Eelem encontrados por el análisis bioinformático, también estaban presentes en la biblioteca TcT-E (García et al., 2010). La búsqueda de marcos abiertos de lectura asociados al TcT-Eelem y el análisis de estas secuencias, indicaba que los distintos CDSs también tenían características comunes, por ejemplo: regiones codificantes 5' y 3' muy similares. Las observaciones experimentales y computacionales sugerían la presencia de una nueva familia de proteínas con características conservadas como los extremos amino- y carboxi- terminales y la región 3'UTR del ARN mensajero.

Para un análisis más exhaustivo se realizaron ensayos de RT-PCR para el estudio de transcritos completos. Se diseñó un cebador antisentido específico para el extremo 3' del TcT-Eelem (TcT-Ee-intR) y un cebador sentido específico para el miniexon de *T. cruzi* (ME) (Figura 5). En paralelo, se realizaron otras reacciones de RT-PCR para amplificar los CDSs codificantes para la nueva familia de proteínas independientemente de la región no codificante, con cebadores diseñados sobre los extremos codificantes 3' y 5' (CDS-L y CDS-R, Figura 5). Los productos obtenidos fueron clonados y secuenciados. Las regiones codificantes de las secuencias fueron conceptualmente traducidas y alineadas, confirmando que pertenecían a una familia multigénica con extremos amino- y carboxi- terminales conservados y una región central variable (Figura 6). Ya que la composición de las proteínas estaba enriquecida en Alaninas, Serinas y Valinas, y fueron identificadas a partir de una biblioteca de *T. cruzi* enriquecida en cDNA de tripomastigotes, la familia fue nombrada TcTASV (Tripomastigotes, Ala, Ser y Val). De acuerdo a la longitud de la región central inicialmente se definieron tres sub-familias (A, B y C). Todas las proteínas tenían un péptido señal y una secuencia consenso de adición de ancla GPI (Figura 6), sugiriendo que las mismas podrían estar localizadas en la superficie del parásito. Los pesos moleculares predichos para las proteínas de las sub-familias A, B y C fueron de 18kDa, 27kDa y 36kDa, respectivamente.

Esta nueva familia proteica se encontraría solo en *T. cruzi* ya que no se encontraron ortólogos de secuencia en tripanosomátidos emparentados, como *Leishmania spp.* o *T. brucei*, anticipando su potencial especificidad. La posición superficial de estas proteínas, y sus regiones

conservadas hacen inevitable su familiarización con otras familias de proteínas de superficie de *T. cruzi*. Sin embargo, un análisis comparativo entre las secuencias de los miembros de TcTASV, MASPs, TcMUCII y genes mucin-like, demostró que cada una de estas familias diverge en una rama diferente del árbol filogenético, reforzando la idea de que son familias diferentes y que los genes TcTASV descritos forman parte de un novedoso y prometedor descubrimiento (García et al., 2010).

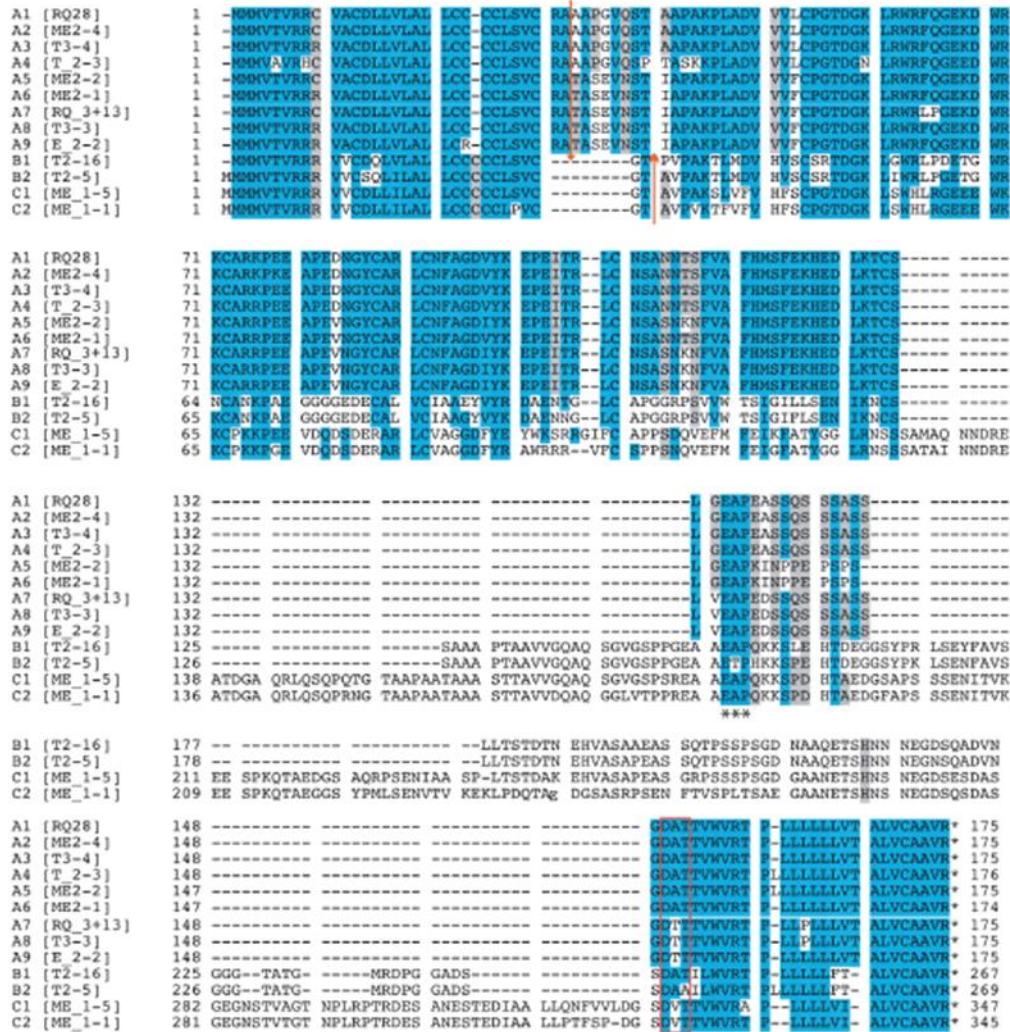


Figura 6 Familia TcTASV: regiones codificantes. Alineamiento de las 13 secuencias de la familia TcTASV inicialmente identificadas en la cepa CL Brener por RT-PCR, clonado y secuenciación. Todos los miembros de la familia comparten extremos amino- y carboxi- terminales conservados, un péptido señal (la flecha muestra el sitio de clivaje predicho) y una secuencia consenso de adición de ancla GPI (caja roja). Inicialmente, se identificaron 3 sub-familias según identidad de secuencias y peso molecular predicho de las proteínas. Cada secuencia alineada se nombra con una letra mayúscula (A, B o C), según la subfamilia que se trate, seguido de un número indicando el miembro.

La familia multigénica TcTASV presenta en la cepa CL Brener (linaje TcVI) 38 miembros distribuidos en las 3 subfamilias TcTASV-A (20 miembros), TcTASV-B (5 miembros) y TcTASV-C (13 miembros) (García et al., 2010; Bernabó et al., 2013). Todos los miembros de la familia contienen el motivo aminoacídico conservado *tasv_all* (VX₁X₂X₃[CS]X₄X₅TDGX₆LX₇W) y cada subfamilia se caracteriza no sólo por la longitud y secuencia del núcleo variable sino también por poseer aminoácidos distintivos en las posiciones indeterminadas del motivo *tasv_all*. La presencia de estos genes también fue estudiada en las cepas Dm28 y RA, de los linajes de TcI y TcVI aislados de Venezuela y de Argentina, respectivamente (García et al., 2010), tras lo cual se obtuvieron 76 secuencias únicas: 48 para RA y 28 para Dm28. Por otro lado, se identificó una subfamilia adicional a la que se denominó TcTASV-W con características mixtas de TcTASV-A (secuencia aminoacídica) y TcTASV-C (longitud de secuencia). En la Tabla 1 se resumen las características de las distintas subfamilias de TcTASV.

Tabla 1. Características generales de las subfamilias TcTASVs

	TcTASV-A	TcTASV-B	TcTASV-C	TcTASV-W
Cantidad genes (aprox.)	15-20	2-10	15-20	2-4
Número de aminoácidos (aprox.)	175-230	240-270	330-360	230-300
<i>tasv_all</i> : aa X ₄ y X ₅	Pro-Gly	Ser-Arg	Pro-Gly	Ala-Glu
Diversidad (n° de genes) en las cepas (Ziliani, 2014):				
CL Brener (TcVI)	21	4	12	3
Dm28 (TcI)	13	0	15	6
RA (TcVI)	18	10	20	0

Hipótesis de trabajo

Dada su relativa novedad, hasta el momento del inicio de este trabajo no se habían realizado estudios relacionados con el potencial de estos antígenos como herramientas diagnósticas, evaluando su especificidad para determinar exclusivamente infección por *T. cruzi*. Se plantea que los antígenos pertenecientes a la familia TcTASV son útiles para el diagnóstico

específico de la infección por *T. cruzi* debido a que resultan de la expresión diferencial en las formas infectivas tripomastigotes, se expresan en su superficie y no comparten homología de secuencias con los genomas de *Leishmania spp.*, los tripanosomatidos más cercanamente emparentados y con áreas endémicas solapadas. Estas moléculas podrían ser aplicables no sólo en la detección de la infección en humanos sino también en reservorios domésticos con implicancias en estudios epidemiológicos de la dinámica de transmisión y evaluación de campañas antivectoriales.

Planteada la necesidad de mejorar ciertos aspectos específicos del diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, en esta tesis se propuso llevar a cabo una evaluación completa de las potenciales bondades mencionadas de esta familia de antígenos, contribuyendo a mejorar sensiblemente los aspectos indicados.

Objetivo general:

Estudiar la familia de proteínas TcTASV como herramienta para el diagnóstico de la infección humana y de reservorios domésticos.

Objetivos específicos:

1. Expresar y purificar de manera soluble proteínas recombinantes de las subfamilias TcTASV-A, B y C.
2. Evaluar la sensibilidad diagnóstica de los antígenos recombinantes de las subfamilias A, B y C de la familia TcTASV, en sueros de pacientes infectados con *T. cruzi*.
3. Determinar la especificidad serológica de las mencionadas proteínas recombinantes, considerando otras patologías infecciosas.
4. Indagar la utilidad de la familia TcTASV en el seguimiento serológico de pacientes tratados con benznidazol.
5. Estudiar la utilidad de TcTASV para el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* en perros, de interés fundamental en estudios epidemiológicos del ciclo de transmisión doméstico de la infección.

Capítulo I: Producción heteróloga de miembros de la familia proteica TcTASV de *T. cruzi*

I.1. Introducción

Primeras aproximaciones al estudio de la familia TcTASV: Clonado y estudio de patrones de expresión

Las primeras aproximaciones de nuestro grupo para el estudio de esta nueva familia de proteínas comenzaron con ensayos para conocer su antigenicidad y patrón de expresión en el parásito. Para lo cual, se procedió al clonado y expresión de algunos genes en sistemas bacterianos y la utilización de estas proteínas recombinantes para producir antisueros específicos en conejos y/o ratones. Los primeros intentos por obtener las proteínas TcTASV, se basaron en el clonado de la secuencia completa de la proteína TcTASV-C empleando el vector pQE, de modo de producir la proteína fusionada a una corrida (tag) de 6 histidinas (Bernabó, 2008). Se eligió esta proteína ya que había sido previamente identificada en un pool de antígenos vacunales protectivos (Tekiel et al., 2009). El clonado y expresión de la TcTASV-C completa fusionada a histidina fracasó, no pudiendo evidenciarse la proteína mediante SDS-PAGE ni mediante Western-Blot utilizando anticuerpos producidos contra el tag de fusión. Las posibles explicaciones planteadas en ese momento fueron que: la señal de clivaje de la proteína TcTASV-C fuera reconocida en el sistema bacteriano (produciéndose una proteína recombinante clivada en el extremo amino que separaría la cola de histidinas del resto de la proteína, impidiendo su visualización por Western Blot); o que la His6-TcTASV-C fuera secretada al medio de cultivo (clivada o no) lo cual impediría su detección por tanto por SDS-PAGE como por Western-Blot (Bernabó, 2008). Por lo tanto, como alternativa se clonó una región de la secuencia excluyendo las regiones hidrofóbicas y la señal de clivaje predicha (aminoácidos 34 a 319 de la proteína completa, peso predicho de 29 kDa). De esta forma se

esperaba evitar la posible liberación de la proteína al medio o su degradación debido al plegamiento incorrecto. Del mismo modo, los intentos de expresar esta nueva construcción pQE-TcTASV-C₃₄₋₃₁₉ fracasaron. Se decidió entonces clonar el inserto de la secuencia truncada fusionada a GST, en vector el pGEX. Tras transformar e inducir bacterias *E. coli*, se evidenció la proteína TcTASV-C_{GST} en los lisados de los cultivos de bacterias mediante SDS-PAGE, siendo posible su purificación posterior mediante columnas apropiadas (Bernabó, 2008).

Si bien las predicciones bioinformáticas indicaban la presencia de numerosos sitios de glicosilación y fosforilación y la expresión de las proteínas en superficie, se realizó el estudio experimental de los patrones de expresión y localización de las proteínas TcTASV. Inicialmente y con tal fin, se produjeron anticuerpos específicos anti-TcTASV-C (depletados de anticuerpos anti-GST) en conejos o ratones. Por otro lado, se produjeron anti-sueros contra un péptido sintético de la región conservada de la familia TcTASV-A (amino ácidos 57-72 de GenBank AM492199, en conejo) (García et al., 2011). Mediante ensayos de inmunofluorescencia, marcación *in vivo* y Western-Blot, se determinó que TcTASV-C se expresa como una proteína de ~60 kDa principalmente en el estadio tripomastigote y con abundancia relativa diferente entre cepas (CL Brener>Sylvio>RA) (García et al., 2011). La diferencia de tamaño de la proteína nativa versus el peso molecular predicho de la apoproteína (~36kDa) probablemente sea debido a las múltiples modificaciones post-traduccionales, mayormente glicosilaciones. De hecho, se comprobó experimentalmente que los miembros de TcTASV-C están altamente glicosilados y fosforilados (Bernabó et al., 2013). La detección de TcTASV-C en sobrenadantes de medio de cultivo de tripomastigotes, sugería su expresión en superficie y el shedding, lo que fue confirmado por análisis de citometría de flujo luego de la marcación de tripomastigotes vivos con anti-TcTASV-C, observándose, además, una expresión diferencial entre cepas (CL Brener: 57%, RA: 24%) (García et al., 2011).

Mediante IFI, se determinó que los tripomastigotes expresan TcTASV-C en la superficie celular, con una distribución discreta, como puntos o spots; además también se observaba -en un mismo campo- parásitos fuertemente marcados y otros con intensidad intermedia o sin marca (Figura I.1). Por otra parte, TcTASV-A sólo se evidenció permeabilizando los parásitos, observando la mayor intensidad de marca en formas redondeadas extracelulares (amastigote-like) y amastigotes intracelulares (Figura I.1). A pesar de que ambas familias tienen secuencias consenso

para expresión en superficie TcTASV-A y -C no tienen la misma localización y poseen expresión diferencial entre estadios (García et al., 2011).

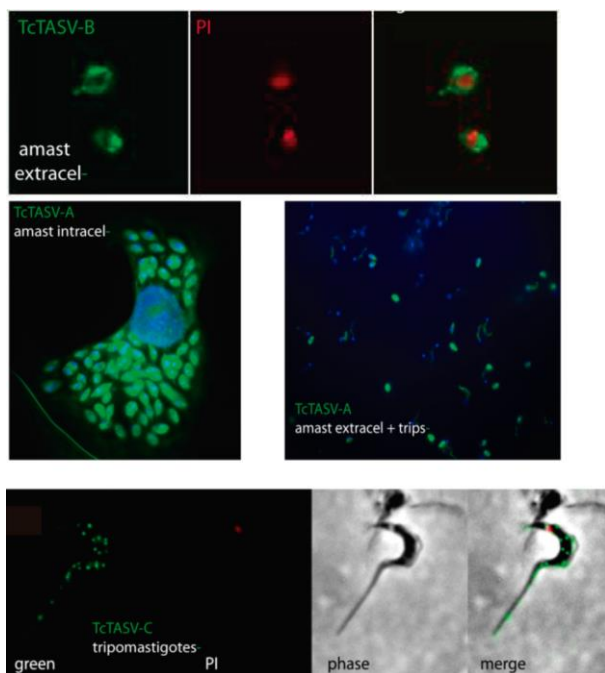


Figura I.1 Imágenes de inmunofluorescencia mostrando el patrón de expresión y localización de las diferentes subfamilias TcTASV. Se observa la expresión de TcTASV-B en la superficie de amastigotes extracelulares con distribución en forma de casquete (arriba, microscopía confocal), TcTASV A con distribución citoplasmática en amastigotes intra- y extra- celulares (centro) y TcTASV-C como puntos discretos en la superficie de tripomastigotes (abajo).

Recientemente demostramos que TcTASV-C se secreta al medio extracelular contenida en vesículas, siendo un componente mayoritario de las mismas (Caeiro et al., 2015). Estos resultados fueron corroborados en trabajos realizados por otros grupos de investigadores en los que identificaron TcTASV-C en proteomas de exovesículas o en exoproteomas de tripomastigotes de *T. cruzi* (Queiroz et al., 2016; Bautista-López et al., 2017; Brossas et al., 2017). Lo expuesto, sumado a una evaluación preliminar de la reactividad de sueros de animales y humanos contra la proteína recombinante TcTASV-C, demostraron su expresión *in vivo* y su contacto con el sistema inmune del hospedador (Bernabó et al., 2013). Un estudio reciente del transcriptoma de los distintos estadios de *T. cruzi* y la célula hospedadora durante el curso de la infección, ha confirmado que los genes de TcTASV-C se sobre-expresan en tripomastigotes y, además, que estos ARNm se encuentran entre los más abundantes de este estadio (Li et al., 2016). Por otra parte la expresión de TcTASV-C en tripomastigotes sanguíneos es 100 veces mayor que en tripomastigotes de cultivo, lo que

sugiere que algún factor presente en el hospedador activa su expresión (Tekiel et al., 2014). En concordancia con nuestros resultados, 10 genes TcTASVs fueron identificados entre proteínas que se expresan únicamente en tripomastigotes purificados de sangre en un estudio en el que se evaluó el proteoma de los tripomastigotes sanguíneos en comparación con los metacíclicos y los obtenidos de cultivo (Brunoro et al., 2015).

Por último, detectamos la expresión de TcTASV-B (clonada en el marco de este trabajo) mediante Western-Blot en tripomastigotes con un peso molecular de ~37 kDa (Rizzi et al., 2015). Por microscopía confocal observamos que TcTASV-B se localiza en la membrana de tripomastigotes y amastigotes extracelulares (Figura I.1). Esto es concordante con la señal para adición de ancla de GPI, aunque TcTASV-B no se secretaría al medio.

La evidencia sobre los patrones de expresión de las proteínas de la Familia TcTASV recabada hasta el momento se resume en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Patrón de expresión de las distintas subfamilias TcTASV

	TcTASV-A	TcTASV-B	TcTASV-C	TcTASV-W
PM observado (kDa)	~18-20	~34	~60	¿57-60?
Estadio de expresión	Tripomastigotes; amastigotes	Tripomastigotes; amastigotes extracelulares	Tripomastigotes	¿Tripomastigote, amastigotes, epimastigotes?
Nivel de expresión	Moderado	Moderado	Bajo	En estudio
Localización	Intracelular	Superficie	Superficie	En estudio
Secreción	En estudio (si por proteomas EVs)	No (si por proteomas EVs)	Si, altos niveles, vesículas extracelulares	En estudio
Tripomastigotes circulantes	No realizado	No realizado	Si, altos niveles	No realizado

Objetivo general:

Expresar las proteínas recombinantes de las subfamilias TcTASV-A, B y C de *T. cruzi* en bacterias *Escherichia coli* y purificarlas en su estado soluble.

Objetivos específicos:

1. Clonar, expresar y purificar un miembro representativo de TcTASV-A de forma soluble.
2. Clonar, expresar y purificar un miembro representativo de TcTASV-B de forma soluble.
3. Purificar TcTASV-C y GST, según protocolos ya estandarizados.

I.2. Resultados

En este trabajo se clonó un miembro representativo de las subfamilias TcTASV-A y TcTASV-B. Un miembro representativo de la subfamilia TcTASV-C ya había sido clonado en nuestro laboratorio para su expresión en bacterias *E. coli*. La producción de TcTASV-C, por lo tanto, se llevó a cabo según los protocolos ya estandarizados (Bernabó et al., 2013). Al inicio de esta Tesis la existencia de familia TcTASV-W aún no estaba confirmada por lo que no se la incluyó en el análisis. La Tabla I.2 indica los genes a partir de los cuales se clonaron los insertos de interés, aminoácidos incluidos en las construcciones y el peso molecular de los productos de expresión obtenidos. En la Figura I.2 se resumen los pasos para el clonado, expresión y purificación de las proteínas recombinantes TcTASV-A, TcTASV-B y TcTASV-C en forma soluble en un sistema de fusión a GST.

Tabla I.2. Genes utilizados y longitud y peso molecular de las construcciones			
	Gen	Aminoácidos de la construcción	Peso Molecular (KDa del producto + 29 KDa GST)
TcTASV-A _{GST}	GenBank: <i>CBI68031.1</i>	37 al 173, (138)	37KDa
TcTASV-B _{GST}	TriTrypDB: <i>TcCLB.511877.10</i>	35 al 224, (191)	56KDa
TcTASV-C _{GST}	TriTrypDB: <i>Tcruzi_1863-4-1211-93</i>	65 al 330, (267)	65KDa

Una vez obtenidas las bacterias transformadas con el plásmido pGEX-1lamdaT conteniendo los insertos de TcTASV-A o TcTASV-B, fueron sometidas a mini inducciones de pequeños volúmenes de cultivo para probar la solubilidad de las proteínas expresadas. Ambas proteínas se encontraron en mayor proporción en el pellet indicando su expresión en cuerpos de inclusión. En la Figura I.3.A se muestran las fracciones pellet-sobrenadante tras lisar bacterias inducidas para la expresión de TcTASV-A_{GST}. La solubilidad de TcTASV-B_{GST} pudo aumentarse significativamente implementando un cambio de medio de cultivo de Luria-Bertani (LB) a Terrific Broth (TB) (Figura I.3.C), pero esto no ocurrió en el caso de TcTASV-A_{GST}. Por lo que, para esta última proteína se evaluaron, en primer lugar, distintos tiempos/temperaturas de inducción, sin

obtener resultados positivos (Figura I.3.B). En la Figura I.3.B se muestra la presencia mayoritaria de la proteína TcTASV-A expresada en el pellet en los lisados de bacterias inducidas a: 28°C-8hs y 37°C-4hs, mientras que 18°C-overnight la expresión es muy baja.

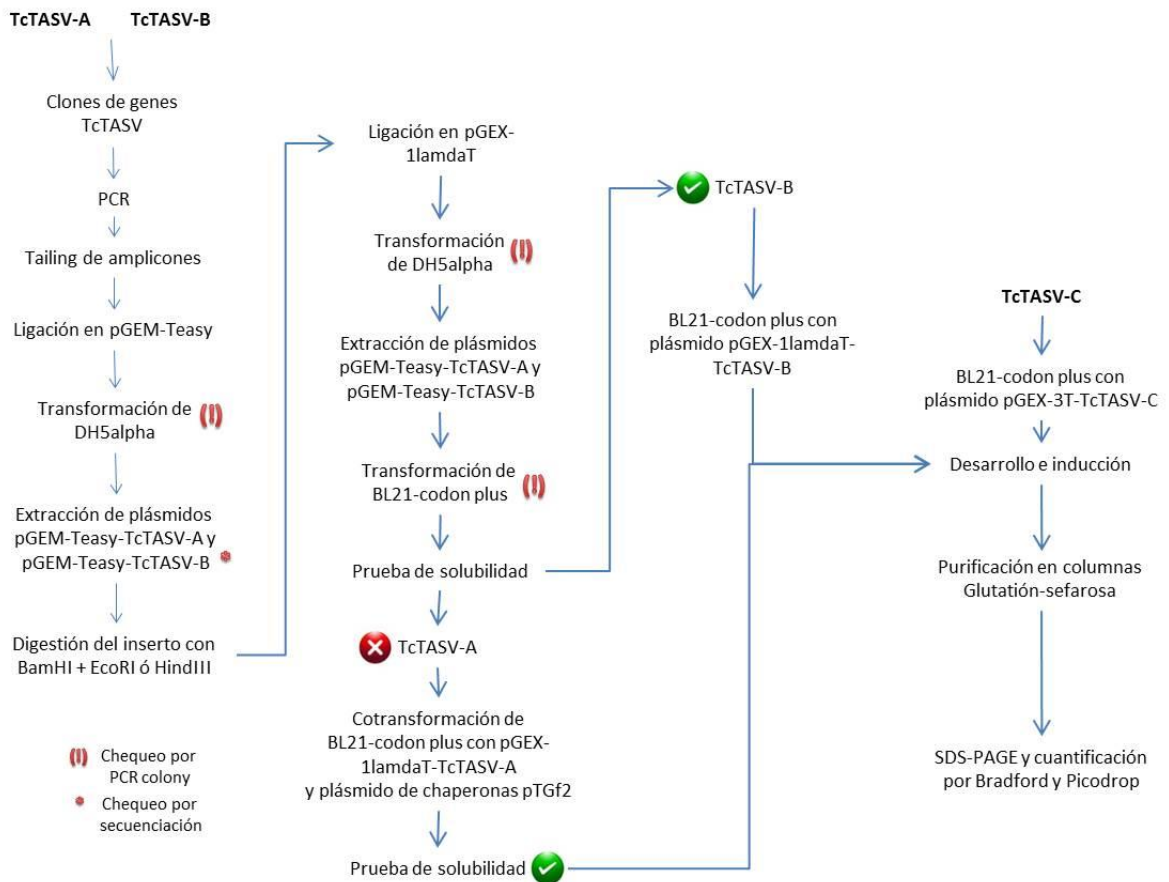


Figura I.2 Diagrama de flujo de la clonación, expresión y/o purificación de TcTASV-A_{GST}, TcTASV-B_{GST} y TcTASV-C_{GST}

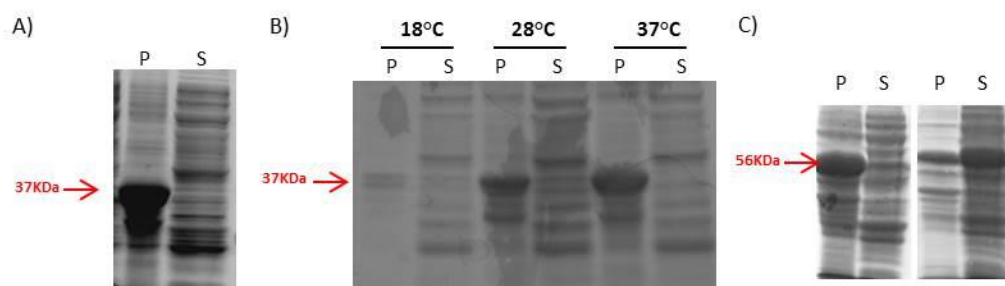


Figura I.4 Expresión de TcTASV-A_{GST} y TcTASV-B_{GST} en sistemas heterólogos. Ensayos de solubilidad. A) Prueba de solubilidad de TcTASV-A_{GST} tras la inducción de BL21-CodonPlus®-pGEX-1λT-TcTASV-A en condiciones estándar: se muestra SDS-PAGE con las fracciones pellet (P) y sobrenadante (S) del lisado de bacterias inducidas para la expresión de TcTASV-A_{GST} (banda indicada por flecha en rojo). B) SDS-PAGE de fracciones resultantes de las pruebas de solubilidad luego de la inducción de BL21-CodonPlus® para la expresión de TcTASV-A_{GST} en distintas condiciones de temperatura/tiempo: 18°C-overnight, 28°C-8hs y 37°C-4hs. C) Prueba de solubilidad para TcTASV-B_{GST} tras inducir bacterias BL21-CodonPlus®-pGEX-1λT-TcTASV-B desarrolladas en medio LB (izquierda) y TB (derecha). Se aprecia que el cambio de medio de cultivo permite la obtención de la proteína de interés en el sobrenadante.

Posteriormente, se evaluó si la expresión de TcTASV-A_{GST} en presencia de chaperonas heterólogas permitiría su plegamiento adecuado y por ende mejoraba su solubilidad. Para ello se realizaron transformaciones con pGEX-1λlamdaT-TcTASV-A en dos cepas de bacterias competentes conteniendo los plásmidos codificantes para las chaperonas dnaK-dnaJ-grpE/groES-groEL (cepa 1) y groEL-groES-tig (cepa 2). Tras la inducción tanto de las chaperonas como de TcTASV-A_{GST} en ambas cepas seguida de lisis bacteriana, se realizaron las pruebas de solubilidad (Figura I.4.A y I.4.B), que demostraron que TcTASV-A_{GST} puede ser obtenida soluble en presencia de las chaperonas. Debido a que en la fracción sobrenadante observamos la presencia de otras bandas mayoritarias (probablemente correspondientes a las chaperonas co-expresadas), la obtención de TcTASV-A_{GST} en el sobrenadante del lisado de ambas cepas se confirmó mediante Western-Blot

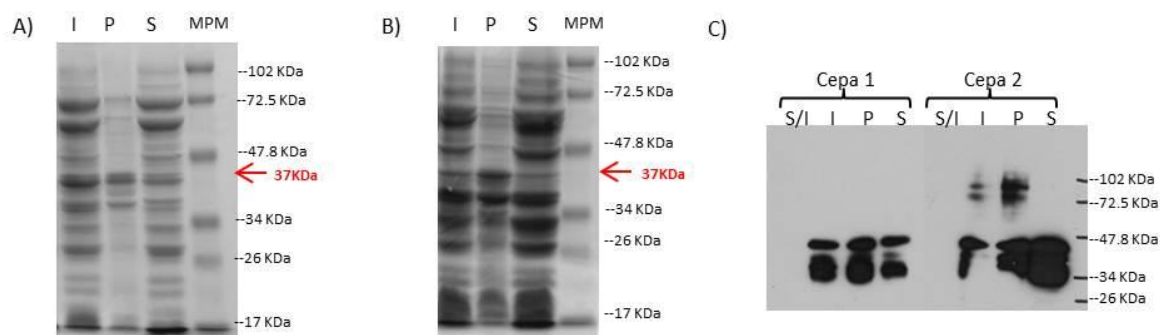


Figura I.3 Optimización de la expresión de TcTASV-A_{GST} soluble. SDS-PAGE de fracción inducida (I), y fracciones pellet (P) y sobrenadante (S) del lisado de las cepas 1 (A) y 2 (B). Flecha roja: indica peso molecular esperado de TcTASV-A_{GST}. C) Visualización de TcTASV-A_{GST} en las fracciones no inducida (S/I) e inducida (I), y fracciones pellet (P) y sobrenadante (S) del lisado de las cepas 1 y 2 mediante Western- Blot utilizando suero de ratón anti-GST.

con un suero anti-GST producido en ratón (Figura I.4.C). Se decidió desarrollar volúmenes mayores de cultivo de las bacterias de la cepa 2 para la inducción y purificación de la proteína soluble. En la Figura I.5.A se muestra el resultado de la purificación de TcTASV-A_{GST} a partir de la cepa 2. Las múltiples bandas evidenciadas en los geles de poliacrilamida por debajo de los antígenos TcTASV corresponden a fragmentos de los antígenos purificados parcialmente degradados, y no a contaminación con proteínas bacterianas. Esto último se comprobó mediante Western-Blot con suero anti-GST de ratón evidenciando que las bandas entre los marcadores de peso molecular de 47.8KDa y 34kDa en el gel de poliacrilamida corresponden a fragmentos de la proteína de interés (Figura I.5.B).

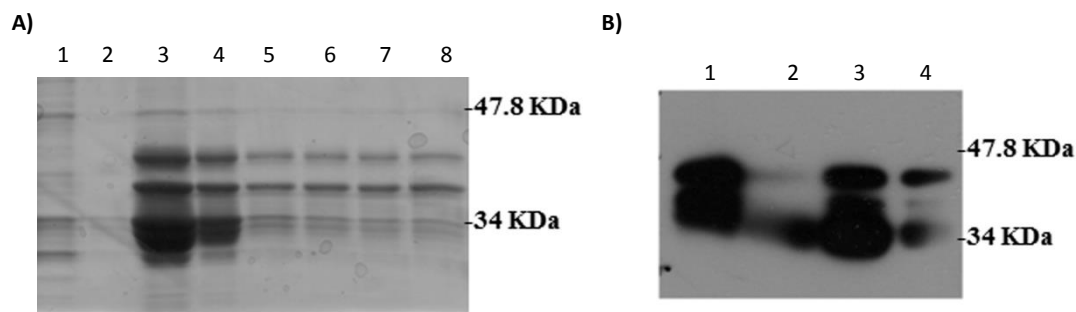


Figura I.5 Purificación de TcTASV-A_{GST}. (A) Gel de poliacrilamida con las fracciones resultantes de la purificación de TcTASV-A_{GST} en columnas de glutatión-sefarosa. Calles 1 y 2: lavados; calles 3–8: fracciones de eluidos. (B) Western Blot utilizando antisuero anti-GST de ratón. Cultivo de bacterias inducido (calle 1), percolado (calle 2), y eluidos 1 y 2 (calles 3–4) resultantes de la expresión y purificación de TcTASV-A_{GST}.

En la Figura I.6 se muestran las proteínas purificadas TcTASV-A_{GST}, TcTASV-B_{GST}, TcTASV-C_{GST} y GST (pesos moleculares predichos: 37kDa, 46kDa, 60kDa y 29KDa, respectivamente) que fueron utilizadas luego en los ensayos de ELISA y Western-Blot (Capítulos II y III).

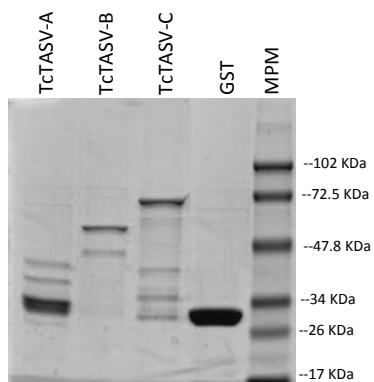


Figura I.6 TcTASV-A_{GST}, TcTASV-B_{GST}, TcTASV-C_{GST} y GST purificados en gel de poliacrilamida 12% con marcador de peso molecular.

I.3. Discusión

La hipótesis fundamental de la presente tesis es que las proteínas de las distintas subfamilias TcTASV, al expresarse preferencialmente en los estadios infectivos del parásito, estimulan una respuesta de anticuerpos específicos en el hospedador que pueden ser detectados mediante un inmunoensayo con fines diagnósticos. El primer paso experimental de este trabajo consistió en la obtención de las proteínas TcTASV que serían empleadas posteriormente en ensayos de ELISA Indirecto. Las proteínas recombinantes de las subfamilias TcTASV-A, B y C se produjeron en un sistema de fusión a GST. Como se mencionó, las mismas fueron clonadas en este sistema debido a que intentos previos de nuestro grupo de trabajo para expresarlas fusionadas a etiquetas más pequeñas no han permitido buenos niveles de expresión. Las proteínas se clonaron de forma que su secuencia de aminoácidos no incluya el péptido señal de la región amino-terminal ni la zona carboxi-terminal correspondiente a la región de adición de GPI, para evitar la secreción de las mismas o su direccionamiento a cuerpos de inclusión como se observó previamente (Bernabó, 2008). A pesar de haber tomado esta precaución, las proteínas se expresaron en un principio de forma insoluble. Esto fue solucionado mediante un cambio de medio de cultivo, en el caso de TcTASV-B, y mediante la co-expresión de chaperonas para facilitar el correcto plegado, en el caso de TcTASV-A.

Si bien evidenciamos múltiples bandas en los geles de poliacrilamida, pudimos demostrar mediante ensayos de Western-Blot con anticuerpos anti-GST, que las bandas corresponden a fragmentos de las proteínas de interés y no a proteínas bacterianas y, por lo tanto, las proteínas se expresaron con alto grado de pureza. En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la proteína TcTASV-C_{GST} sufre proteólisis en distintos sitios de su secuencia produciendo polipéptidos de menor peso molecular que se observan en los geles SDS-PAGE (Bernabó, 2008). Hipotetizamos que algo similar puede ocurrir con TcTASV-A_{GST} y TcTASV-B_{GST}.

Capítulo II : Determinación de la utilidad de los antígenos TcTASV en la detección de la infección por *T. cruzi* en humanos

II.1. Introducción

Proteínas recombinantes para el diagnóstico de la infección en humanos

En la década del noventa varios grupos de investigadores reportaron el descubrimiento y aislamiento de numerosos antígenos proteicos de *T. cruzi*, mediante inmunoscreening de bibliotecas genómicas con sueros de pacientes o animales infectados (Da Silveira et al., 2001). En su afán conjunto por aislar antígenos útiles para el inmunodiagnóstico, muchas de estas proteínas fueron descubiertas simultáneamente por distintos laboratorios, por lo que en muchos casos la misma proteína recibió distintos nombres. Este último, es el caso de proteínas como: el antígeno asociado al citoesqueleto FRA/Ag1/JL7/H49 (GenBank: AAA30177.1), conformado por secuencias repetitivas de 68 aminoácidos y propuesto como marcador de la fase crónica de la infección; el antígeno de superficie SAPA/TCNA/TS, con repeticiones de 12 aminoácidos en su secuencia, descrito como marcador de la fase aguda; o, la proteína citoplasmática CRA/Ag30/JL8/TCR27 (GenBank: AAF73108.1), también propuesta como marcadora de fase crónica (Da Silveira et al., 2001). La producción de estas proteínas individuales mediante la tecnología del ADN recombinante, resultó innovador en el diagnóstico de la enfermedad ya que mejoró la detección del agente etiológico de la infección en comparación con las técnicas serológicas de rutina que utilizan extractos proteicos del parásito. Entre los beneficios aportados por los antígenos recombinantes en las técnicas de inmunodiagnóstico se encuentra una mejora en la especificidad, no sólo porque se trata de moléculas bien definidas sino también por la pureza resultante de la metodología de producción, evitándose reacciones cruzadas y uniones inespecíficas. El uso de extractos proteicos de

epimastigotes de *T. cruzi* en los ensayos convencionales de ELISA o HAI confiere a la técnica una gran sensibilidad ya que estos contienen una mezcla de una gran cantidad de proteínas y, por lo tanto, una gran cantidad de receptores antigénicos. Sin embargo, los anticuerpos generados durante la infección con parásitos emparentados como *Leishmania spp.* y *T. rangeli* pueden unirse inespecíficamente a un gran número de péptidos de *T. cruzi* causando falsos positivos y, en consecuencia, disminuyen la especificidad de la prueba (Araujo, 1986; Umezawa et al., 1999). Antígenos recombinantes como ser SAPA (Affranchino et al., 1989; Russomando et al., 2010; Gil et al., 2011; Volta et al., 2015), TSSA VI (Bhattacharyya et al., 2010, 2014; Cimino et al., 2011) o Tc13Tul (Santamaría et al., 2013) demostraron ser sensibles para la detección de la infección en pacientes chagásicos y no evidenciaron falsos positivos al ser evaluados en pacientes sanos, leishmaniásicos, con toxoplasmosis y/o HIV.

A pesar de lo mencionado, en general, la sensibilidad de las técnicas convencionales serológicas es mayor que la de las técnicas que emplean antígenos sintéticos individuales. Esta dificultad se ve superada mediante el uso de mezclas de antígenos recombinantes, o mezclas de péptidos sintéticos o antígenos multiepítopes (Da Silveira et al., 2001; Aguirre et al., 2006; Camussone et al., 2009). Los ensayos de ELISA comerciales, como ser el kit de Chagatest *ELISA recombinante v.4.0* de Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina), utilizan mezclas de antígenos recombinantes que permiten aumentar la sensibilidad manteniendo una especificidad elevada. Las placas del Chagatest están sensibilizadas con una mezcla de los antígenos 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA, con una sensibilidad de 99.3-100% y especificidad de 98.7-100%. La mezcla de los antígenos FRA y CRA en un ensayo de ELISA dio como resultado un 100% de sensibilidad y especificidad comparado con los ensayos de ELISA convencionales (Krieger et al., 1992). Incluso el desempeño puede ser incrementado utilizando solo algunas porciones de los antígenos. Se ha reportado que quimeras sintéticas construidas con fragmentos de los antígenos SAPA-FRA o SAPA-FRA-B13, resultaron en mejor desempeño diagnóstico que las mezclas de los mismos antígenos en moléculas completas (Camussone et al., 2009). Recientemente, se desarrolló un ELISA multiplex denominado Multi-cruzi en el que cada pocillo dispone un microarreglo de spots con 12 antígenos en total, seleccionados por su performance individual entre los que se encuentran: antígeno de superficie-2, TcR39, MAP, CRA, SAPA, TSSA, trans-sialidasa y TcD (Granjon et al., 2016). La suma de varios antígenos en un inmunoensayo como el Multi-cruzi otorga una elevada sensibilidad, especificidad y exactitud permitiendo que una prueba como esta pueda ser utilizada como prueba confirmatoria potente para el diagnóstico de casos inconclusos o sueros que tienen elevado background.

Además, los autores determinaron una posible correlación entre la reactividad de los sueros evaluados en el ensayo multi-antigénico y la parasitemia de esos pacientes (Granjon et al., 2016), por lo que las técnicas inmunológicas multiantigénicas o multiepitope de este tipo podrían ser valiosas para el monitoreo de pacientes en tratamiento (Sánchez Negrette et al., 2008; Granjon et al., 2016). De manera similar, se ha reportado el desarrollo de un ensayo multiplex tipo array (formato Luminex) que utiliza un panel de 16 proteínas recombinantes (Cooley et al., 2008). Este ensayo además de resultar 100% sensible en sueros de pacientes chagásicos de áreas endémicas, permitió detectar patrones de reconocimiento de reactividad específicos y estables para cada uno de los sueros y resultó ser útil para determinar de forma temprana la efectividad del tratamiento contra la enfermedad de Chagas (Cooley et al., 2008; Laucella et al., 2009). Por último, otro estudio ha reportado una sensibilidad del 96.3% y especificidad del 99.15% para un ELISA con una combinación de 7 péptidos sintéticos seleccionados a partir de un screening a gran escala de epítopes B lineares mediante microarreglos de alta densidad de péptidos (Carmona et al., 2015; Mucci, Carmona, et al., 2017). Esta novedosa alternativa trae consigo no solo la ventaja de una elevada eficiencia diagnóstica sino también la facilidad de producción de los reactivos.

Determinación de cura y seguimiento serológico de pacientes tratados

En la actualidad, se estima que existen 5.7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* a en el mundo (World Health Organization, 2015) y se cree que sólo un 1% de los mismos acceden eventualmente al tratamiento (Ribeiro et al., 2009). Esto se puede relacionar con el hecho de que los casos son en su mayoría subdiagnosticados, por un lado, como consecuencia de que esta enfermedad afecta principalmente a aquellos que viven en situación de pobreza en áreas marginales. Por otro lado, los pacientes infectados pueden no desarrollar síntomas durante un periodo prolongado de tiempo e incluso el 70% de los pacientes permanecen asintomáticos durante toda su vida.

Para determinar que un paciente está infectado con *T. cruzi* hace falta ya sea la evidencia directa del parásito por técnicas parasitológicas o PCR, o la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* por dos o tres métodos serológicos («Programa Nacional de Chagas», 2006). Adoptar los mismos criterios para determinar la cura en un paciente en tratamiento resulta complicado. Por un lado, un resultado negativo en una prueba parasitológica (ya sea hemocultivo, xenodiagnóstico, frotis o hematocrito) no indica ausencia de infección, debido a la baja sensibilidad de estas técnicas en la

etapa crónica de la infección. La técnica de PCR si bien tiene mejor sensibilidad que las pruebas parasitológicas, y hasta puede resultar más rápida y sencilla que las mismas, no logra superar la sensibilidad de las técnicas serológicas convencionales. Como se ha mencionado, la parasitemia es variable durante el ciclo biológico del parásito disminuyendo al superar la etapa aguda de la infección momento en el que el parásito invade y se reproduce en los tejidos, lo que disminuye las probabilidades de ser detectado. Sin embargo, si estas pruebas resultan positivas durante el seguimiento del tratamiento son indicativas indiscutibles de falla terapéutica aportando información extremadamente valiosa (Galvão et al., 2003; Schijman et al., 2003). Por otro lado, las técnicas de serología convencional utilizan lisados del parásito, lo que constituye una compleja mezcla de antígenos y los títulos de anticuerpos contra tal cantidad de epítopes tardan muchos años en disminuir, aún si el parásito ya ha sido eliminado.

Por lo mencionado, las pruebas diagnósticas convencionales disponibles no son suficientes por sí solas para monitorear el tratamiento de pacientes infectados. Es de especial interés la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan detectar la disminución de la carga parasitaria y/o de los títulos de anticuerpos durante un periodo de monitoreo relativamente corto en aquellos pacientes tratados exitosamente. En los últimos 20 años se han descrito numerosos biomarcadores potenciales del pronóstico y progreso de la infección chagásica entre los que se encuentran marcadores del tipo inmunológicos, bioquímicos o moleculares (basados en ácidos nucleicos) (Pinazo et al., 2014). Dentro de los marcadores inmunológicos se encuentran la detección de anticuerpos específicos contra antígenos del hospedador; detección de anticuerpos generados contra antígenos del parásito; medición de niveles de citoquinas o de patrones de las mismas; y, cuantificación de poblaciones celulares asociadas a respuestas inmunes y/o que expresen ciertas citoquinas (Pinazo et al., 2014). Entre los inmunoensayos que detectan anticuerpos contra antígenos de tripomastigotes de *T. cruzi* se han documentado ensayos de ELISA con antígenos tales como la trans-sialidasa (Pereira-Chioccola et al., 2003), el antígeno repetitivo Tc13Tul perteneciente a la familia de las trans-sialidasas (Santamaría et al., 2013), la proteína flagelar de unión al calcio F29 (Sosa-Estani et al., 1998; Fabbro et al., 2011), GP57/51 (Gazzinelli et al., 1993) o las proteínas KMP11, HSP70 y PFR2 (Fernández-Villegas et al., 2011). Todos estos ensayos demostraron, durante el monitoreo de niños o adultos crónicos tratados, que la ocurrencia de la disminución o desaparición (seroconversión) de los niveles de anticuerpos contra estos antígenos es anterior a la de los anticuerpos contra homogenados del parásito. Como se ha mencionado anteriormente, los ensayos multiplex tipo arrays con múltiples antígenos

recombinantes adsorbidos en placas de ELISA (Granjon et al., 2016) o sobre partículas en suspensión (Cooley et al., 2008; Laucella et al., 2009; Viotti et al., 2011) también resultaron en formatos novedosos, sensibles y específicos para monitorear pacientes infectados tratados y detectar de forma temprana la efectividad del tratamiento.

Los antecedentes demuestran que la sensibilidad de los extractos crudos del parásito, puede ser superada mediante el uso de antígenos recombinantes (ya sea al ser utilizados de forma individual, como mezclas, péptidos sintéticos derivados de su secuencia o quimeras sintéticas combinando epítopes de varios antígenos) manteniendo una buena especificidad de la técnica e incluso pudiendo correlacionarse los títulos contra estos antígenos específicos del tripomastigote con la parasitemia. Como se ha mencionado, la identificación de biomarcadores serológicos que indiquen de forma temprana efectividad del tratamiento en pacientes chagásicos es de vital interés. En este capítulo indagamos sobre la utilidad de la familia proteica TcTASV para la detección de la infección en pacientes chagásicos. Además, determinamos el desempeño de los antígenos TcTASV como biomarcadores de cura en pacientes en tratamiento.

Objetivo General:

Evaluar mediante ensayos de ELISA Indirecto el desempeño de los antígenos TcTASV para la detección de la infección chagásica en humanos.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la sensibilidad diagnóstica de los antígenos recombinantes de las subfamilias A, B y C de la familia TcTASV, en sueros de pacientes infectados.
2. Determinar la especificidad serológica de las mencionadas proteínas recombinantes, considerando otras patologías infecciosas.
3. Indagar la utilidad de la familia TcTASV en el seguimiento serológico de pacientes tratados.

II.2. Resultados

Desempeño diagnóstico de los ELISAs con antígenos TcTASV

Para la determinación del desempeño de los ensayos de ELISA-TcTASV, en primer lugar, se confeccionó el panel de sueros controles positivos (HTc+) y controles negativos (HTc-) de infección por *T. cruzi*. Para ello, se seleccionaron sueros de pacientes chagásicos y pacientes sanos, con Leishmaniasis tegumentaria y con estrongiloidiosis de las serotecas de la Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta (UNSa), del Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IIET, Sede Regional Orán, UNSa), del Instituto de Patología Experimental de Salta y de la Asociación para el Desarrollo Sanitario Regional (ADESAR, Provincia de Buenos Aires). Además, se recolectaron sueros de pacientes chagásicos del Chaco Salteño durante una campaña de atención primaria de la salud a comunidades wichi, organizada por la fundación ADESAR, en el Departamento de Rivadavia, Provincia de Salta. Tanto en el caso de estos últimos sueros y como en el caso de los sueros procedentes de las serotecas en los que no se

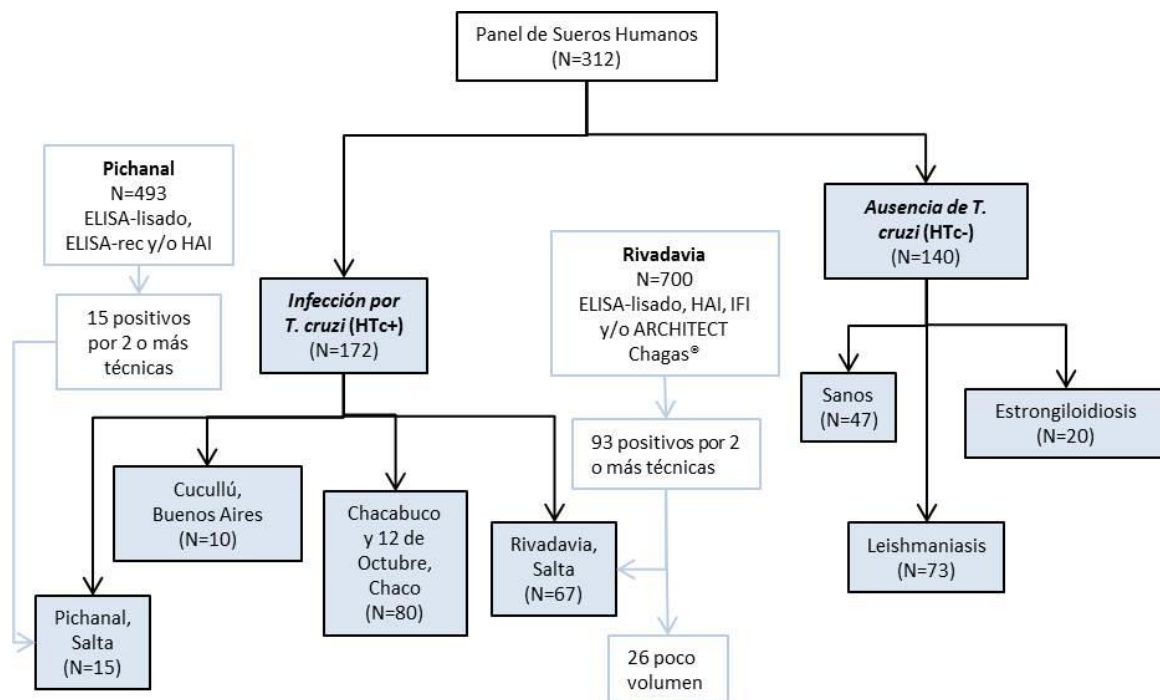


Figura II.1 Diagrama de flujo del panel de sueros de pacientes utilizados para la determinación de la eficacia diagnóstica de los ELISAs con los antígenos TcTASV.

contara con la información, se practicó serología convencional (ELISA Homogenado de *T. cruzi* y HAI) para la confirmación de la presencia o ausencia de la infección. La positividad del ELISA convencional y un título de 32 en el HAI, fue el criterio para definir a un paciente como infectado. En los casos discordantes en los que fue posible se practicó IFI o ELISA Architect para confirmar el diagnóstico, esto fue realizado por personal del Hospital Alemán, Provincia de Buenos Aires. En la Figura II.1 se demuestra el diagrama de flujo de los sueros incluidos en el panel para la evaluación del desempeño de los ELISAs con los antígenos TcTASV.

Con los ensayos de ELISA-TcTASV_{GST} estandarizados, se procedió a la evaluación del panel de sueros, determinando paralelamente para cada muestra (misma placa) su reactividad contra el antígeno TcTASV_{GST} y contra la proteína de fusión GST. Los *ratios* (DO_{TcTASV}/DO_{GST}) de los sueros de los grupos HTc+ y HTc- obtenidos se utilizaron para la determinación de los parámetros de eficacia diagnóstica a partir del análisis de curvas ROC (GraphPad Prism v.5). En la Tabla II.1 se muestran los parámetros de Sensibilidad, Especificidad y Área Bajo la Curva (AUC) ROC estimados, y el cut off determinado (máxima sensibilidad posible para una especificidad del 100%). Las pruebas ELISA-TcTASV-A y ELISA-TcTASV-C obtuvieron sensibilidades de 66% y 39%, respectivamente. Para el criterio de selección de cut off para un 100% de especificidad, el ELISA-TcTASV-B tuvo una sensibilidad prácticamente nula (2%). El bajo desempeño de esta prueba también se vio reflejado en el valor de AUC ROC (0.62) que indico una baja exactitud para discriminar entre controles positivos y negativos (Figura II.3), siendo este parámetro cercano al valor del parámetro que indicaría una discriminación por azar (0.5 AUC ROC). Por lo tanto, no se hicieron más ensayos de ELISA utilizando TcTASV-B. A continuación, se decidió evaluar una prueba con la mezcla de los antígenos que mejor desempeño individual tuvieron en los ensayos de ELISA. La prueba de ELISA con la mezcla antigénica TcTASV-A + TcTASV-C obtuvo la máxima sensibilidad entre las pruebas evaluadas (78%), demostrando que la reactividad de los sueros contra ambos antígenos puede ser sumada en un ensayo. En la Figura II.2 se visualiza la reactividad en valores de ratios relativos $[(DO_{TcTASV}/DO_{GST})/cut\ off]$ de los sueros de los grupos HTc+ y HTc- obtenida con los distintos ELISAs y se comparan las medias entre los grupos de sueros. A excepción del ELISA-TcTASV-B, para todos los ensayos, la reactividad media del grupo HTc+ fue superior a la del grupo HTc- con diferencias estadísticamente significativas (Figura II.2).

ELISA	Sensibilidad [IC95%]	Especificidad [IC95%]	AUC ROC [IC95%]	cut off ROC
TcTASV-A	66% [57-73]	100% [97-100]	0.89 [0.86-0.93]	1.768
TcTASV-B	2% [0-8]	100% [94-100]	0.62 [0.53-0.72]	3.839
TcTASV-C	39% [32-47]	100% [97-100]	0.83 [0.79-0.88]	1.643
Mix A+C	78% [71-84]	100% [97-100]	0.94 [0.91-0.97]	1.425

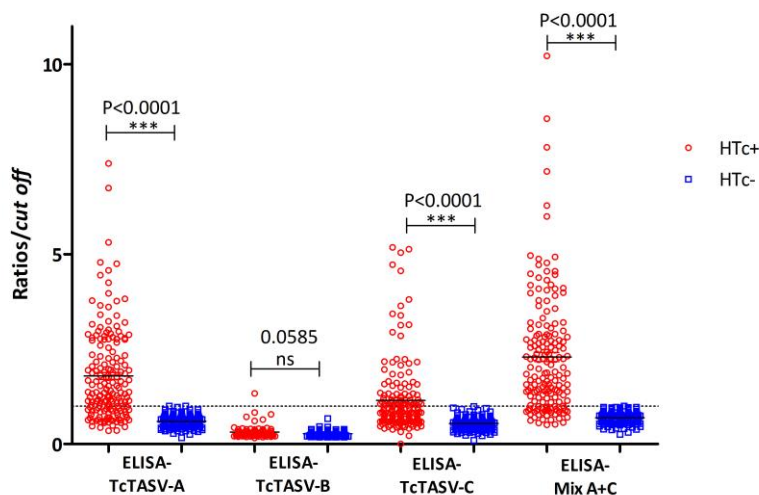


Figura II.2 Reactividad de los sueros HTc+ y HTc- ante los distintos antígenos evaluados. Se grafican los ratios (DO_{TcTASV}/DO_{GST}) obtenidos para cada suero relativizados al cut off; valores de ratios/cut off: ≥ 1 , muestra positiva; < 1 , muestra negativa. ***: Diferencias significativas; ns: diferencias no significativas, Prueba t con corrección de Welch ($p < 0.05$).

Por otro lado, de la comparación entre las curvas ROC para los distintos ELISAs (Tabla II.1 y Figura II.3) surge que los valores de AUC ROC para TcTASV-A (0.89) y TcTASV-C (0.83) indican una exactitud moderada según la escala de Swets (1996); mientras que la prueba Mix A+C-ELISA (0.94) al tener un parámetro mayor de 0.9 indicaría que esta es la única prueba de las analizadas con una exactitud elevada para discriminar entre infectados y sanos.

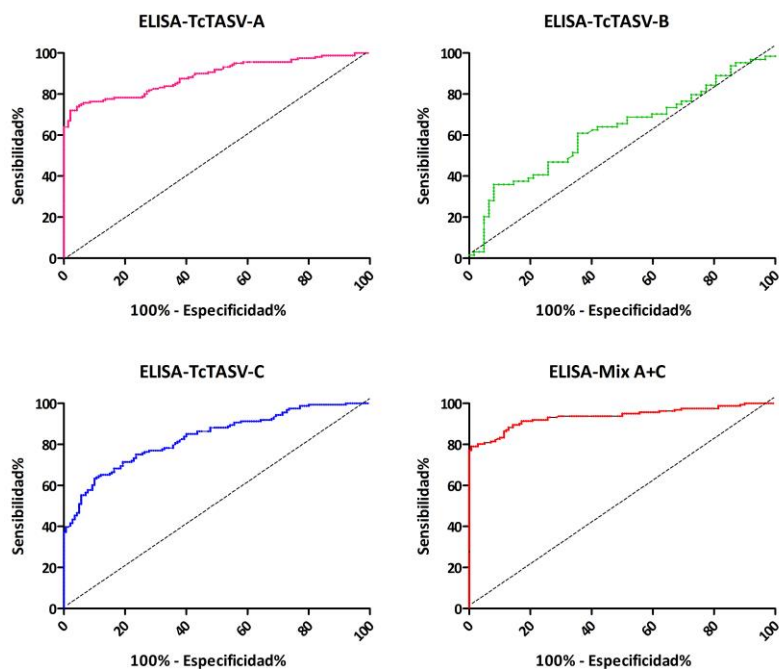


Figura II.3 Curvas ROC para los distintos ELISAs ensayados. La línea horizontal punteada indica un AUC ROC de 0.5

Detección de anticuerpos anti-TcTASV en sueros de niños con infección congénita

Los sueros pertenecientes a madres infectadas y su/s hijo/s mayores a un año con infección congénita demostrada, que se describen en la Tabla II.2, fueron evaluados por las técnicas de ELISA-TcTASV-A, ELISA-TcTASV-C y ELISA-Mix A+C (Figura II.4). El ELISA-TcTASV-C resultó reactivo en sólo dos madres y en ningún niño; por su parte el ELISA-TcTASV-A fue positivo en 5 de las 7 madres y en 9 de los 11 niños. Mientras que, el ELISA-Mix A+C (cuya sensibilidad fue estimada en 78%) logró detectar el 100% tanto de los sueros correspondientes a los niños con infección congénita como a sus respectivas madres. Cabe mencionar que un par de sueros de niños se encontraban muy cerca del cut off (F1: H1, F32: H1; Figura II.4). Otra observación interesante sobre los resultados expuestos en la Figura II.4, es que en los casos de los hermanos

infectados de las familias F28 y F98, presentan niveles de anti-TcTASV-A y de anticuerpos anti-TcTASV-A + TcTASV-C que superan al de sus madres mientras que en las familias con un solo hijo con infección congénita ocurre lo contrario.

Familia	Edad de Madre (años)	Procedencia	Cantidad de Hijos infectados y edades (años)	Hijos con serología negativa
F1	24	Abuela boliviana	1 (1 año y 8 meses)	2
F24	24	Madre boliviana	1 (5)	-
F28	37	Madre Boliviana	3 (1; 3; 5)	-
F32	38	Abuela boliviana	1 (2)	-
F37	25	Abuela boliviana	1 (2)	-
F86	19	Madre boliviana	1 (1 año y 5 meses)	-
F98	32	Abuela boliviana	3 (8; 5; 1 y 8 meses)	3

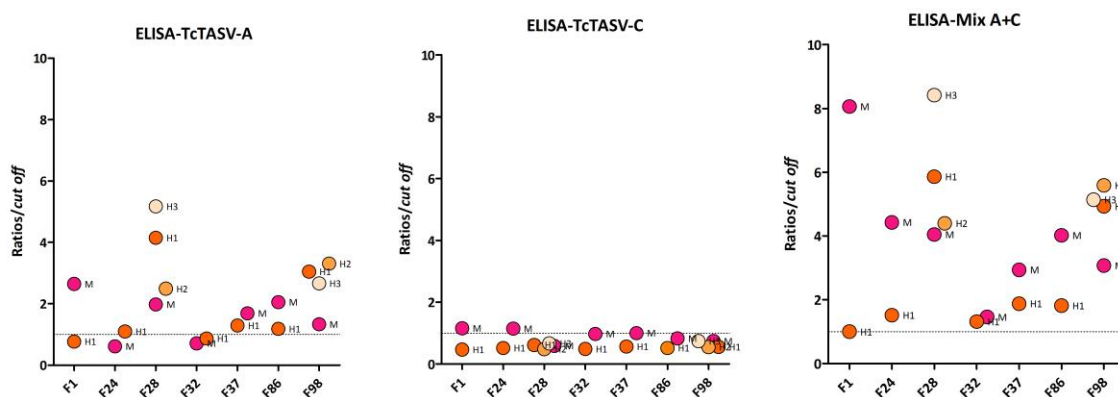


Figura II.4 Reactividad de los sueros de madres chagásicas/hijos con infección congénita agrupados según familia (eje x). Se grafican los ratios (DO_{TcTASV}/DO_{GST}) obtenidos para cada suero relativizados al cut off; valores de ratios/cut off: ≥ 1 , muestra positiva; < 1 , muestra negativa. Puede verse como la técnica de ELISA-Mix A+C es capaz de detectar todas las muestras evaluadas en comparación a los antígenos utilizados de forma individual.

ELISA-Mix A+C para el seguimiento serológico de pacientes tratados

Para determinar la utilidad de los antígenos TcTASV para el monitoreo de la terapia tripanomicida y determinación de cura (objetivo específico 3 de este capítulo) se evaluaron muestras de sueros de niños y adultos tratados, tomadas antes y después del mismo. Se utilizó el ELISA-Mix A+C ya que fue la técnica con mejor sensibilidad. Las muestras de niños (N=31) provenían de las localidades de Pampa Ávila y Tres Estacas, Provincia de Chaco (Monje Rumi et al., 2013); mientras que, las muestras adultos (N=10) correspondían a pacientes oriundos de Bolivia que residen en Cucullú, Provincia de Buenos Aires. Para cada paciente las muestras de sueros tomadas en el periodo basal (T0) y post-tratamiento (T1 y/o T2, según corresponda) se procesaron en paralelo en la misma placa, para evitar el error experimental entre distintos ensayos. Los resultados de la evaluación de los sueros de niños pre- y post- tratamiento, se resumen en la Tabla II.3 y Figuras II.5 y II.6; mientras que la Figura II.7 resume la reactividad anti-TcTASV-A+C pre- y post- tratamiento de los sueros de adultos.

En las Tabla II.3 se muestran los valores de ratios relativizados al cut off [Ratios rel= Ratios (DO_{TcTASV}/DO_{GST})/cut off] de los sueros de niños tratados de Tres Estacas y Pampa Ávila, obtenidos mediante el ELISA-Mix A+C. El 90% (28/31) de los niños fueron reactivos pre-tratamiento por esta técnica. Del total de niños que fueron reactivos al tiempo inicial, el 75% (21/28) demostraron variación en los niveles de anticuerpos indicativa de impacto de tratamiento (disminución mayor al 30%) con un porcentaje de seroconversión (definida por un valor de Ratios relativo < 1 post-tratamiento) del 25% (7/28). En las Figuras II.5, II.6 y II.7 se graficaron niveles de anticuerpos pre- y post- tratamiento obtenidos mediante el ELISA-Mix A+C. Para el caso de niños tratados de Chaco, se incluyen los resultados previos del ELISA y HAI comerciales obtenidos por Monje-Rumi et al., 2013, a modo comparativo.

Tabla II.3. Seguimiento de niños chagásicos tratados por ELISA-Mix A+C				
Paciente *	ELISA-Mix A+C			% variación
	T0**	T1**	T2**	
TE1	2.020	1.154	0.917 [↓]	-55
TE2	1.569	1.220	1.245	-21
TE3	2.691	2.030	1.303	-52
TE4	3.639	2.302	1.568	-57
TE5	1.486	1.076	1.015	-32
TE6	2.545	-	0.678 [↓]	-73
TE7	3.199	-	1.711	-47
TE8	3.770	-	3.263	-13
TE9	3.495	-	1.558	-55
TE10	1.498	1.198	0.543 [↓]	-64
TE11	4.929	-	2.120	-57
TE12	1.568	-	0.895 [↓]	-43
TE13	1.978	-	0.954 [↓]	-52
TE14	1.361	1.296	1.543	13
PA1	1.735	1.270	-	-27
PA2	1.412	1.760	-	25
PA3	0.954	0.882	-	
PA4	2.271	1.097	-	-52
PA5	1.378	1.285	-	-7
PA6	2.586	2.166	-	-16
PA7	2.305	1.573	-	-32
PA8	1.110	0.780 [↓]	-	-30
PA9	1.843	1.215	-	-34
PA10	1.860	1.253	-	-33
PA11	2.518	1.472	-	-42
PA12	0.519	0.677	-	
PA13	4.199	2.574	-	-39
PA14	2.238	0.989 [↓]	-	-56
PA15	2.826	1.913	-	-32
PA16	0.860	0.558	-	
PA17	2.345	1.473	-	-37

*TE: localidad Tres Estacas; PA: localidad Pampa Ávila. **Tres Estacas, 5 años de seguimiento post-tratamiento: T0: 2004; T1: 2006; T2: 2009; Pampa Ávila, 2 años de seguimiento post-tratamiento: T0: 2007; T1: 2009 (sin T2). En gris se resaltan los sueros que resultaron negativos para el ELISA-Mix A+C pretratamiento. [↓]: indica seroconversión post-tratamiento. El sombreado en tonos rosa se resalta los diferentes rangos de %variación de los niveles de anticuerpos anti-TcTASV-A+C:

30%-50%
50%-75%
>75%

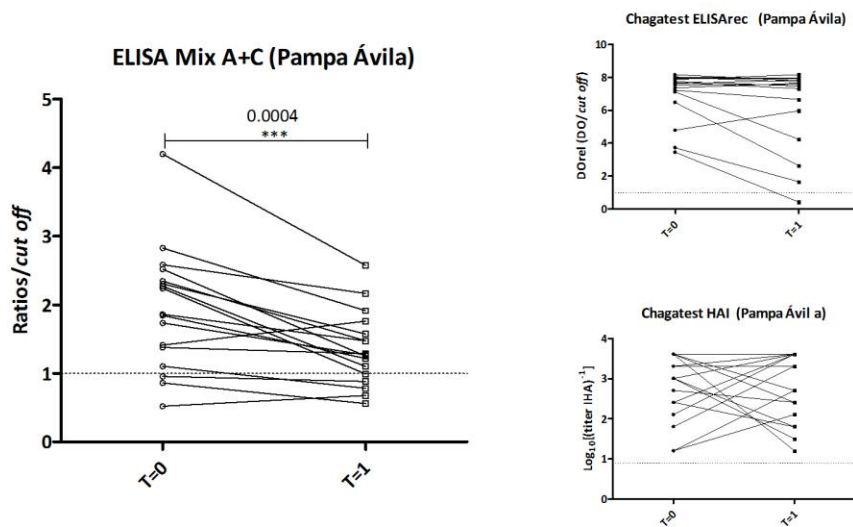


Figura II.6 Seguimiento de pacientes tratados de Pampa Ávila. ***: Diferencias significativas, Prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$).

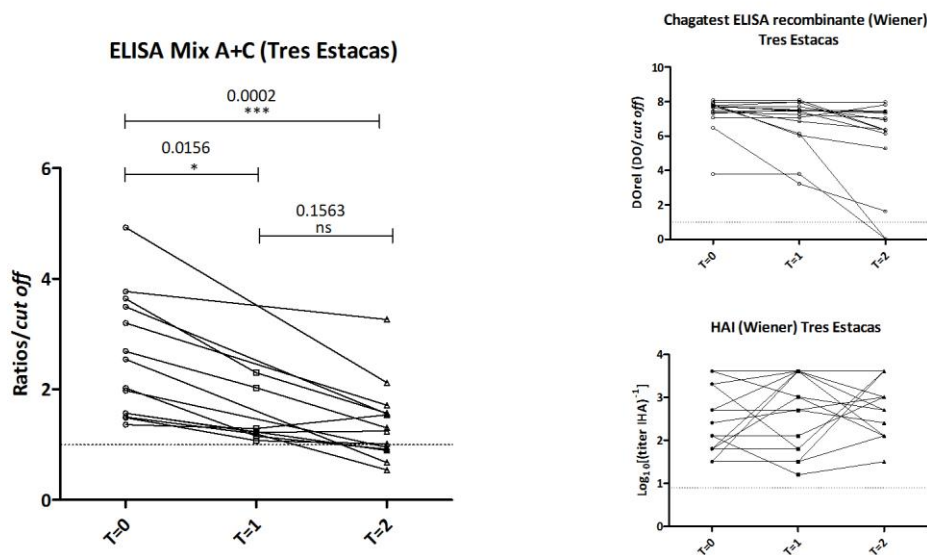


Figura II.5 Seguimiento de pacientes tratados de Tres Estacas. *: Diferencias significativas, ns: diferencias no significativas, Prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$).

En solo un paciente (PA2) se observó que la reactividad medida por el ELISA-Mix A+C fuera mayor en el post-tratamiento que en el basal (Tabla II.3). Uno de los sueros (PA6) que continuó positivo post-tratamiento fue también positivo por PCR confirmándose en este caso la falla

terapéutica (Tabla II.2). La reactividad media (media de los ratios relativos \pm error estándar) de los sueros pre-tratamiento de Pampa Ávila mediante el ELISA con la mezcla de antígenos TcTASV, fue 1.94 ± 0.216 y post-tratamiento fue 1.35 ± 0.130 , siendo las diferencias de reactividad entre los pares de sueros pre- y post-tratamiento significativas ($p=0.0004$, Wilcoxon test, Figura II.5). La reactividad media (media de los ratios relativos \pm ES) de los sueros de niños de Tres Estacas antes del tratamiento y a los 2 y 5 años post-tratamiento fue: 2.55 ± 0.295 , 1.47 ± 0.184 y 1.38 ± 0.186 , respectivamente. La disminución de los títulos de anticuerpos entre el T0 y el T1 y entre el T0 y el T2 fueron estadísticamente significativas (Figura II.6).

En el caso de los sueros de pacientes adultos tratados de Cucullú, 90% (9/10) resultaron positivos frente al ensayo ELISA-Mix A+C (Figura II.7). Si bien algunos pacientes disminuyeron los títulos de anticuerpos a los tres años del tratamiento las diferencias de títulos de anticuerpos anti-TcTASV-A + TcTASV-C pre-tratamiento (junio 2013) y post-tratamiento (octubre 2016) no resultaron significativas, a diferencia de lo observado en niños tratados (Figura II.7).

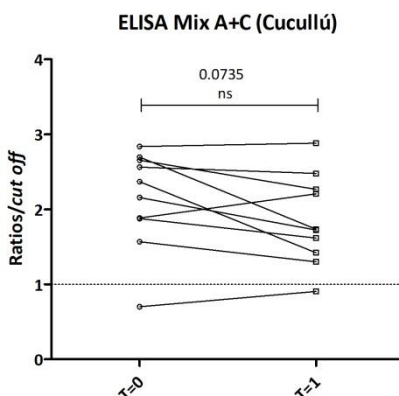


Figura II.7 Seguimiento de pacientes tratados de Cucullú. ns: diferencias no significativas, Prueba de Wilcoxon ($p<0.05$).

II.3. Discusión

Como se ha reportado en estudios anteriores, el uso de mezclas antígenos recombinantes de *T. cruzi* en un inmunoensayo mejora considerablemente la sensibilidad para la detección de la infección versus su uso de forma individual (Krieger et al., 1992; Da Silveira et al., 2001; Camussone et al., 2009; Granjon et al., 2016). En concordancia con estos trabajos, el ELISA-Mix A+C puede detectar un 78% de los pacientes infectados en comparación al 66% y 39% de sensibilidad que se obtuvo al utilizar los antígenos TcTASV-A y TcTASV-C de manera individual. Además, el ELISA con la mezcla antigénica obtuvo un AUC ROC (0.94) indicativa de una exactitud elevada para discriminar entre controles infectados y negativos según la escala de interpretación del AUC ROC de Swets (1996). La sensibilidad del ELISA-TcTASV-C obtenida aquí demostró un valor cercano al obtenido en un trabajo preliminar de nuestro laboratorio donde se detectaron anticuerpos anti-TcTASV-C en 30% de los pacientes crónicos estudiados (Bernabó et al., 2013). La especificidad de los tres ensayos mencionados fue máxima considerando que ésta fue evaluada no sólo en controles sanos sino también en pacientes leishmaniásicos y con estrongiloidosis, afecciones co-endémicas con la infección chagásica en el norte de nuestro país.

Al estudiar niños con infección congénita en etapa crónica provenientes de una región libre de transmisión vectorial, como lo es la Provincia de Jujuy, el ELISA-Mix A+C logró detectar el total de las muestras evaluadas, incluidas sus respectivas madres. La sensibilidad del ELISA-Mix A+C determinada en sueros de humanos infectados fue del 78%; sin embargo, el 100% de los sueros de niños con infección congénita reaccionaron con el ELISA-Mix A+C. Si bien el número de muestras evaluado es pequeño para sacar conclusiones definitivas, las diferencias de reactividad observadas podrían atribuirse a los diferentes orígenes de las muestras y, por lo tanto, distintas cepas *T. cruzi* infectantes. Es importante resaltar que la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha certificado en el 2000 y recertificado en el 2012, que la Provincia de Jujuy se encuentra libre de transmisión vectorial. Sumado a esto, no se registraron triatominos tras la inspección de los domicilios realizada oportunamente por la Bqa. Irma Torrejón y su equipo de trabajo (quienes gentilmente donaron las muestras para este trabajo), indicando que estos casos no son autóctonos de la zona. Dado que las pacientes estudiadas son de origen boliviano o hijas de

madres bolivianas, las muestras de estas familias estarían infectadas con parásitos que circulan en Bolivia, donde los linajes más prevalentes son TcI y TcV. Mientras que, las muestras de pacientes chagásicos utilizadas para la determinación del desempeño diagnóstico de las pruebas son procedentes mayormente de la Región del Gran Chaco Argentino (Provincia de Chaco y departamento Rivadavia, Provincia de Salta), donde los linajes más prevalentes son TcVI, seguido de TcV y TcI (Brenière et al., 2016). Por otro lado, el 90% de los sueros de niños tratados de Chaco, probablemente cursando una fase crónica temprana de la infección (al igual que los niños congénitos de Jujuy estudiados), fueron reactivos el ELISA-Mix A+C. Por lo tanto, el mejor desempeño del ELISA-Mix A+C en estos sueros versus la sensibilidad estimada, podría deberse a que los antígenos TcTASV tendrían una reactividad mayor en sueros de pacientes cursando etapas tempranas de la infección.

La falta de herramientas diagnósticas para monitorear el tratamiento y evaluar la cura a corto plazo representa una limitación importante en el manejo de los pacientes chagásicos, principalmente en los pacientes en fase crónica (WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012; Sguassero et al., 2015). Las pruebas parasitológicas o PCR si bien sirven para determinar falla terapéutica carecen de sensibilidad suficiente para el monitoreo de pacientes post-tratamiento, mientras que las pruebas serológicas convencionales que utilizan extractos del parásito tardan muchos años en negativizar debido a la compleja mezcla de antígenos que involucran. En niños tratados la seroconversión puede observarse a partir de los 3 a 5 años post-tratamiento mientras que en el caso de los adultos puede tomar hasta 20 años observar la seroconversión indicativa de efectividad del tratamiento (Sguassero et al., 2015). Si bien se han descrito numerosos biomarcadores de efectividad de tratamiento ninguno ha sido validado para su uso en reemplazo de las técnicas serológicas estándar. Se requieren de mayores investigaciones para mejorar el desempeño de los marcadores existentes y para identificar moléculas que funcionen como marcadores biológicos de carga parasitaria y que puedan demostrar a corto plazo el éxito terapéutico en un paciente chagásico (Pinazo et al., 2014). Como se mencionó en la introducción de este capítulo, entre los biomarcadores inmunológicos para el monitoreo del tratamiento de la infección chagásica se encuentran la detección de anticuerpos específicos contra antígenos del hospedador o anticuerpos generados contra antígenos del parásito, la medición de niveles de citoquinas y la cuantificación de poblaciones de células relacionadas con la respuesta inmune (Pinazo et al., 2014). Se debe tener en cuenta que la respuesta humoral ante determinado/os antígeno/os que se mide mediante un inmunoensayo podría ser causada por

diferentes clones de linfocitos B de memoria que continúan replicándose por varios años. Un apropiado biomarcador serológico de cura post-tratamiento en pacientes chagásicos sería un antígeno de *T. cruzi*, o anticuerpos específicos contra el mismo, que al ser eliminado el parásito por la terapia tripanomicida y, por lo tanto, desaparecer la estimulación antigénica, también disminuya rápidamente la respuesta humoral. Sanchez Negrette *et al.*, 2008, demostraron que la negativización de los títulos de anticuerpos de pacientes adultos tratados ocurre antes frente a determinados antígenos recombinantes (antígeno 13 y SAPA), que ante otros (antígenos 2 y 30), debido a sus tiempos de vida media menores en células B y dendríticas. Laucella *et al.*, 2009, observaron en pacientes adultos crónicos que la frecuencia de células T productoras de IFN- γ *T. cruzi*-específicas disminuyeron al cabo de ≤ 1 año luego del tratamiento con benznidazol incluso hasta niveles por debajo del umbral de detección (50% de los individuos evaluados). Estos cambios en las respuestas de células T estaban altamente correlacionados con la disminución de respuestas serológicas medidas por un ensayo tipo array con múltiples antígenos recombinantes pero no con las respuestas de anticuerpos medidas por serología convencional (Cooley *et al.*, 2008; Laucella *et al.*, 2009), demostrando que las respuestas de células T y de anticuerpos contra proteínas individuales del parásito resultan mejores como marcadores tempranos y efectivos del impacto del tratamiento (Laucella *et al.*, 2009; Viotti *et al.*, 2011).

En este trabajo evaluamos el ELISA-Mix A+C para el monitoreo serológico de niños crónicos tratados de Chaco debido a que fue el ensayo con mejor desempeño de entre los estudiados. Utilizando este inmunoensayo, evidenciamos una mayor disminución de los niveles de anticuerpos con diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo basal y los tiempos post-tratamiento (dos y cinco años) en comparación con los resultados previos obtenidos con serología convencional (Monje Rumi *et al.*, 2013). En la Tabla II.4, establecemos la comparación entre los resultados obtenidos aquí y los obtenidos en mencionado trabajo, se comparan los 28 sueros de niños que fueron positivos por ELISA-Mix A+C en el tiempo basal. La disminución de los niveles de anticuerpos anti-TcTASV-A+C permitió detectar impacto del tratamiento (disminución de $>30\%$, Santamaría *et al.*, 2013) en un 75% de los pacientes ELISA-Mix A+C positivos, en el periodo de seguimiento evaluado, con una seroconversión del 25%. Mientras que, con el kit de ELISA convencional sólo un 21% (6/28) de los niños tratados demostraron impacto positivo del tratamiento a través de la disminución de los niveles de anticuerpos anti-epimastigotes de *T. cruzi*. El porcentaje de seroconversión determinado mediante el ELISA convencional fue del 7% (3/28), siendo en esos niños el porcentaje de variación de anticuerpos mayor al 75% indicativo de

tendencia a seroconversión de acuerdo con lo planteado por Escriba et al., 2009. Nuestros resultados están en concordancia con trabajos previos en los que se evidencia una disminución más rápida de los títulos de anticuerpos contra antígenos recombinantes específicos del estadio tripomastigote (Pereira-Chioccola et al., 2003; Flores-Chavez et al., 2006; Fabbro et al., 2011; Santamaría et al., 2013) en comparación a la serología convencional practicada en las mismas muestras de pacientes. Esto demuestra las ventajas que podría implicar la selección y utilización de anticuerpos específicos contra antígenos expresados exclusivamente en estadios infectivos como biomarcadores de cura. Como se especificó en el primer capítulo de esta tesis, TcTASV-C es una proteína exclusiva de la superficie de tripomastigotes mientras que TcTASV-A tiene localización intracelular expresándose tanto en tripomastigotes como amastigotes (García et al., 2010). Además, estas proteínas no tienen secuencias repetitivas lo que posiblemente podría producir un menor grado de activación de linfocitos B contra estos antígenos respecto de otros antígenos típicos de la superficie del parásito que funcionan como mitógenos o “superantígenos” produciendo hipergammaglobulinemia (por ejemplo el antígeno repetitivo SAPA). La disminución de anticuerpos anti-TcTASV post-tratamiento podría estar relacionada con la eliminación real del parásito y ser un indicador a corto plazo de cura.

Por otro lado, la evaluación de anticuerpos anti-TcTASV mediante el ELISA-Mix A+C realizado en los pacientes adultos crónicos tratados provenientes de Cucullú no demostró diferencias significativas entre las muestras basales y las muestras post-tratamiento. A diferencia de lo que ocurre en niños, estos resultados son esperables ya que la efectividad del tratamiento disminuye considerablemente en adultos crónicos: entre el 30-50% de los pacientes tratados seronegativizan luego de 15 a 20 años del inicio del tratamiento (Sguassero et al., 2015). En estos pacientes los títulos anti-*T. cruzi* medidos por ELISA con homogenado de epimastigotes no negativizaron tras el tratamiento (Rodríguez, 2017).

Tabla II.4. Seguimiento de los niños tratados de Chaco mediante ELISA-Mix A+C, PCR y Chagatest ELISA (Wiener Lab.)

Paciente *	PCR ^(a) (T0;T1;T2)**	% variación	
		Chagatest ELISA ^(a)	ELISA Mix A+C
TE1	(1;0;0)	-100 [↓]	-55 [↓]
TE2	(1;0;0)	-5	-21
TE3	(0;0;0)	-17	-52
TE4	(1;0;0)	-4	-57
TE5	(1;0;0)	-5	-32
TE6	(0;0;0)	-22	-73 [↓]
TE7	(1;0;0)	-20	-47
TE8	(1;0;0)	3	-13
TE9	(0;0;0)	-17	-55
TE10	(1;0;0)	-33	-64 [↓]
TE11	(0;0;0)	-10	-57
TE12	(0;0;0)	-100 [↓]	-43 [↓]
TE13	(0;0;0)	11	-52 [↓]
TE14	(0;0;0)	-75 [↓]	13
PA1	(1;0;n)	-4	-27
PA2	(0;0;n)	-8	25
PA4	(0;0;n)	4	-52
PA5	(0;0;n)	25	-7
PA6	(0;1;n)	4	-16
PA7	(1;0;n)	-4	-32
PA8	(1;0;n)	-41	-30 [↓]
PA9	(0;0;n)	1	-34
PA10	(0;0;n)	-1	-33
PA11	(1;0;n)	-3	-42
PA13	(0;0;n)	-5	-39
PA14	(1;0;n)	0	-56 [↓]
PA15	(1;0;n)	0	-32
PA17	(0;0;n)	-59	-37

* Pacientes: TE: localidad Tres Estacas; PA: localidad Pampa Ávila. **1: PCR positiva; 0 = PCR negativa; n: no determinada. ^(a) Datos de Monje Rumi et al., 2013. [↓]: indica seroconversión post-tratamiento. El sombreado en tonos rosa se resalta los diferentes rangos de %variación de los niveles de anticuerpos:

30%-50%
50%-75%
>75%

Si bien no todos los pacientes tratados crónicos reaccionaron contra la mezcla TcTASV-A+TcTASV-C, este porcentaje fue bajo: sólo 3 niños de Chaco y un adulto de Cucullú fueron negativos en el tiempo basal. Como se indicó las muestras de pacientes tratados utilizadas en este trabajo proceden de estudios epidemiológicos e intervenciones de Salud realizadas por el grupo del Dr. Patricio Diosque, en la Provincia de Chaco, y por la fundación ADESAR, en la Provincia de Buenos Aires. De modo que las muestras provienen de trabajos no experimentales que consistieron a grandes rasgos de tamizajes de pacientes infectados en áreas endémicas para su posterior tratamiento etiológico y seguimiento mediante técnicas convencionales de serología y/o PCR. Por

lo mencionado no se disponía de muestras de pacientes no tratados monitoreados al mismo tiempo como grupo control. Sin embargo, consideramos que las características de los antígenos TcTASV (antígenos no repetitivos, que se expresan de forma exclusiva y en estadios infectivos del hospedador mamífero) sumado a los resultados hallados aquí, demuestran que la detección de anticuerpos anti-TcTASV-A+C podría ser una alternativa interesante para el seguimiento serológico del tratamiento de la infección chagásica. Además, esta respuesta resulta medible de forma, sencilla y económica mediante un ensayo de ELISA-*in house* que podría ser aplicado en centros de salud en áreas endémicas.

Capítulo III : Utilidad diagnóstica de TcTASV en perros infectados naturalmente por *T. cruzi*

III.1. Introducción

Papel epidemiológico de los perros

A pesar de los esfuerzos de organismos multinacionales, nacionales y provinciales por eliminar la transmisión vectorial de la infección chagásica, en la actualidad persisten regiones, como lo es el Gran Chaco, en las que se registran altos índices de infestación domiciliaria con triatomíneos y elevadas tasas de prevalencia de infección por *T. cruzi* tanto en humanos como animales domésticos (Pinto Dias, 2007; Gürtler, 2009; Moretti et al., 2010; Samuels et al., 2013). En éstas regiones endémicas en las que el ciclo de transmisión se encuentra activo, los perros constituyen los reservorios domésticos de *T. cruzi* más importantes (Cardinal, Castañera, et al., 2006; Gürtler et al., 2007). Se han reportado prevalencias de infección en perros del 15.9%, 26% y hasta el 60.3% determinadas por serología y/o xenodiagnóstico, en localidades de las provincias de Chaco y Santiago del Estero, respectivamente (Diosque et al., 2004; Gürtler et al., 2007; Cardinal et al., 2014).

El papel de los perros como fuentes domésticas del parásito y, por ende, su importancia en el ciclo de transmisión vectorial ha sido ampliamente estudiado (Gürtler et al., 1998, 2005, 2007, 2009; Cardinal, Castañera, et al., 2006; Cardinal et al., 2008, 2014; Gürtler & Cardinal, 2015). La gran capacidad de estos animales como reservorios está dada por múltiples factores. Por un lado, por su capacidad de mantener el ciclo reproductivo de *T. cruzi* con elevados niveles de parasitemia (Lauricella et al., 1986). Por otro lado, se ha demostrado la preferencia alimentaria de las vinchucas frente a los perros con respecto a gatos, gallinas y al hombre (Gürtler et al., 2009). Sumado a esto, estudios previos comprobaron que la probabilidad de los triatomíneos de infectarse

al alimentarse de un perro infectado es más elevada que al alimentarse de otros hospedadores domésticos (Gürtler et al., 2005, 2007, 2009; Enriquez et al., 2014). El riesgo de transmisión de los perros a los humanos se ve incrementado por la permanencia de estos animales en el interior de las viviendas, especialmente su presencia en las habitaciones en las horas de descanso, lo que incrementa la tasa de contacto con los triatominos. En este sentido, Gürtler et al. (2005) han demostrado que la presencia y número de perros infectados en las viviendas están asociadas a la incidencia de la infección en niños (Gürtler et al., 2005); y que los casos incidentes en las poblaciones de perros ocurren incluso a bajos niveles de infestación con triatominos (Gürtler et al., 2007).

Para que una especie animal sea capaz de actuar como centinela de la exposición humana a riesgos ambientales como ser una enfermedad infecciosa, debe reunir una serie de características: 1) ser susceptible, sensible y tener una respuesta medible al agente infeccioso; 2) ocupar un territorio que se superpone al área monitoreada; 3) ser accesible, fácil de enumerar y capturar; 4) tener una población con el tamaño adecuado para la toma de muestras representativas (Committee on Animals as Monitors of Environmental et al., 1991). Como se ha mencionado en los párrafos anteriores, los perros cumplen con estas características y consecuentemente pueden actuar como centinelas de la infección humana por *T. cruzi* en regiones endémicas (Castañera et al., 1998; Cardinal, Castañera, et al., 2006). En un estudio realizado en comunidades rurales de Santiago del Estero, se evidenció que en aquellos perros mayores de 10 años la prevalencia de infección resultaba mayor debido a que estos habían nacido antes de la última (y, hasta el momento del estudio, única) aplicación de insecticidas a nivel comunitario cuando los niveles de infestación con triatominos domiciliarios eran elevados; mientras que, los perros de menor edad registraban prevalencias de infección menores (Cardinal, Castañera, et al., 2006). Sin embargo, los casos incidentes post-aplicación se dan en perros menores de dos años que parecen ser más susceptibles a adquirir la infección dado sus hábitos y comportamiento en comparación a los perros adultos: duermen durante periodos de tiempo más largos y, además, su sistema inmune es aún inmaduro (Castañera et al., 1998). Los casos incidentes se deberían a la persistencia de focos de infestación con triatominos infectados que mantienen la transmisión vectorial y que, por lo tanto, representan un factor de riesgo a la transmisión a los humanos (Castañera et al., 1998). Estos últimos casos deberían ser el blanco de atención en campañas de vigilancia post-pulverización de insecticidas. La detección de la infección canina activa constituye

una herramienta eficaz para evaluar la efectividad de las campañas de control de vectores y para estimar el riesgo de transmisión a los humanos en áreas endémicas para la infección por *T. cruzi*.

Diagnóstico de la infección en perros

Los métodos serológicos convencionales, tales como los ensayos de ELISA y hemoaglutinación indirecta, empleados para la detección de la infección por *T. cruzi* en humanos han sido estandarizados o adaptados para su uso en perros (Lauricella et al., 1993, 1998). Estos métodos demuestran mayor aplicabilidad a fines de screening a campo, ya que son prácticas, económicas y no necesitan de equipos sofisticados. Las técnicas parasitológicas, como ser el hemocultivo y el xenodiagnóstico, aunque altamente específicas tienen baja sensibilidad, son laboriosas y requieren de largo tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta obtener resultados (Eloy & Lucheis, 2012). Aunque la combinación del hemocultivo seguido de la PCR resultó en una mejora de sensibilidad en la detección de *T. cruzi* en perros, no superó la de los métodos serológicos convencionales (Eloy & Lucheis, 2012). Por otro lado, la técnica de PCR por sí sola demuestra una especificidad incluso superior que las técnicas parasitológicas dada por los cebadores que se unen específicamente al ADN del parásito si éste está presente en la muestra, pero su sensibilidad también es baja en comparación a los métodos serológicos. La baja sensibilidad de estas técnicas se debe a la disminución de la parasitemia una vez superada la etapa aguda de la infección que disminuye la posibilidad de detectar el parásito o fragmentos del mismo. En el caso de la PCR, se ha reportado un incremento en su capacidad para detectar la infección mediante la toma de hasta 9 muestras de sangre seriadas en perros con infección crónica experimental (Araújo et al., 2002). Esto último hace que la PCR no pueda ser utilizada de forma aislada como una herramienta de diagnóstico concluyente (Araújo et al., 2002). Además, se requiere de equipamiento especializado y costoso para que esta técnica de biología molecular sea aplicada en áreas endémicas con precariedad de condiciones de infraestructura y recursos humanos.

Pareciera ser, entonces, que la serología convencional representa la mejor alternativa para el diagnóstico de la infección en perros. Sin embargo, al igual que para el caso de humanos, una limitación de estas técnicas es que utilizan extractos crudos del parásito que comparten epítopes con proteínas de otros patógenos, tales como *Leishmania spp* (Umezawa et al., 2009). Esto puede provocar reactividad cruzada cuando se estudian muestras de áreas co-endémicas, como algunas

regiones del Gran Chaco (por ejemplo, regiones del Chaco Húmedo). El uso de antígenos especie-específicos producidos por tecnologías recombinantes, es un sustituto efectivo de los homogenados proteicos del parásito, y una alternativa adecuada para superar el problema de reactividad cruzada (Umezawa et al., 1999; Da Silveira et al., 2001). No obstante, hasta la fecha a pesar de que la performance de diferentes antígenos recombinantes utilizados para detectar la infección en humanos ha sido ampliamente examinada y validada, pocos antígenos han sido evaluados para el inmunodiagnóstico de la infección canina. Son pocos los antecedentes que existen sobre el estudio de métodos diagnósticos de la infección en perros. En la mayoría de estos trabajos, utilizan ya sea extractos crudos del parásito o bien fracciones del mismo ya sea la fracción flagelar o antígenos secretados-excretados (Lauricella et al., 1993, 1998; Umezawa et al., 2009; Lardeux et al., 2016). Por último, los escasos estudios donde se aplicaron técnicas inmunológicas con antígenos recombinantes son poco comparables debido a que utilizan distintas técnicas: desde ELISA (Cimino et al., 2011, 2012; Florida-Yapur et al., 2014), Inmunocromatografía (Cardinal, Reithinger, et al., 2006) y ensayo de inhibición de la Trans-sialidasa (Sartor et al., 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas TcTASV tienen características que nos llevaron a proponer que serían buenos candidatos para el diagnóstico de la infección en perros. En este capítulo, planteamos evaluar la utilidad de las proteínas TcTASV-A, TcTASV-B y TcTASV-C para detección de la infección en sueros de perros naturalmente infectados provenientes del Gran Chaco, Argentina.

Objetivo general:

Estudiar la capacidad de los antígenos de la familia TcTASV para detectar la infección chagásica natural en perros.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar la capacidad diagnóstica de ensayos de ELISA con los antígenos TcTASV para la detección de la infección chagásica en perros.
2. Mapear epítomos lineales del antígeno TcTASV-C con sueros de perros.
3. Estudiar a TcTASV-C como un marcador serológico de la infección, mediante Western Blot.

III.2. Resultados

III.2. Sección 1. Evaluación de la capacidad diagnóstica de los antígenos TcTASV mediante ensayos de ELISA para la detección de la infección chagásica en perros

Para esta sección del capítulo III, en primer lugar se estandarizó la técnica de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-TcTASV en sueros de perros. A continuación, se analizó la reactividad ante los antígenos TcTASV de un panel de sueros de perros infectados con *T. cruzi* provenientes de área endémica (Provincia de Chaco) y de sueros sanos de áreas no endémicas o de perros leishmaniásicos (Figura III.1). Dentro del grupo de perros infectados (ELISA-homogenado de *T. cruzi* positivos) se incluyeron perros con evidencia parasitológica de *T. cruzi* por xenodiagnóstico y/o PCR (Figura III.1). Y, por último, se calcularon los parámetros de eficacia diagnóstica correspondientes para las pruebas de ELISA con los antígenos TcTASV. Los resultados de esta sección del capítulo III, fueron publicados en *Parasitology* (Florida-Yapur et al., 2016).

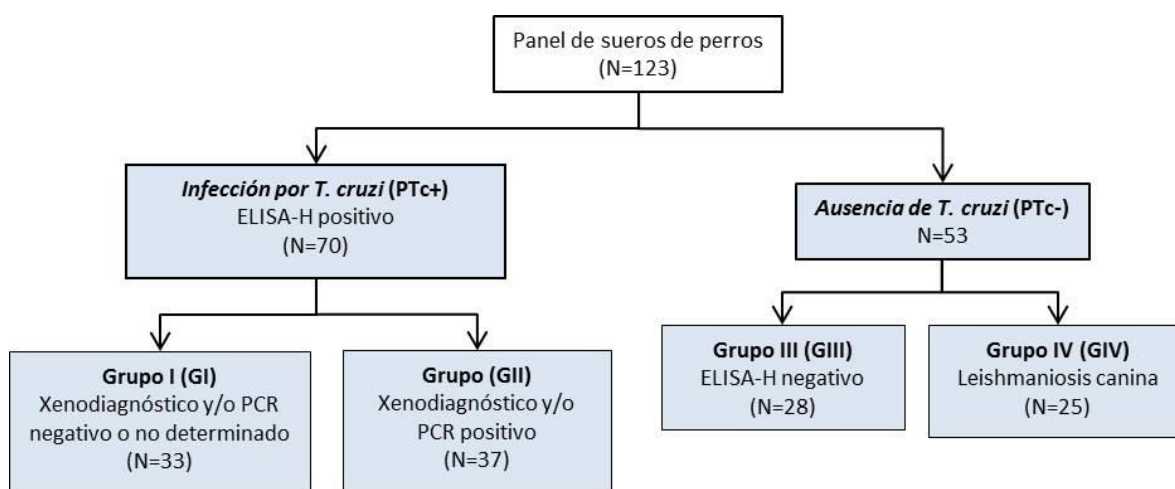


Figura III.1 Diagrama de flujo de los sueros de perros utilizados.

Reactividad de los sueros de perros infectados (PTc+) y no infectados (PTc-) contra las proteínas TcTASVs

Los sueros de perros infectados con *T. cruzi* (PTc+) y de los controles no infectados (PTc-) se evaluaron primero contra los antígenos TcTASVs plaqueados separadamente. Los niveles de anticuerpos contra TcTASV-A y contra TcTASV-C fueron significativamente superiores en los perros PTc+ que en PTc- (Figura III.2). Además, todos los sueros control del grupo PTc- fueron clasificados como negativos por TcTASV-A y TcTASV-C (0/53) (Tabla III.1). La positividad de los sueros infectados con *T. cruzi* fue de 57.1% (40/70) para TcTASV-A y 52.9% (37/70) para TcTASV-C (Tabla III.1). De nuevo, el ELISA-TcTASV-B_{GST} obtuvo una baja especificidad (50%) por lo que no se realizaron análisis posteriores con este antígeno.

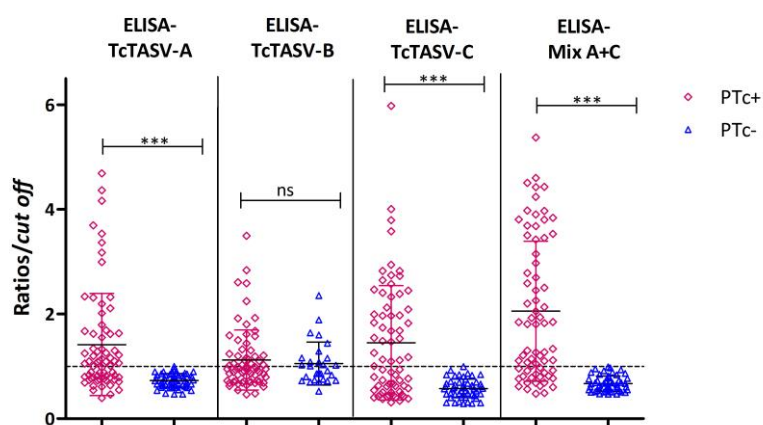


Figura III.2 Reactividad de los sueros de los grupos PTc+ y PTc- contra los antígenos TcTASV-A, TcTASV-B, y TcTASV-C y contra una mezcla antigénica de TcTASV-A y TcTASV-C en los ensayos de ELISA. ***: $p < 0.05$, Mann-Whitney U-test; ns: no-significativo.

A pesar de que los ELISAs con TcTASV-A y TcTASV-C obtuvieron un porcentaje similar de resultados positivos, los ensayos coincidieron sólo en 21 sueros PTc+. La combinación de ambos ensayos nos permitió clasificar 56 sueros PTc+ como TcTASVs reactivos, lo que sugería que llevando a cabo un ensayo de ELISA con una mezcla TcTASV-A + TcTASV-C, podría mejorar la reactivos contra la mezcla TcTASV-A + TcTASV-C (ELISA-Mix A+C), probando que la reactividad de los sueros contra cada antígeno puede ser sumada en un ensayo (Tabla III.1 y Figura III.2).

Reactividad diferencial del ELISA TcTASV-A+C en perros con resultados positivos por PCR y/o xenodiagnóstico

A pesar de la diferencia en la reactividad media entre PTc+ y PTc-, algunos sueros del grupo PTc+ no reaccionaron contra TcTASV-A, TcTASV-C ni contra la mezcla de los mismos. Consecuentemente, analizamos si estas diferencias en positividad podrían estar asociadas con el estado de la infección de los perros muestreados. Consideramos que aquellas muestras con xenodiagnóstico y/o PCR positivos procedían de perros con niveles de parasitemia detectables y, por lo tanto, posiblemente estarían cursando una etapa de infección activa al momento del muestreo. Los sueros de perros que fueron diagnosticados como PTc+ por ELISA-H y xenodiagnóstico y/o PCR (grupo GII, ver Materiales y Métodos), reaccionaron preferentemente contra los antígenos TcTASV (Figura III.3). Tanto el número de sueros reactivos como la media de los ratios obtenidos, fue mayor en el grupo GII que en el grupo GI. Esas diferencias fueron significativas para los ELISAs -TcTASV-C y -Mix A+C (Figura III.3, Tabla III.1).

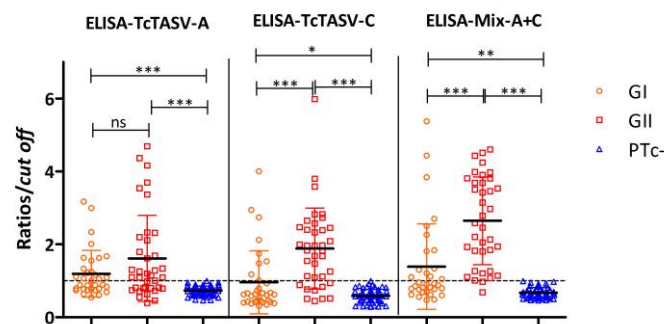


Figura III.3 Reactividad de los sueros de los grupos GI, GII y PTc- contra los antígenos TcTASV-A y TcTASV-C y contra una mezcla antigénica de TcTASV-A y TcTASV-C en los ensayos de ELISA. ***: $p < 0.05$, Mann-Whitney U-test; ns: no-significativo. GI: sueros de perros PTc+ con PCR y/o xenodiagnóstico negativo o no determinado; GII: sueros de perros PTc+ con niveles detectables de parásitos por PCR y/o xenodiagnóstico.

La Tabla III.1 resume los parámetros del desempeño de los ELISAs calculada para los antígenos estudiados. La sensibilidad y el área bajo la curva (AUC) ROC variaron de acuerdo a los grupos de suero considerados como controles positivos. Cuando todo el grupo PTc+ (GI + GII) fue considerado, la sensibilidad era siempre un valor intermedio entre los porcentajes obtenidos en los grupos GI and GII (Tabla III.1). La sensibilidad más alta de entre los TcTASV-ELISAs evaluados fue obtenida cuando sueros del grupo GII fueron considerados como el grupo control positivo mientras que los valores más bajos fueron obtenidos con el grupo GI como grupo positivo. El

patrón descrito fue consistente para todos los ensayos evaluados. Los valores de AUC ROC variaron en un patrón similar, excepto para TcTASV-A-ELISA donde se obtuvo un valor de 0.8 para todos los grupos de suero considerados. La Especificidad fue máxima para todos los ensayos (100%). Estos resultados demostrarían una reactividad diferencial contra los antígenos TcTASVs, especialmente contra TcTASV-C o la Mix A+C, de los sueros de perros que se encontrarían cursando una infección activa (parásitos detectados en la sangre periférica por xenodiagnóstico, o ADN de *T. cruzi* detectado por PCR).

Tabla III.1 Resumen de parámetros de eficacia diagnóstica				
ELISA	Sensibilidad [IC95%]		Especificidad [IC95%]	AUC ROC [IC95%]
	Grupo	% (posit/total) [IC95%]		
TcTASV-A	PTc+ (GI+GII)	57.1% (40/70) [44.8-68.9]	100% (0/53) [93.3-100]	0.8 [0.72- 0.88]
	GI	51.5% (17/33) [33.5- 69.2]		0.8 [0.7-0.9]
	GII	62.2% (23/37) [44.8-77.5]		0.8 [0.7-0.91]
TcTASV-C	PTc+ (GI+GII)	52.9% (37/70) [40.6-64.9]	100% (0/53) [93.3-100]	0.76 [0.68- 0.85]
	GI	27.3% (9/33) [13.3-45.5]		0.59 [0.46-0.72]
	GII	75.7% (28/37) [58.8-88.2]		0.91 [0.85-0.98]
MIX A+C	PTc+ (GI+GII)	70% (49/70) [57.9-80.4]	100% (0/53) [93.3-100]	0.89 [0.84-0.95]
	GI	42.4% (14/33) [25.5-60.8]		0.79 [0.68-0.89]
	GII	94.6% (35/37) [81.8-99.3]		0.99 [0.97-1]

III.2. Sección 2. Mapeo de epítopes de TcTASV-C mediante ELISA

A fines de profundizar en el estudio de TcTASV-C como una proteína útil para el diagnóstico de la infección en perros, se mapearon los epítopes lineales de esta proteína utilizando 6 péptidos sintéticos de TcTASV-C que se disponían en el laboratorio (ver Materiales y Métodos). Los péptidos fueron diseñados a partir de predicciones bioinformáticas de epítopes de células B (Rodríguez et al., 2015) y de epítopes previamente descubiertos a partir del screening de un microarray de péptidos con sueros de humanos infectados en el cual se incluyeron secuencias de cuatro proteínas TcTASV-C (Carmona et al., 2015). Los 6 péptidos sintéticos (16-19 aminoácidos) de la secuencia de TcTASV-C utilizados incluían: tres péptidos cuya secuencia está fuera de los motivos conservados de la familia y de la subfamilia, motivos *tasv_all* // *tasv_c* (P172_188, P189_207, P304_319) y tres péptidos cuya secuencia se encuentra dentro del motivo de la subfamilia *tasv_c*, pero dos de ellos se encuentran dentro del motivo *tasv_all* (P46_62 y P47_63) y uno se encuentra fuera (P73_89) (Figura III.4). Cada péptido se nombró con la letra “P” seguida de los números correspondientes a los aminoácidos de la secuencia de TcTASV-C que abarca ese péptido. Estos péptidos, se utilizaron para el mapeo de epítopes lineales mediante ELISA con sueros de perros infectados naturalmente.

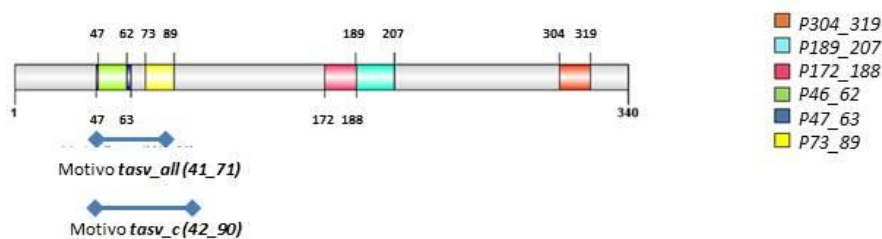


Figura III.4 Péptidos sintéticos de TcTASV-C utilizados. Se muestran sus posiciones relativas a los motivos *tasv_all* y *tasv_c*

Se utilizaron en total 69 muestras el panel de sueros de perros evaluado en la sección III.1, incluyendo: 28 sueros de perros infectados con *T. cruzi* (PTc+), todos reactivos ante ELISA-TcTASV-C previamente: 21 sueros del Grupo I (ELISA-H positivos; PCR y/o xenodiagnóstico positivos) y 7 sueros del Grupo II (ELISA-H positivos; PCR y/o xenodiagnóstico no determinado o negativo); y, 41 sueros del grupo de perros sin infección por *T. cruzi* (PTc-), negativos para ELISA-TcTASV-C: 26 del Grupo III (sanos) y 15 del grupo IV (Leishmaniosis canina).

Como era de esperarse, los sueros del grupo PTc- (negativos por ELISA-TcTASV-C) evaluados resultaron no reactivos contra todos los péptidos. Por otro lado, el 70% (20/28) de los

sueros de perros infectados TcTASV-C+ reaccionaron al menos con un péptido y el 35% (10/28) reaccionaron con 2 o más péptidos. Los péptidos P189_207 y P172_188, que se encuentran fuera del motivo conservado *tasv_all* y *tasv_c*, fueron los más detectados: 64.3% y 46.4%, respectivamente (Figura III.5). El porcentaje de sueros reactivos frente a los péptidos P304_319 (14.3%), P46_62 (7.1%) y P47_63 (7.1%) fue bajo y ningún suero reaccionó con el péptido P73_89, siendo estos tres últimos péptidos parte de la secuencia del motivo *tasv_c*. Cabe destacar que si bien la reactividad de los sueros frente a los péptidos P46_62 y P47_63 es baja (Figura III.5), los dos sueros que reaccionan frente a uno u otro pertenecen a distintos individuos. Estos péptidos difieren en un sólo aminoácido y esa diferencia es suficiente para que sean detectados por distintos sueros. Además, mientras que el péptido P172_188 es uno de los más detectados por sueros de perros infectados, ningún suero de humano infectado reaccionó ante este péptido (Rodríguez et al., 2015), evidenciando que distintas especies de hospedador reconocerían diferentes epítopes B de TcTASV-C.

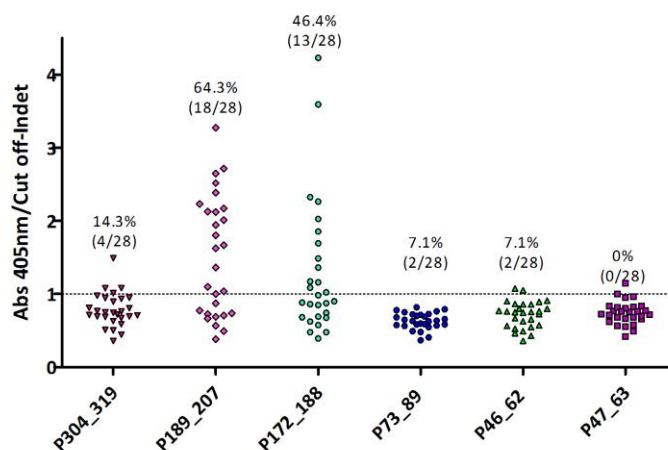


Figura III.5 Reactividad de los sueros de perros PTc+ positivos por ELISA-TcTASV-C ante los distintos péptidos.

Al comparar entre los grupos GI y GII de sueros PTc+ mostraron reactividades diferenciales frente a los distintos péptidos (Figura III.5, Tabla III.2). Sesenta y siete por ciento (14/21) de los sueros de perros del GII con probable infección activa (xenodiagnóstico y/o PCR positivos) evaluados reaccionaron al menos con un péptido. Para el GI de sueros de perros este porcentaje fue 85.7% (6/7). Ambos grupos de sueros demostraron positivities altas frente a los péptidos P189_207 y P172_188. Sin embargo, si bien numéricamente estos grupos no son parejos (21 GII vs 7 GI) se observaron diferencias: un 57% de los sueros del GII reaccionaron frente al péptido

P189_207, mientras que el 86% de los sueros del GI reaccionaron frente a ese péptido. Por otro lado mientras que sólo un suero del grupo GII reaccionó contra el péptido P304_319, 3 (43%) del GI reaccionaron contra ese péptido (Figura III.5, Tabla III.2).

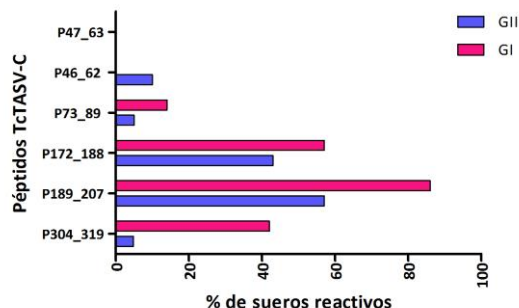


Figura III.6 Porcentaje de sueros de perros de los grupos GI y GII reactivos ante los distintos epítopes B de TcTASV-C. Se observa que el porcentaje de sueros reactivos contra el péptido P47_63 fue nulo (ausencia de barras); de manera similar, ningún suero del GI reaccionó contra el péptido P46_62.

Tabla III.2. Reactividad de los sueros de los grupos GI y GII ante los distintos péptidos de TcTASV-C.

Péptido	GI						% Sueros reactivos	GII										% Sueros reactivos				
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12		
P304_319	Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	42%	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	4%
P189_207	Reactivo	Reactivo	No Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	86%	No Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	No Reactivo	57%
P172_188	Reactivo	Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	57%	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	Reactivo	43%
P46_62	Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	14%	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	5%
P47_63	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	0%	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	10%
P73_89	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	0%	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	No Reactivo	0%

■ Reactivo
■ No Reactivo

III.2. Sección 3. Estudio de TcTASV-C como un biomarcador serológico de la infección chagásica en perros

Los resultados obtenidos mediante ELISA que se explicitan en la secciones anteriores nos llevaron a plantear que TcTASV-C podría ser un antígeno marcador de infección activa en perros infectados naturalmente (Florida-Yapur et al., 2016). En concordancia con esta hipótesis, resultados previos de nuestro grupo de trabajo demuestran que en ratones infectados el pico de parasitemia coincide con el pico de anticuerpos anti-TcTASV-C (Bernabó et al., 2013) y que la expresión de TcTASV-C es hasta 100 veces superior en tripomastigotes circulantes sanguíneos que en los tripomastigotes obtenidos de cultivos *in vitro* (Tekiel et al., 2014). Además, sabemos que la proteína está altamente glicosilada, se expresa en la superficie del parásito y se libera espontáneamente al medio, por lo que estaría en contacto con el sistema inmune del hospedador (Bernabó et al., 2013). Por lo tanto, creíamos relevante estudiar la posibilidad de detectar el antígeno en suero a modo de biomarcador de la infección. Para dar respuesta a este planteo estudiamos, en primer lugar, la detección de TcTASV-C en sueros de perros infectados naturalmente mediante Western-Blot. A continuación, se evaluó la posibilidad de captura y elución del antígeno de interés a partir de un pool de sueros infectados mediante una columna de afinidad con anticuerpos anti-TcTASV-C.

Detección de TcTASV-C en sueros de perros infectados mediante Western- Blot

Una vez estandarizada la técnica de Western-Blot para la detección del antígeno TcTASV-C en pools de sueros normales contaminados con la proteína recombinante, se evaluaron sueros de perros infectados para la detección de la TcTASV-C nativa. Se seleccionaron sueros del panel en la Figura III.1 que fueran preferentemente positivos por ELISA-TcTASV-C y/o positivos por PCR y/o xenodiagnóstico. En la Tabla III.3 se indican los sueros de perros infectados estudiados por Western-Blot para la detección de TcTASV-C. Se resumen los resultados de xenodiagnóstico (XD), PCR, ELISA-H, ELISA-TcTASV-A, ELISA-TcTASV-B, ELISA-TcTASV-C y ELISA-Mix A+C, para cada uno de los sueros estudiados en esta sección.

Tabla III.3. Resumen de sueros de perros infectados estudiados por Western-Blot para la detección de TcTASV-C.

Suero	XD	PCR	ELISA-H	ELISA-TcTASV-A	ELISA-TcTASV-B	ELISA-TcTASV-C	ELISA-Mix A+C
1	-	+	+	-	-	+	-
2	-	+	+	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	-	+	+
5	ND	+	+	-	-	+	+
6	+	-	+	+	-	+	+
7	-	+	+	+	+	+	+
8	-	+	+	+	-	+	+
9	ND	ND	+	+	+	+	+
10	ND	ND	+	+	+	+	+
11	ND	ND	+	-	-	+	-
12	+	+	+	+	+	+	+
13	-	+	+	-	+	-	+
14	+	+	+	+	+	-	+
15	+	+	+	-	+	+	+

Todos los sueros de perros infectados evaluados presentaron una banda reactiva por debajo del marcador de peso de 70KDa (~65KDa) que pudo ser evidenciada por revelado con fluorescencia y/o quimioluminiscencia. Cabe destacar que la TcTASV-C recombinante, incluida como control positivo en las membranas, genera una banda de peso molecular ~70KDa, dado por su unión a GST: la secuencia de TcTASV-C clonada tiene un peso molecular de 36KDa, mientras que GST, ~29KDa. Por otro lado, la TcTASV-C nativa con sus múltiples glicosilaciones tiene un peso molecular de ~60Kda, pudiéndose encontrar leves diferencias entre diferentes cepas de *T. cruzi*. En la Figura III.7.A y B se muestran dos membranas reveladas en las que se evaluó la presencia de TcTASV-C en distintos grupos de sueros de perros, que fueron enfrentados con un suero hiperinmune de conejo anti-TcTASV-C_{GST} (anticuerpo primario). En la Figura III.7.A se presenta una membrana revelada por fluorescencia en la que puede observarse que tanto los sueros de perros infectados como el pool de sueros sanos presentan una banda intensa a la altura del marcador de peso molecular de 70KDa y una banda por debajo del marcador. Esta última, correspondería a TcTASV-C mientras que la primera –hipotetizamos- correspondería a la albúmina o alguna otra

proteína de PM similar presente en el suero (~69KDa). En la Figura MyM.5 (ver *Ensayos de Western Blot para detección de TcTASV-C en sueros de perros infectados*, en Materiales y Métodos) puede observarse que todos los sueros presentan esa banda intensa en la tinción con Rojo Ponceau de la membrana transferida. Por otro lado, en la Figura III.7.B se presenta una membrana revelada por quimioluminiscencia, en la que puede apreciarse que sólo los sueros de

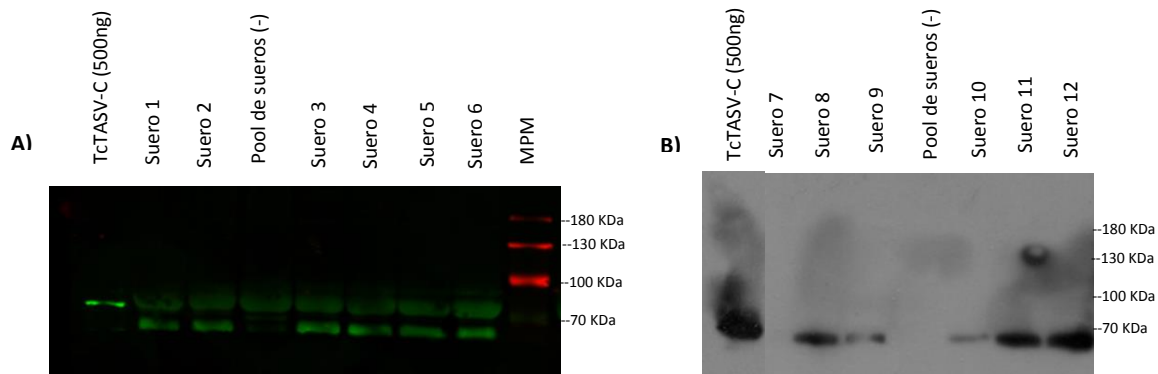


Figura III.7 La membrana A fue revelada por fluorescencia con los siguientes parámetros: 700, int 5; 800, int 6 (anticuerpo secundario utilizado: anti-IgG de conejo conjugado con cromóforo 800nm). La membrana B fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el reactivo Pico con un tiempo de exposición de la placa de 15 segundos (anticuerpo secundario utilizado: anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa).

perros efectivamente infectados con *T. cruzi* presentan la banda específica correspondiente a TcTASV-C, por debajo del marcador de 70KDa. Hipotetizamos que la presencia de bandas inespecíficas en las membranas reveladas por fluorescencia, se podría deber a la adhesión de los

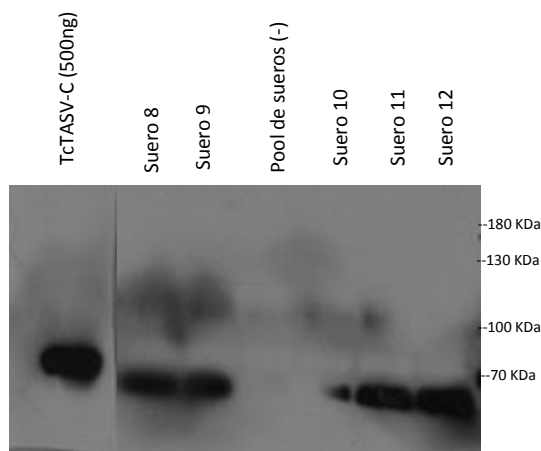


Figura III.8 Membrana revelada por quimioluminiscencia revelada con anticuerpo primario de ratón anti-TcTASV-C.

fluoróforos a la albúmina causando inespecificidad. Esta es una de las causas por las cuales la albúmina no puede utilizarse como agente de bloqueo en membranas que serán reveladas por este sistema (Manual Odyssey™ Western Blotting Protocols).

Para confirmar los resultados obtenidos empleando el suero anti-TcTASV-C desarrollado en conejo, quisimos comprobar que TcTASV-C pudiera detectarse en los mismos sueros de perros utilizando un anticuerpo primario anti-TcTASV-C desarrollado en otra especie (ratón). Para esto, las mismas membranas que ya habían sido reveladas, fueron *strippeadas* para eliminar los anticuerpos primario y secundario y, luego de verificar la ausencia de reactividad al incubar con reactivo de quimioluminiscencia, repetimos el Western-Blot empleando el anticuerpo primario anti-TcTASV-C hecho en ratón (1/1600) y el secundario correspondiente. El revelado por quimioluminiscencia demostró las mismas bandas reactivas correspondientes al peso molecular de TcTASV-C en todos los sueros evaluados (Figura III.8), con lo que concluimos que efectivamente, estamos detectando de manera específica TcTASV-C presente en sueros de perros infectados. Como se mencionó anteriormente, la banda correspondiente a TcTASV-C se evidenció en los 15 sueros de perros estudiados de los cuales 12 tenían PCR y/o xenodiagnóstico positivo y para los otros tres sueros estas pruebas no fueron determinadas por lo que no podemos asegurar ausencia de parasitemia detectable.

A continuación, se realizaron una serie de experiencias adicionales para reconfirmar que la banda detectada mediante Western-Blot realmente fuera TcTASV-C. En primer lugar, se realizó una experiencia para chequear que la banda observada por debajo del MPM de 70KDa correspondía al antígeno de *T. cruzi* y no a un componente del suero que presentara reactividad cruzada con nuestros anticuerpos. Para esto se realizaron diluciones de un suero positivo en el pool de sueros negativos y se sembraron esas diluciones en el gel, para el posterior desarrollo del Western-Blot. Se reveló la mitad de la membrana por quimioluminiscencia y la mitad por fluorescencia. En la Figura III.9 se muestra el revelado por fluorescencia en el cual se puede observar como la banda correspondiente a TcTASV-C en el pool de sueros de perros infectados disminuye su intensidad a medida que este pool se diluye en el pool de sueros sanos.

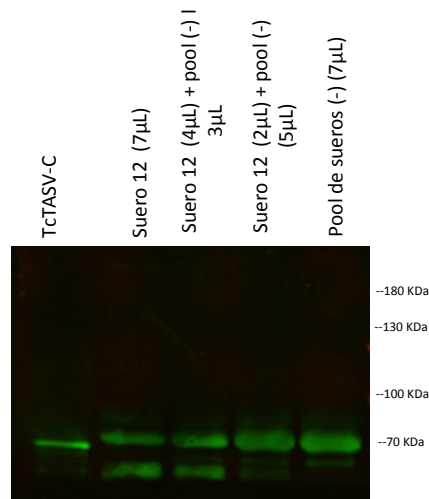


Figura III.9 Western-Blot evaluando diluciones de suero de perro infectado en pool de sueros de perros sanos para chequear la dilución de TcTASV-C manteniendo las proteínas de la matriz constantes. Se muestra la mitad de membrana revelada por fluorescencia. La incubación con anticuerpo primario se realizó ON con suero de conejo anti-TcTASV-C 1/200.

Captura de TcTASV-C a partir de sueros de perros infectados con T. cruzi mediante columna de afinidad

A partir de los resultados obtenidos por Western-Blot se procedió a el armado de una columna de afinidad (SulfoLink) en la que acoplamos anticuerpos anti-TcTASV-C_{GST} de conejo a fines de captar TcTASV-C libre a partir de suero de perros infectados. Se realizaron dos purificaciones: una a partir de un pool de sueros de perros infectados y otra a partir de un pool de sueros normales de perros como control. Los eluidos de ambas purificaciones fueron evaluados mediante Western-Blot para la detección de TcTASV-C con un suero de conejo anti-TcTASV-C_{GST} 1/200 como anticuerpo primario.

En las Figura III.10 se muestran los revelados de los ensayos de Western Blot para evaluar la presencia de TcTASV-C en los eluidos resultantes de la purificación de TcTASV-C a partir del pool de sueros de perros infectados. Se evidenció una banda fuertemente reactiva en el eluido dos obtenido a partir del pool de sueros infectados, siendo positivo el control de TcTASV-C recombinante y el control del pool de sueros infectados 1/20, mientras que para la purificación a

partir del pool de sueros sanos, no se evidenció ninguna banda correspondiente a la proteína de interés.

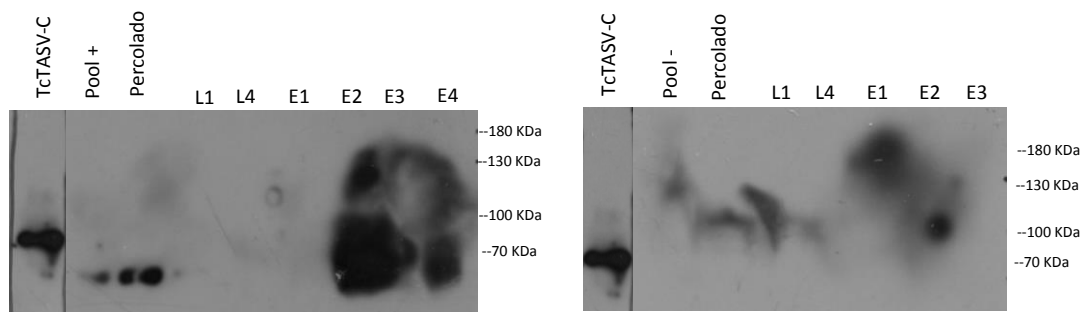


Figura III.10 Western-Blot para el chequeo de las purificaciones con la columna SulfoLink-anti-TcTASV-C a partir del control pool de sueros normales (derecha) y a partir del pool de sueros infectados (izquierda). Pool -/Pool+: pool de sueros negativo o positivo, respectivamente, en dilución 1/20; L: Lavados; E: Eluidos; TcTASV-C: 100ng.

III.3. Discusión

Los perros son considerados como el reservorio doméstico más importante de *T. cruzi* en regiones endémicas, como el Gran Chaco, y no solo constituyen un factor de riesgo para la transmisión a humanos sino que también pueden actuar como centinelas de la infección humana (Castañera et al., 1998; Cardinal, Castañera, et al., 2006; Gurtler et al., 2007). Por lo tanto, los estudios sobre la detección del parásito en estos reservorios son relevantes. Debido a que la sensibilidad de la PCR y de los métodos parasitológicos depende de parasitemias elevadas, los métodos serológicos usando antígenos recombinantes definidos podrían representar una alternativa sensible, específica y económica para alcanzar un diagnóstico confiable. En este sentido, las proteínas de la familia TcTASV podrían ser candidatos diagnósticos prometedores debido a que se expresan diferencialmente en tripomastigotes y no tienen ortólogos en tripanosomátidos relacionados (García et al., 2010; Bernabó et al., 2013). Más aún, estas proteínas están conservadas en los linajes TcI y TcVI que predominan en las infecciones caninas en el Gran Chaco (Monje-Rumi et al., 2015). Todo lo mencionado nos llevó a proponer la evaluación del desempeño diagnóstico de los antígenos TcTASVs para la detección de la infección por *T. cruzi* en perros infectados naturalmente de áreas endémicas, como uno de los objetivos específicos de esta Tesis.

En nuestro estudio expresamos un miembro representativo de cada subfamilia TcTASV y analizamos la reactividad de los sueros contra estas proteínas usando un formato de ELISA. Los controles de infección fueron agrupados dependiendo de si presentaban o no evidencia directa de la presencia del parásito (Grupo II y Grupo I de sueros PTc+, respectivamente). Es común encontrar estudios donde sólo las muestras parasitológicas positivas son consideradas como controles positivos debido a que la presencia del parásito es una prueba innegable de infección (Umezawa et al., 2009; Floridia-Yapur et al., 2014). Sin embargo, en zonas endémicas, los reservorios mamíferos pueden estar cursando ya sea la etapa aguda (con niveles detectables de parasitemia, a pesar de que en ocasiones sólo lo son luego de amplificación por PCR) o una etapa crónica/indeterminada (con parasitemia no aparente) en un momento determinado. Por lo tanto,

consideramos que el enfoque aplicado en esta tesis es apropiado para la evaluación de una prueba diagnóstica novedosa para reservorios infectados de zonas endémicas. También es importante mencionar que las muestras usadas en este trabajo fueron colectadas de un área donde no se reportaron ni vectores flebótomos ni reservorios de *Leishmania spp.* Además, tomando en cuenta que un gran número de muestras del Grupo I fueron reactivas frente a antígenos recombinantes en ensayos previos (Cimino et al., 2011; Floridia-Yapur et al., 2014), consideramos que los sueros PTc+ positivos por ELISA-H empleados en esta Tesis, son muestras verdaderamente positivas para *T. cruzi* y negativas para *Leishmania spp.*

Se observó que los sueros con niveles detectables de parásitos por PCR y/o xenodiagnóstico (grupo GII) tuvieron una reactividad diferencial contra el antígeno TcTASV-C. Esta reactividad fue mejorada utilizando una mezcla de este antígeno y de TcTASV-A, lo que permitió detectar la mayoría (94.6%) de los sueros del grupo GII estudiados con máxima exactitud (AUC-ROC=0.99). Resultados previos demostraron que en ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* (linaje TcVI y elevada virulencia), el pico de parasitemia es coincidente con la aparición de anticuerpos IgG anti-TcTASV-C, lo que sugiere que TcTASV-C está en contacto con el sistema inmune del hospedador durante la infección temprana (Bernabó et al., 2013). A pesar del hecho de que estudios similares con TcTASV-A deben llevarse a cabo, la evidencia previa sobre TcTASV-C, junto con los resultados de este trabajo, sugieren que por lo menos TcTASV-C reacciona preferentemente con suero de perros y ratones con infección activa. Similarmente, otros resultados de nuestro grupo están en línea con esta hipótesis (Floridia-Yapur et al., 2014). La mayoría de los sueros del GII (32/37) habían sido previamente evaluados por ELISA contra el antígeno SAPA (*shed acute phase antigen*), resultando todos los sueros positivos ante SAPA también positivos frente a la Mix A+C; más aún, casi el 80% de estos sueros fueron también reactivos frente a TcTASV-C. Cabe destacar, además, que el ELISA-Mix A+C logró detectar un porcentaje mayor de perros infectados con infección activa (94%) que el ELISA con el antígeno SAPA (87%) (Floridia-Yapur et al., 2014), considerado como el marcador de fase aguda por excelencia.

Resultó notable que la baja reactividad ante TcTASV-C en el grupo GI (27.3%) es coincidente con un estudio previo donde se obtuvo alrededor de un 30% de reactividad con TcTASV-C-ELISA en un grupo de humanos con infección crónica (Bernabó et al., 2013). Debido a que TcTASV-C se expresa en la superficie de los tripomastigotes que mayormente circulan en la

sangre durante la fase aguda (Bernabó et al., 2013), los anticuerpos anti-TcTASV-C probablemente persisten durante un corto período de tiempo posterior al fin de esta fase, explicando la baja reactividad de los hospedadores contra este antígeno en la fase indeterminada o crónica. Sin embargo, en el presente estudio, no se puede asegurar que todos estos perros estaban cursando la fase crónica, debido a que la mayoría de estos perros carecían de pruebas de PCR o xenodiagnóstico. Por lo tanto, se necesitarían investigaciones ulteriores para confirmar esta observación. Por otro lado, las diferencias de reactividad observadas entre TcTASV-A y TcTASV-C principalmente en el grupo I, podrían deberse al hecho de que estas proteínas presentan diferentes patrones de expresión: mientras que TcTASV-C se expresa en la superficie de tripomastigotes sanguíneos y se secreta (Bernabó et al., 2013), TcTASV-A tiene una localización intracelular en tripomastigotes y amastigotes. Con respecto a la reactividad anti-TcTASV-A, la menor reactividad de los sueros del GI contra la mezcla –en comparación con la reactividad contra TcTASV-A sola- podría ser explicada por las diferentes cantidades de proteína utilizada en los ensayos (Tabla IV.1).

Sólo el 70% de los perros que fueron positivos por serología convencional, que emplea Homogenado total de parásitos (ELISA-H), reaccionaron con alguna proteína TcTASV por ELISA en este trabajo. Sin embargo, se considera que los perros que reaccionaron con la mezcla antigénica TcTASV A+C podrían tener un nivel de parasitemia superior, como se menciona más arriba. Un estudio reportó una correlación positiva entre la cantidad de parásitos circulantes en la sangre de perros infectados con *T. cruzi* y la capacidad infectiva ante *T. infestans* (es decir, la proporción de insectos no-infectados que adquieren la infección luego de alimentarse una vez de un hospedador infectado) (Enriquez et al., 2014). Además, las poblaciones de perros en áreas endémicas pueden estar agrupadas en clusters de acuerdo a sus niveles de parasitemia, los cuales están altamente correlacionados con el estado nutricional, la inmunocompetencia y/o la condición de salud general, y determinan la capacidad para esparcir parásitos a un vector no infectado que se alimenta de estos hospedadores (Gurtler et al., 2007; Enriquez et al., 2014). De esta forma habría perros que contribuyen desproporcionadamente a la transmisión de *T. cruzi* actuando como “super esparcidos” de la infección (Gürtler & Cardinal, 2015). Por lo tanto, postulamos que los perros reactivos ante los antígenos TcTASV-A y -C podrían representar una fuente mayor de parásitos para un vector no infectado que se alimente de éstos y, por lo tanto, podrían tener un mayor impacto epidemiológico. Por otro lado, se han registrado casos en los que la serología estándar usando extractos de parásitos falló en detectar la infección en perros con parasitología

positiva (Cardinal, Reithinger, et al., 2006). Además, los ELISAs con TcTASV-A, -C y mezcla antigénica, no presentaron reactividad cruzada (100% especificidad) ni con los casos de Leishmaniosis canina ni con perros sanos, lo cual representa una ventaja relevante comparado con la serología convencional a la hora de diagnosticar la infección en áreas de probable co-endemicidad con *Leishmania spp.* La mezcla de antígenos TcTASV evaluada en esta Tesis podría resultar útil en combinación con antígenos reactivos en fases tardías de la infección, de forma de maximizar la sensibilidad del inmunodiagnóstico.

Por otro lado, el análisis de reactividad contra péptidos sintéticos representando epítopes B de la secuencia de TcTASV-C mediante ELISA, reveló que ninguno de los mismos fue reactivo ante el total de los casos de sueros de perros ELISA-TcTASV-C positivos. En total, fueron ocho los sueros de perros con anticuerpos anti-TcTASV-C que no reaccionaron contra ninguno de los péptidos, indicando que debe existir por lo menos un epítope no estudiado en este trabajo que sea el responsable de la reactividad restante de TcTASV-C. Al comparar los resultados del análisis de epítopes lineales de TcTASV-C reconocidos por perros infectados realizado en esta tesis con lo obtenido en humanos infectados (N=63) por Rodríguez et al. (2015), se pueden detectar diferencias en el patrón de péptidos que reconoce uno u otro hospedador. Los sueros de pacientes infectados (46%) reconocen sólo un péptido por fuera del motivo *tasv_c* (péptido P189-207) y los péptidos dentro del motivo *tasv_c* (P46-62; P47-63; P73-89) son reconocidos por un bajo porcentaje de sueros (11.1%, 3.2%, 6.3%, respectivamente). Los perros mientras tanto, reconocen además del P189-207 (un 64% de los sueros estudiados), el péptido P172-188 (46.4%) y P304-319 (14.3%) que se encuentran también fuera del motivo conservado para la subfamilia. El análisis de reactividad contra los distintos péptidos revela, entonces, que cada individuo monta una respuesta humoral diferente contra el antígeno TcTASV-C, lo que podría deberse a múltiples factores tanto relacionados con el hospedador (variabilidad genética entre perros) como con el parásito (linaje o linajes infectantes, posibles reinfecciones, etc). De hecho, gran parte de los perros del GII (10/21) estudiados estaban infectados con el linaje TcVI (determinado por Southern Blot, Monje Rumi *et al.*, 2015) siendo 6 de ellos reactivos ante el péptido P189-207 y/o P172-188. Dos perros con infección mixta TcV/TcVI, también fueron reactivos exclusivamente ante estos dos péptidos.

Por último, en este capítulo experimental se profundizó en la hipótesis de que TcTASV-C es un antígeno marcador de infección activa en perros. Por ello, evaluamos si TcTASV-C podría ser

detectada en el suero de perros infectados a modo de un biomarcador de la infección. Se logró estandarizar un protocolo de Western-Blot para la detección de una banda de peso molecular correspondiente la proteína de interés, y demostramos que la banda detectada no correspondía proteínas típicas del suero. Además, confirmamos estos resultados realizando un ensayo preliminar de inmunocaptura del antígeno a partir de sueros de perros infectados. De los resultados obtenidos, se considera relevante continuar y profundizar con el estudio de la técnica de Western-Blot para la detección de TcTASV-C en suero, que podría derivar luego en la transferencia y potencial detección de la infección mediante un formato de tira reactiva inmunocromatográfica en una plataforma POC aplicable en zonas endémicas. La confirmación de los resultados obtenidos, podrían significar la estandarización de una técnica que podría ser más sensible que el xenodiagnóstico, hemocultivo o PCR, para la detección directa del parásito en sangre.

Discusión General y Conclusiones

La enfermedad de Chagas es considerada como una de las enfermedades tropicales desatendidas con mayor carga en América Latina (Schmunis & Yadon, 2010; WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). Esta afección silenciosa se manifiesta pasados largos años desde la primoinfección, lo que, sumado su íntima relación con la pobreza conlleva a una subestimación de las tasas de personas infectadas. La enfermedad de Chagas debe considerarse hoy en día como un problema de salud a nivel global debido a los fenómenos migratorios de infectados desde regiones endémicas hacia países no endémicos (Schmunis & Yadon, 2010; WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, 2012). No existen aún vacunas para prevenir la infección y los fármacos que se utilizan para tratar la enfermedad tienen una efectividad reducida en la fase crónica de la misma. El diagnóstico apropiado es fundamental no sólo para el correcto y temprano tratamiento en aquellos pacientes en etapa aguda o crónica indeterminada temprana, sino también para el manejo clínico de la sintomatología en pacientes crónicos cardíacos o con síntomas digestivos. Además, el desconocimiento de la infección entre los individuos de una población y la falta de tamizaje apropiado por parte de los sistemas de salud conllevan a graves consecuencias a nivel epidemiológico, tanto en áreas endémicas como no endémicas, incrementando los riesgos de morbilidad en los infectados y de transmisión tanto vectorial, como transfusional, congénita o por trasplante de órganos.

Recientemente, el conocimiento actual del diagnóstico de la infección chagásica ha sido revisado, haciendo hincapié en las limitaciones de las pruebas serológicas convencionales, la necesidad de pruebas que puedan ser aplicadas en áreas endémicas o remotas y la expectativa ante el descubrimiento de nuevos biomarcadores mediante tecnologías “ómicas” (Balouz et al., 2017). Si bien las técnicas convencionales de diagnóstico son precisas en la detección de la mayoría de los casos de infección por *T. cruzi*, siguen existiendo situaciones clínicas/epidemiológicas en las que su desempeño y aplicabilidad se ven disminuidos por problemas metodológicos o biológicos. Se pueden mencionar: dificultades para el diagnóstico temprano de casos congénitos, limitaciones para la evaluación de la eficacia terapéutica, falta de

marcadores que permitan la predicción del progreso de la enfermedad o la tipificación de los linajes infectantes (Balouz et al., 2017). En áreas endémicas, a estos inconvenientes se suma el limitado acceso de los pacientes infectados a laboratorios especializados/centros de salud para el diagnóstico y eventual tratamiento. En este sentido continúa siendo de fundamental interés el desarrollo de técnicas de diagnóstico POC (“Point of Care”), es decir, plataformas para la detección de la infección que sean sensibles y específicas, a la vez que, sencillas, económicas y rápidas para ser aplicadas por personal de salud no especializado y sin necesidad de equipos sofisticados. En el reporte técnico “Prioridades de Investigación para la Enfermedad de Chagas, la Tripanosomiasis Humana Africana y la Leishmaniasis” de expertos de la Organización Mundial de la Salud publicado en 2012, se detalla una lista de vacíos de conocimiento y prioridades de investigación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, que se resumen en la siguiente Tabla:

Tabla IV.1. Vacíos de conocimiento y prioridades de investigación en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas planteados por la Organización Mundial de la Salud (2012).				
Vacío de conocimiento	Prioridad de investigación	Métodos de investigación	Resultados esperados	Justificación
Necesidad de una prueba diagnóstica POC rápida.	Desarrollo de pruebas POC para detección rápida de los casos.	Descubrimiento del biomarcador, validación clínica e incorporación en una plataforma POC.	Una prueba POC altamente sensible y específica para usar en centros de salud y en el campo.	Las pruebas rápidas cromatografías para tamizaje de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> muestran resultados variables en países Latinoamericanos
Falta de una prueba apropiada para evaluar cura.	Desarrollo de una prueba POC para establecer cura.	Descubrimiento del biomarcador, validación clínica e incorporación en una plataforma POC.	Una prueba POC que pueda ser utilizada para determinar la cura de pacientes tratados.	Actualmente no hay prueba que pueda ser utilizada como un marcador confiable de cura.
Falta de una prueba para evaluar resistencia a drogas tripanomicidas.	Desarrollo de una prueba para vigilancia de resistencia.	Desarrollo de marcadores moleculares para resistencia a drogas para evaluar la efectividad de las mismas <i>in-vitro</i> .	Un sistema de pruebas que pueda ser utilizado en laboratorios de referencia en países endémicos.	Falta de una prueba para monitorear la susceptibilidad a drogas de las cepas de <i>T. cruzi</i> en laboratorios de salud pública.
Falta de una herramienta de diagnóstico adecuada para los bebés nacidos de madres infectadas.	Desarrollo de pruebas de análisis de diagnóstico inmediatas POC para neonatos.	Descubrimiento del biomarcador, validación clínica e incorporación en una plataforma POC.	Una prueba POC que puede ser utilizada para el diagnóstico de Chagas en recién nacidos en servicios de salud.	Las pruebas actuales de detección del parásito son difíciles de realizar rutinariamente a gran escala.

En los últimos años se han desarrollado inmunoensayos en plataformas de “nueva generación” con elevada eficacia diagnóstica, como ser: el Multi-cruzi (Granjon et al., 2016), el

Architect Chagas (Iborra-Bendicho et al., 2012), o un ensayo multiplex en formato Luminex (Cooley et al., 2008), que incluyen múltiples antígenos recombinantes, cierto grado de automatización y/o reactivos muy sensibles. Por otro lado, la tecnología de la qPCR con una especificidad del 100%, alto grado de reproducibilidad sumado al componente cuantitativo se convirtió en la técnica de biología molecular preferida para el diagnóstico de la infección chagásica en casos agudos y en pacientes en tratamiento (Duffy et al., 2009, 2013; Alonso-Padilla et al., 2017). Sin embargo, la complejidad de estas técnicas, la necesidad de personal altamente capacitado, y el costo que aquejan, hacen imposible su aplicación en zonas remotas. Recientemente se han desarrollado técnicas de diagnóstico serológico (tipo inmuno-cromatográficas) sencillas, rápidas o semi-rápidas (resultados en 1 hora o 2 o 3 horas, respectivamente) pero su reproducibilidad en áreas de recursos limitados requiere de mayor evaluación (Sánchez-Camargo et al., 2014). En el área de la biología molecular existen también avances prometedores en el desarrollo de pruebas fáciles de utilizar como ser la técnica de amplificación del ADN isotérmica LAMP (*loop-isothermal amplification*; Eiken Co., Japan) que requieren de mayores estudios en su aplicación a la detección de *T. cruzi* (Alonso-Padilla et al., 2017; Besuschio et al., 2017). Por lo tanto, a pesar de los esfuerzos aún no se ha establecido un nuevo *gold standard* para el diagnóstico de la infección chagásica y, consecuentemente, la resolución del diagnóstico mediante la aplicación de dos técnicas serológicas convencionales y cuando fuera necesario una tercera prueba confirmatoria, sigue vigente (World Health Organization, 2007). En el marco de la necesidad del desarrollo de pruebas diagnósticas para contribuir a resolver las limitaciones de las pruebas convencionales y el descubrimiento reciente de la Familia multigénica TcTASV de *T. cruzi*, se planteó la evaluación de las mismas como herramientas para el diagnóstico de la infección en humanos y en reservorios domésticos de modo de evaluar su potencialidad para estudios epidemiológicos.

La familia TcTASV pasó desapercibida durante años hasta su descubrimiento reciente: muchos de sus miembros no estaban anotados, otros lo estaban como otras proteínas (como ser mucinas) y otras, como proteínas hipotéticas (García et al., 2010). Desde entonces nuestro grupo de trabajo se ha centrado en profundizar el estudio de estas proteínas principalmente en lo relativo a su funcionalidad y su potencial utilidad como agentes vacunales y, también, como herramientas diagnósticas. Hemos recabado evidencia sobre los patrones de expresión de las tres subfamilias, pero el acento se ha centrado principalmente en TcTASV-C, que fue identificada inicialmente en un pool de antígenos protectivos vacunales (Tekiel et al., 2009). Demostramos que TcTASV-C se expresa diferencialmente en tripomastigotes de *T. cruzi*, de manera superficial y a

modo de parches sobre la membrana (Bernabó et al., 2013). Por otro lado, si bien TcTASV-C se expresa minoritariamente en la superficie del parásito (Bernabó et al., 2013), comprobamos que se secreta al medio extracelular contenida en vesículas siendo un componente mayoritario de las mismas (Caeiro et al., 2015). La expresión de diferentes genes TcTASV-C ocurriría simultáneamente en el estadio tripomastigote siendo distintos los productos que son secretados, de aquellos que están asociados a membrana (Caeiro *et al.*, 2017, manuscrito en preparación). En línea con estos resultados, recientemente una serie de trabajos reportaron la presencia de péptidos de TcTASV-C en el secretoma de tripomastigotes de *T. cruzi* (Queiroz et al., 2016; Bautista-López et al., 2017; Brossas et al., 2017). Otro estudio reciente confirmó mediante un análisis de transcriptómica que la familia TcTASV está sobre-representada en tripomastigotes versus los demás estadios, siendo algunos de los genes de esta familia los más abundantes entre los ARNm de los tripomastigotes (Li et al., 2016). Por otro lado, la expresión de TcTASV-C parecería ser activada por algún factor presente en el hospedador ya que su presencia en tripomastigotes sanguíneos es 100 veces mayor que en tripomastigotes derivados del cultivo de células (Tekiel et al., 2014). Sumado a esto, se identificaron 10 genes TcTASVs entre otras proteínas que se expresan únicamente en tripomastigotes purificados de sangre en comparación con los metacíclicos y los obtenidos de cultivo (Brunoro et al., 2015). Si bien aún desconocemos la función de los antígenos TcTASV, la información recabada hasta el momento nos permite hacer interesantes asociaciones con los resultados del presente trabajo.

El primer paso para el desarrollo experimental de esta tesis consistió en la obtención de los antígenos TcTASV. Con algunas dificultades, logramos la expresión y pudimos purificar en estado soluble un miembro representativo de cada subfamilia. A continuación, procedimos a la evaluación del desempeño de ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos anti-TcTASV-A, -B y -C en humanos y perros infectados. Ciertas diferencias en la reactividad ante los distintos antígenos fueron evidentes entre los distintos hospedadores analizados. En humanos infectados el ELISA-TcTASV-A obtuvo mejor desempeño diagnóstico, con una sensibilidad del 66% y un AUC ROC de 0.89, que en perros infectados, para quienes se determinó una sensibilidad del 57% y un AUC ROC de 0.8. Por su parte el ELISA-TcTASV-C logró una sensibilidad del 39% y un AUC ROC de 0.83 en humanos; y en perros una sensibilidad del 53% y un AUC ROC de 0.76. La mayor reactividad alcanzada por TcTASV-A, en sueros de pacientes humanos que en perros probablemente esté relacionada a los patrones de expresión de estas subfamilias proteicas considerando que este antígeno se expresa en amastigotes, que son el principal estadio de *T. cruzi* en el hospedador

durante la etapa crónica de la infección. Mientras que en perros, es más frecuente ver niveles más elevados de parasitemia (Lauricella et al., 1986), siendo además más susceptibles a la reinfección por cuestiones eco-epidemiológicas y otros fenómenos biológicos inherentes a la especie (Gürtler et al., 1990, 2009; Castañera et al., 1998; Gurtler et al., 2007; Cardinal et al., 2014), lo que hacen esperable su reactividad diferencial ante proteínas propias del estadio tripomastigote, como lo es TcTASV-C.

Para el caso de perros se analizaron las diferencias de reactividad entre aquellos con evidencia de infección activa (xenodiagnóstico y/o PCR positivos, GII) y aquellos sin evidencia de infección activa (xenodiagnóstico y/o PCR negativos o no determinados, GI). Al desglosar la sensibilidad de acuerdo a estos grupos de perros infectados se observaron diferencias de reactividad interesantes, sobre todo para el caso del ELISA-TcTASV-C. El porcentaje de sueros de perros que reaccionaron contra TcTASV-C fue del 27% para el GI y del 76% para el GII, con un grado de exactitud de discriminación entre infectados de no infectados bajo (AUC ROC 0.59) y alto (AUC ROC 0.91), respectivamente. Mientras que en el caso de TcTASV-A no se observaron diferencias de reactividad tan acentuadas en los perros con infección activa con respecto a los perros del GI: 52% y 62%, respectivamente. A partir de estos resultados sostendríamos, y consecuentemente discutimos en este trabajo, que en los perros con infección activa (parasitemia detectable) que presentan una respuesta humoral ante los antígenos TcTASV, la respuesta de anticuerpos está dirigida mayormente contra TcTASV-C (Floridia-Yapur et al., 2016), que se expresa en la superficie de tripomastigotes y se libera al medio (Bernabó et al., 2013).

Como hemos detallado anteriormente, en general, la sensibilidad de los antígenos utilizados de forma individual fue de baja a moderada. El bajo porcentaje de muestras de ambos hospedadores infectados en las que se detectaron anticuerpos anti-TcTASV-C (39% humanos; 53% perros) podría estar relacionado ya sea con los patrones de expresión de esta subfamilia o con su secreción en vesículas o con particularidades de cada especie de mamíferos. Diferentes genes TcTASV-C se expresarían simultáneamente en el estadio tripomastigote siendo la mayoría de estos productos secretados, mientras que otros pocos permanecerían anclados a membrana, como mencionamos más arriba (Caeiro *et al.*, 2017, manuscrito en preparación). Podría ocurrir que los distintos hospedadores infectados desarrollen respuestas humorales ante distintas moléculas TcTASV-C, y, por lo tanto ante epítopes no representados en el miembro de la subfamilia clonado en este trabajo y utilizado para sensibilizar las placas de ELISA. En línea con esto, los resultados del

análisis de mapeo de epítopes de TcTASV-C en sueros de perros infectados, positivos ante este antígeno, demostraron que cada individuo reacciona ante distintos epítopes; incluso algunos de estos no reaccionaron ante ninguno de los péptidos incluidos. Estos resultados nos permiten demostrar, que deben existir otros epítopes del antígeno no estudiados en este trabajo. Por otro lado, la baja respuesta humoral podría deberse, también, a que la liberación de la mayor parte de las TcTASV-Cs expresadas contenidas en microvesículas sería una estrategia para evadir el sistema inmune (Caeiro *et al.*, 2017, manuscrito en preparación). Esta particularidad biológica ha sido demostrada para otras proteínas como ser la trans-sialidasa (Trocoli Torrecilhas *et al.*, 2009).

Por otro lado, cabe destacar que los ensayos de ELISA con TcTASV-A y TcTASV-C demostraron una elevada especificidad al ser evaluados frente a sueros de individuos sanos o infectados con otras patologías (Leishmaniasis y/o estrongiloidosis), tanto en humanos como en reservorios caninos. Esto es de fundamental importancia en áreas donde la infección por *T. cruzi* co-existe con otras patologías infecciosas tal como es el caso del norte de nuestro país. En este sentido los antígenos recombinantes demuestran superioridad en relación a los extractos crudos del parásito utilizados en serología convencional que ocasionan cruza antigénica con *Leishmania spp.* (Umezawa *et al.*, 2009). Por su parte, el ELISA con el antígeno TcTASV-B tuvo bajo desempeño (baja sensibilidad y especificidad) tanto en humanos como perros con una exactitud para discriminar entre infectados y no infectados similar al azar.

Dado que TcTASV-A y TcTASV-C fueron los antígenos que mejor desempeño diagnóstico demostraron, decidimos evaluar un ensayo de ELISA con una mezcla antigénica de los mismos. Tanto en humanos como en perros, el ELISA-Mix A+C resultó en una sensibilidad y exactitud diagnóstica superior a la obtenida mediante el uso de los antígenos individuales. La sensibilidad fue del 78% y del 70%, en humanos y perros infectados, respectivamente. La exactitud para discriminar entre sanos e infectados elevada (AUC ROC 0.94) en humanos y moderada (AUC ROC 0.89) en caninos. Cabe destacar que para el caso de perros con infección activa, el ELISA Mix-A+C detectó casi la totalidad de las muestras (95%), motivo por el cual planteamos anteriormente su utilidad para la detección de reservorios con infección activa. Como resaltamos, además de su sensibilidad, especificidad y exactitud, la técnica de ELISA empleando estos antígenos resultaría en una alternativa más sencilla y económica, para aplicar en centros no especializados en regiones endémicas, en comparación a la PCR o el xenodiagnóstico.

Si bien para el caso de ambos hospedadores la sensibilidad del ELISA Mix A+C tiene una sensibilidad moderada, existen puntos interesantes a destacar. Por un lado, los antígenos TcTASV-A y TcTASV-C tendrían una potencial utilidad para el monitoreo de pacientes tratados con benznidazol. La disminución de anticuerpos contra la mezcla antigénica fue evaluada en niños tratados de Chaco, observándose un mayor porcentaje de seronegativización e impacto del tratamiento (disminución de niveles de anticuerpos $\geq 30\%$; Santamaría, et al., 2013; Viotti et al., 2011) en el periodo evaluado entre los dos a 5 años de seguimiento mediante esta técnica de ELISA-*in house*, versus los kits comerciales de serología convencional. Los antígenos TcTASV además de ser proteínas no repetitivas, son componentes minoritarios del parásito en relación a otras familias multigénicas de superficie que estimulan una respuesta humoral excesiva de anticuerpos no neutralizantes. Por este motivo, planteamos y sostenemos que los antígenos TcTASV no producirían una activación policlonal de linfocitos B exacerbada con la consecuente hipergammaglobulinemia. La disminución de anticuerpos anti-TcTASV post-tratamiento podría estar relacionada con la eliminación real del parásito y ser un indicador a corto plazo de cura. Por otro lado, un elevado porcentaje de niños infectados (90% y 100%, niños tratados de Chaco y congénitos de Jujuy, respectivamente) fueron reactivos el ELISA-Mix A+C. El mejor desempeño de esta prueba versus la sensibilidad estimada, probablemente esté relacionado con que estos pacientes cursan una fase crónica temprana de la infección, de manera similar a lo que ocurre en reservorios caninos infectados.

En trabajos anteriores se ha demostrado que el uso de péptidos sintéticos que incluyen las regiones antigénicas de las proteínas, e incluso moléculas quiméricas, resultaron en un mejor desempeño para la detección de la infección chagásica mediante inmunoensayos, en comparación con las moléculas completas (Aguirre et al., 2006; Camussone et al., 2009). El mapeo de epítopes B lineales de TcTASV-C en humanos fue desarrollado en el marco de una tesina de grado de nuestro grupo de trabajo (Rodríguez, 2017). Los epítopes lineales de TcTASV-C reconocidos por sueros de humanos fueron diferentes de los reconocidos por perros. A su vez en ambos casos, se observaron péptidos que concentran la mayor parte de la reactividad, aunque no explican el total de la misma, por lo que habrían otros epítopes contra TcTASV-C que no hemos estudiado. El análisis similar de TcTASV-A es un tema pendiente. La identificación de los epítopes reactivos de ambas proteínas (y de TcTASV-W, inclusive) permitiría combinar en un único ensayo o en una única molécula quimérica los epítopes contra TcTASV, mejorando el desempeño del ELISA para la detección de anticuerpos anti-TcTASV.

Por otro lado, dada la evidencia de que TcTASV-C se libera al medio en vesículas y la observada reactividad diferencial de este antígeno en perros infectados con infección activa propusimos la evaluación de este antígeno como un biomarcador serológico de la presencia de los tripomastigotes en sangre. Por lo cual, en este trabajo estandarizamos la técnica de Western Blot para la detección del antígeno TcTASV-C en suero de perros infectados. No sólo logramos detectar específicamente este antígeno en el suero de perros infectados, sino que también logramos capturar mediante una columna de afinidad este antígeno a partir de un pool de sueros de estos perros. Si bien estos resultados son preliminares, este trabajo representa un puntapié inicial para la profundización en el estudio de TcTASV-C como marcador directo de la presencia del parásito o de las vesículas que este libera. El Western-Blot es una técnica compleja que no podría aplicarse en centros no especializados. Sin embargo, con la profundización de los resultados encontrados aquí se podría aspirar a la optimización de una prueba inmunocromatográfica rápida para detección TcTASV-C en sueros de perros o humanos ideal para su aplicación en áreas remotas, de modo similar a las que pruebas ya se encuentran en el mercado para el diagnóstico de diferentes infecciones virales, como ser HIV y hepatitis (Keating et al., 2016; Kosack & Nick, 2016).

De lo discutido en los párrafos anteriores podemos resaltar una serie de conclusiones relevantes:

-El ELISA utilizando los antígenos TcTASV-A y TcTASV-C de forma individual, obtuvo una sensibilidad de baja a moderada con una máxima especificidad, en ambos reservorios estudiados. TcTASV-B, por su parte, no es aplicable en técnicas de inmunodiagnóstico de la infección, debido a su bajo desempeño.

-La técnica de inmunodiagnóstico estandarizada con la mezcla antigénica TcTASV-A + TcTASV-C para la detección de *T. cruzi* tanto en humanos como perros, no alcanzó la sensibilidad del ELISA convencional con extracto crudo del parásito. Sin embargo, la combinación antigénica TcTASV-A + TcTASV-C podría ser útil para determinados propósitos:

-Por un lado, el uso del ELISA-Mix A+C en estudios de screening podría ayudar a detectar hospedadores caninos con infección activa. Por lo tanto, permitiría detectar aquellos perros con alto impacto en el riesgo de transmisión a humanos, siendo una técnica específica, simple y económica para ser aplicada en áreas endémicas, donde la presencia de estos reservorios y las condiciones socio-culturales lo justifican.

-Por otro lado, la detección de anticuerpos anti-TcTASV-A+C mediante esta técnica podría ser una herramienta útil para la determinación temprana de efectividad del

tratamiento tripanomicida, teniendo en cuenta como panorama actual la inexistencia de un biomarcador apropiado para la determinación de cura.

- A través de este estudio también pudimos obtener evidencia sobre la expresión de estas proteínas recientemente descubiertas durante el curso natural de la infección por *T. cruzi* en los distintos hospedadores del ciclo doméstico. Mayores estudios se necesitan para elucidar el rol de las proteínas TcTASV en la biología de *T. cruzi* y su interacción con los hospedadores mamíferos.

Perspectivas Futuras

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis, planteamos que sería interesante la profundización en las siguientes líneas de investigación:

-Mapeo fino de epítopes lineares B de la secuencia de TcTASV-A, de modo de identificar las regiones reactivas de la secuencia, tanto en humanos como en perros. A partir de la producción de estos péptidos de TcTASV-A, podría evaluarse su combinación con péptidos de TcTASV-C e inclusive péptidos reactivos de otras antígenos bien caracterizados, de modo de optimizar el desempeño diagnóstico en ambos hospedadores.

-Profundización en el estudio de TcTASV-C como biomarcador de la infección. Por un lado, consideramos que los resultados de este trabajo sobre la detección de este antígeno en sueros de perros infectados naturalmente deberían ser ampliados evaluándose la posibilidad, a futuro, del desarrollo de una prueba inmunocromatográfica rápida para la detección de la infección en reservorios de áreas endémicas. Por otro lado, consideramos de especial interés y relevancia aplicar el enfoque y estrategia de detección de TcTASV-C en suero mediante Western-Blot, para la detección de la infección en pacientes humanos. Más específicamente, TcTASV-C podría resultar en un biomarcador temprano para la detección de *T. cruzi* en pacientes congénitos, a la vez que podría ser utilizado para la evaluación de la efectividad del tratamiento etiológico de la infección.

-Profundización en la evaluación de ELISA-Mix A+C como técnica de seguimiento serológico post-tratamiento en un estudio diseñado con controles no tratados.

-Profundizar en el estudio de la detección de la infección por *T. cruzi* tanto en humanos como perros, evaluando en los ensayos de ELISA combinaciones de los antígenos TcTASV-A y TcTASV-C con otros antígenos conocidos que podrían aportar a incrementar la sensibilidad diagnóstica.

Materiales y Métodos

Capítulo I

MyM.I.1.i. Cepas bacterianas y medios de cultivo

En el proceso de clonado y expresión de las proteínas TcTASV se utilizaron las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

- MAX Efficiency® DH5αF'IQ™ (Thermo Fisher Scientific): DH5α™ es la cepa de *E. coli* más frecuentemente utilizada en aplicaciones de clonado con una elevada eficiencia de transformación. Estas bacterias contienen una mutante del gen lacZ (lacZΔM15) que codifica para un monómero incompleto de la B-galactosidasa que permite el cribaje y selección de clones azules/blancos recombinantes por complementación-α en las bacterias que hayan incorporado plásmidos conteniendo el gen complementario lacZ' para la B-galactosidasa funcional. Además, llevan mutaciones recA1 y endA1 que aumentan la estabilidad del inserto y mejoran la calidad de los plásmidos obtenidos por minipreps.
- DH10B: Las bacterias de esta cepa también presentan alta eficiencia de transformación y el gen lacZΔM15 para el cribaje de color azul/blanco de clones recombinantes por complementación-α. Además presentan la mutación A1 para aumentar el rendimiento y la cantidad de plásmidos obtenidos por minipreparaciones.
- BL21-CodonPlus® (Stratagene, EEUU): esta cepa está modificada con el fin de contener copias extras de genes que codifican para los ARNts que frecuentemente limitan la traducción de proteínas heterólogas en *E. coli*. La disponibilidad de los ARNts permite altos niveles de expresión de muchos genes recombinantes heterólogos en células BL21-CodonPlus que se expresan pobremente en cepas BL21 convencionales (BL21-CodonPlus® Competent Cell, Stratagene, Manual de Instrucciones).

Para crecer las bacterias se utilizó principalmente medio líquido Luria Bertani (LB) y, en algunos casos, medio líquido Terrific Broth (TB). Para la selección de colonias de bacterias transformadas se utilizaron placas de Petri con LB agar suplementado con antibiótico (ampicilina y/o cloranfenicol), IPTG y/o XGAL, dependiendo de la cepa bacteriana a seleccionar. En todos los

casos los cultivos se incubaron a 37°C y en el caso de cultivos en medio líquido se incubó con agitación a 150 rpm.

MyM.I.1.ii. Plásmidos:

A continuación se describen los vectores comerciales utilizados en el proceso de clonado y expresión soluble de las TcTASV:

- pGEM-Teasy (Promega, EEUU): este es un vector linealizado que permite subclonar productos de PCR de forma sencilla generando un alto número de copias. Contiene los promotores T7 y SP6 y un gen de resistencia a ampicilina. El sitio de inserción contiene dos extremos T libres que permiten el clonado de productos de PCR con extremos A. La unión del inserto inactiva la expresión de la enzima B-galactosidasa. Esto permite la selección de colonias de blancas transformadas con los plásmidos con los insertos de interés que se distinguen, en las placas indicadoras, de aquellas colonias azules con plásmido sin inserto en los que la B-galactosidasa se expresa en forma activa. Los múltiples sitios de restricción que flanquean el sitio de inserción permiten la obtención posterior del inserto mediante digestión (EcoRI, BstZI y NotI) con una sola enzima o mediante doble digestión.
- pGEX (GE Healthcare, EEUU): es un vector de expresión basado en el operón *lac*. El sitio de inserción tiene múltiples sitios de restricción. La expresión de la proteína se produce unida a la proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST) que facilita la purificación del producto de interés mediante columnas de afinidad a glutatión. Hay múltiples variantes.
- pG-KJE8 (TAKARA BIO Inc., Japón): este plásmido contiene en su secuencia dos equipos de chaperonas: dnaK-dnaJ-grpE y groES-groEL, ligados a los promotores araB y Pzt-1, respectivamente. Estos equipos de chaperonas pueden co-expresarse con la proteína de interés mediante la inducción del plásmido con L-arabinosa y tetraciclina. La coexpresión de estas proteínas facilitaría el correcto plegado de la proteína objetivo. Este vector incluye, además, un gen de resistencia a cloranfenicol.
- pG-Tf2 (TAKARA BIO Inc., Japón): este vector es similar al anterior pero sólo contiene información para la expresión de las chaperonas groEL-groES. La transcripción de estas proteínas es inducida por la acción de L-arabinosa ligada al promotor araB del plásmido. También presenta un gen de resistencia a cloranfenicol que permite la selección de las bacterias transformadas.

*MyM.I.1.iii. Obtención y Clonado del ADN codificante de TcTASV-A y TcTASV-B.***Secuencias:**

A continuación se muestran en verde y subrayado las secuencias de aminoácidos clonadas para cada proteína. Se muestra también la secuencia de la proteína de la subfamilia TcTASV-C que fue clonada anteriormente en nuestro laboratorio y que fue producida a partir de esos clones en este trabajo.

TcTASV-A (Número de acceso GenBank: *CBI68031.1*, subclonados para expresión aa 37 al 173, 138 aminoácidos)

MLMVTVRRRCVACDLLVLALLCCCLSVCRATASEVNSTIAPAKPLADVVFPCPGTDGKLRWRLPGEKDWRKC
ARRPEEAEVNGYCARLCNFAGDIYKEPEITRLCNSASNKNFVAFHMSFEKHEDLKTCSLVEAPEDSSQSSAS
SGDTTTVWVRTPLLPVLTALVCAAV

TcTASV-B (Número de acceso TriTrypDB: *TcCLB.511877.10*, subclonados para expresión aa 35 al 224, 191 aminoácidos)

MMMMVTVRRRVCSQLLALLCCCLSVCGTAVPAKTLMDVHVSCSRTDGKLIWRLPGETGWRKCANKPA
EGGGGEDECALVCIAGVYKDAENGLCAPGGRPSVWVTSIGIFLSENIKNCSSAAAPTAAVVGQAQSGVG
SPPGEEAETPHKKSPEHTDEGGSYPKLSENFVAVSLTSTDTNEHVASAPEASSQTPSSPSGDNAAQETSHNNN
EGNSQADVNGGGTATGMRDPGGADSSDAAILWVRTPLLLLLFTALICAAVR

TcTASV-C (Número de acceso TriTrypDB: *Tcruzi_1863-4-1211-93*; subclonados para expresión aa 65 al 330, 267 aminoácidos)

MMMMVTVRRRVCELLLALLCCCLSVCGTDLPAKSLVIVHFSCPGTDGKLSWRLQGEEWKKCP
KKPEEVDQDSDERARLCVAGGDFEYGGVKRTRRLFCPPSDQVEFLFAIKFATYGDLRNSSSAMAINNDREA
TDGAQLQSQPQTGTAAPAAMAAASTKAVVDQAQSGVGSREAAEAPQKSPDHTAEDGSAPSSSENIA
ASPLTSAEGAVQSRQRDDGSVVDERVQRKGESPGNVQDASPLGGVANEHVASAPEASGRPSSPSGDGAA
NETSHSSNEGDSRSDASGEGNSTVTGTNPLRPTRDESANESTEDIAALLQNFVLDGSDVTTVWVRTPLLLVI
 ALVCAAVR

Cebadores:

TcTASV-A: Los cebadores utilizados para el clonado de TcTASV-A fueron diseñados para amplificar la secuencia interna del gen Genbank AM492202, a partir del clon del laboratorio RQ-ME-EV-3 (TcTASV-A7), y se especifican a continuación:

Cebador Sentido (Fw_7893-bamHI-2011): GGATCCACCATTGCGCCGGCAAAA

Cebador Antisentido (7893.low_Hind): AAGCTTGACAGCAGCACAGACAAG

Cabe aclarar que el sitio HindIII del cebador antisentido no es el que se utilizó para reclonar luego el inserto en pGEX. Se disponía en el laboratorio de este cebador al momento de clonar TcTASV-A. Por lo que, para cortar el inserto luego, se utilizó el sitio EcoRI proporcionado por el vector de pGEM-Teasy.

TcTASV-B: Los cebadores que se diseñaron para clonar la secuencia de TcTASV-B desde el aminoácido 35 hasta el 223 del clon T2-5 (clon en pGEM-Teasy que corresponde al gen Tc00.1047053511877.1) para obtener un producto de PCR de 571 pb, con sitios de restricción para BamHI y EcoRI.

Cebador Sentido (T2_5_intL_Bam): GGATCCCCGGCAAAAACCTTATG

Cebador Antisentido (T2_5_intr_Eco): GAATTCGACGTCGGCTTGGCTGTT

La correcta amplificación se chequeó en geles de agarosa (detalles en sección MyM.I.5) y los insertos fueron purificados a partir de los mismos utilizando un kit de extracción comercial a partir de gel (QIAquick, QIAGEN) (detalles en sección MyM.I.9).

Amplificación de las secuencias por PCR:

Las reacciones de PCR para amplificar las secuencias génicas de las TcTASV a clonar se realizaron según las condiciones especificadas en las Tablas MyM.1 y MyM.2. Se utilizó la enzima ADN polimerasa Pfu (Fermentas), que tiene actividad correctora exonucleasa 3' → 5', y cebadores específicos (detallados más abajo) para la de región de interés cada uno con un sitio de restricción (EcoRI o BamHI) en su extremo 5' para la posterior digestión del inserto.

Reactivo	Volumen (μ l) (Vf=50 μ L)	Concentración final
Buffer Pfu 10X 20 mM MgSO ₄	5	1X
dNTPs [2mM]	1	0.2mM
Cebador Sentido [10 μ M]	2	0.4 μ M
Cebador Antisentido [10 μ M]	2	0.4 μ M
Pfu [2.5 U/ μ L]	0.625	1.6 U
H ₂ O	35.4	-
Templado de ADN	4	-

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración
1	95°C	3 minutos
35	94°C	30 segundos
	56°C	30 segundos
	72°C	80 segundos
1	72°C	10 minutos

Procedimientos de ADN recombinante

MyM.I.2. Tailing y Ligación de los productos de PCR en plásmidos pGEM-Teasy

El vector pGEM-Teasy (Promega, EEUU) se utilizó para clonar los productos de PCR. En sus extremos posee T libres que permiten el clonado de productos de PCR que contengan A en sus extremos. Como se mencionó, la introducción del inserto de interés inactiva la expresión de la enzima lo que permite la diferenciación de colonias transformadas con el plásmido conteniendo el inserto (blancas) de las colonias transformadas con plásmidos sin inserto (azules) en placas indicadoras de LB agar suplementadas con X-gal, ampicilina e IPTG.

El agregado de extremos A (A tailing) a los amplicones de los genes TcTASV obtenidos previamente, se realizó agregando a los productos de PCR 1U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) e incubando durante 10 minutos a 72°C. La ligación de los insertos con pGEM-Teasy (relación molar

de inserto: vector 3:1) mediado por la T4 ADN ligasa, se realizó según las instrucciones especificadas en el kit del vector (Technical Manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega Corporation 2010). Las reacciones de ligación se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.

MyM.I.3. Transformación de bacterias E. coli competentes por shock térmico

A continuación, se transformaron bacterias DH5 α competentes con las reacciones de ligación. Trabajando permanentemente en esterilidad (mechero), se incubaron 50 μ L de bacterias competentes con 2 μ L cada reacción de ligación durante 20 minutos en hielo. Luego se realizó un shock térmico a 42°C en baño María durante 45-50 segundos. Inmediatamente, se colocó en hielo durante 2 minutos. Se agregaron 950 μ L de medio LB y se incubó 1.5 hs a 37°C con agitación (150 rpm). Se sembraron 100 μ L de cada transformación por duplicado en placas de LB agar suplementado con el antibiótico de selección correspondiente. Para el caso de las bacterias transformadas con pGEM-Teasy las placas se prepararon con ampicilina, IPTG [0,5 mM] y X-Gal [80 μ g/mL]. Las placas fueron incubadas a 37°C overnight. Todas las transformaciones de bacterias realizadas en los pasos siguientes se llevaron a cabo utilizando el mismo protocolo de shock térmico.

La correcta transformación de las bacterias fue corroborada mediante PCR colony con (a) cebadores que anidan en los sitios promotores T7 y SP6 del plásmido y (b) cebadores específicos para amplificar el inserto. Además, se realizó una extracción de plásmidos (mini-preparaciones) a partir de cultivos (3mL de LB ampicilina) de las colonias seleccionadas y se llevó a cabo la digestión con las enzimas de restricción que flanqueaban el inserto. El tamaño del inserto obtenido tanto por PCR como por digestión de los plásmidos fue corroborado mediante geles de agarosa. Por último, se realizó secuenciación de las mini-preparaciones para asegurar la correcta inserción y secuencia de los genes TcTASV.

MyM.I.4. PCR colony

Cada muestra de templado de ADN para la PCR colony se preparó picando con un tip al azar una colonia desarrollada sobre las placas de LB agar/antibiótico de selección. Cada muestra se depositó en un tubo con 30 μ L de agua miliQ. Se hirvieron los tubos con las bacterias en Baño María, durante 5 minutos. Luego, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos

quedando el ADN en el sobrenadante. La Mix se preparó según se muestra en la Tabla MyM.3 y se utilizaron las condiciones de ciclado especificadas en la Tabla MyM.4.

Reactivo	Volumen (μ l) (Vf=25 μ l)	Concentración final
Buffer 10X	2.5	1X
dNTPs [10mM]	0.5	0.2Mm
Cebador Sentido [10 μ M]	1	0.4 μ M
Cebador Antisentido [10 μ M]	1	0.4 μ M
MgCl ₂ [50mM]	0.75	1.5Mm
Taq	0.25	
H ₂ O	12	-
Templado de ADN	7	-

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración
1	94°C	5 minutos
35	94°C	30 segundos
	52°C	30 segundos
	72°C	60 segundos
1	72°C	10 minutos

MyM.I.5. Electroforesis en gel de agarosa

Para la evaluación de los productos de ADN obtenidos en las reacciones de PCR se sembraron las muestras en geles de agarosa. Los geles de agarosa 1 - 1.5% fueron preparados en 25mL de buffer TBE 1X (90mM Tris, 90mM Ácido bórico, 2.5 mM EDTA, pH 8.3), adicionándose 1.5 μ L de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μ g/mL. Las corridas electroforéticas se realizaron en el mismo buffer a 100-120V durante 40-50 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño escalonado (Ladder 100 bp, Promega®, EE.UU.). Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

MyM.I.6. Mini (o midi) preparaciones de ADN plasmídico

Se desarrollaron las bacterias transformadas con los plásmidos de interés en cultivos de 3 mL (mini-preparaciones) o 25 mL (midi-preparaciones) de medio LB ampicilina a 37 °C con agitación durante toda la noche. Se centrifugaron los cultivos a 6000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente (mini-preparaciones) o 15 minutos a 4°C (midi-preparaciones). Se purificó el ADN plasmídico utilizando los reactivos provistos en el QIAGEN Plasmid Mini Kit o QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN Inc.), según las instrucciones del fabricante (QIAGEN® Plasmid Purification Handbook, 2012). En el caso de las mini-preparaciones obtenidas a partir de bacterias transformadas con pGEM-Teasy ligado con los insertos TcTASV que serían enviadas para su chequeo por secuenciación, el protocolo especificado QIAGEN Plasmid Mini Kit se llevó a cabo por completo agregando al ADN plasmídico obtenido, luego de la purificación, NaCl 4M y PEG8000 13% para obtener una preparación más limpia; caso contrario, los plásmidos fueron resuspendidos en agua miliQ luego de su precipitación con isopropanol. La concentración de plásmidos obtenida se determinó mediante el equipo Picodrop y/o corridas en geles de agarosa 0.8%.

En algunos casos, a partir de las minipreparaciones se realizaron también chequeos mediante PCR con cebadores que flanqueaban el inserto y/o mediante digestiones con enzimas de restricción para comprobar que el tamaño del inserto sea adecuado.

MyM.I.7. Secuenciación de mini-preparaciones de plásmidos

Las mini-preparaciones de pGEM-Teasy-TcTASV fueron secuenciadas para asegurar que las secuencias de los insertos clonados sean correctas antes de continuar con los pasos siguientes de subclonado y producción de las proteínas heterólogas. Las muestras para secuenciación se prepararon con 400 ng de plásmido y 5 pmoles de cebadores en volumen final de 10 µL. Se utilizó el servicio de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH) el cual cuenta con el secuenciador ABI3130 (Applied Biosystems). Los cebadores empleados fueron: T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) y SP6 (ATTTAGGTGACACTATAG).

MyM.I.8. Digestión del ADN plasmídico

Las digestiones enzimáticas para obtención de los insertos de interés de los plásmidos se realizaron con las enzimas BamHI y EcoRI (NEB, Reino Unido). Los plásmidos, junto con las enzimas de restricción y buffer correspondiente, se incubaron durante dos horas a 37°C en las concentraciones indicadas por el fabricante (Sambrook & Russell, 2001).

Los productos de la reacción se corrieron en geles de agarosa 1-1,5% con buffer TBE (1X) para verificar la correcta digestión del inserto por comparación con marcadores de peso molecular adecuados. Luego, se procedió a la purificación de los fragmentos de interés.

MyM.I.9. Purificación de los productos de digestión a partir de geles de agarosa

Los insertos digeridos fueron purificados a partir de los geles de agarosa utilizando alguno de los kits disponibles en el laboratorio, QIAquick gel extraction kit o QIAEX II (QIAGEN, EEUU). Para ello, se cortó la porción del gel que contenía la banda de interés y se procedió con la purificación según las instrucciones especificadas por el fabricante (QIAquick Spin Handbook o QIAEX II Handbook, respectivamente).

MyM.I.10. Ligación de los insertos de interés en plásmidos de expresión pGEX y transformación de BL21 codon plus

Una vez corroborada la correcta ligación de los insertos de interés en pGEM-Teasy y su secuencia, se desarrollaron cultivos de mayor volumen a los fines de obtener gran cantidad de copias de los insertos para su posterior subclonado en plásmidos de expresión. Se picaron colonias y se desarrollaron en 20 mL de LB ampicilina a 37°C y 150 rpm durante toda la noche. Se purificaron los plásmidos mediante midi-preparaciones (según sección MyM.I.6). A continuación, se realizó una digestión secuencial en Buffer Tango 10X (Thermo Scientific, EEUU) con BamHI seguido de EcoRI. Las digestiones con ambas enzimas se incubaron a 37°C durante dos horas. La correcta digestión del inserto se chequeó en geles de agarosa. El inserto fue purificado a partir de un gel utilizando el kit QIAEX II (QIAGEN).

La ligación de los insertos en plásmido pGEX-1λT linearizado se llevó a cabo utilizando la Ligasa T4 (Thermo Scientific, EEUU). Para ello se realizaron las siguientes reacciones: ligación del

inserto de interés en relación molar de inserto-vector 10:1 y en relación molar 3:1; control de ligación sin inserto; control de ligación sin inserto y sin ligasa; control positivo y control negativo. Las reacciones de ligación se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, se utilizaron las ligaciones para transformar bacterias DH5 α competentes (según protocolo especificado en sección MyM.I.3). La transformación con plásmidos conteniendo el inserto adecuado (tamaño y orientación) se verificó por PCR colony utilizando un cebador que anida en el plásmido y uno que anida en el inserto. Se desarrollaron cultivos de las colonias positivas en 4 mL de LB ampicilina. A partir de esos cultivos, por un lado, se prepararon gliceroles de DH5 α transformadas para su conservación a -80°C y, por el otro, se extrajeron los plásmidos pGEX-1 λ T-TcTASV mediante mini-preparaciones.

Finalmente, se transformaron bacterias (BL21-CodonPlus® o DH10B con plásmidos portadores de genes para chaperonas) competentes específicas para la producción de proteínas heterólogas con los plásmidos pGEX-1 λ T-TcTASV-A o pGEX-1 λ T-TcTASV-B. La transformación se llevó a cabo por el protocolo de shock térmico especificado en la sección MyM.I.3. También se prepararon gliceroles para la conservación de estas bacterias transformadas a -80°C.

Expresión y purificación de las proteínas TcTASV-A, TcTASV-B y TcTASV-C y GST

MyM.I.11. Inducción de la expresión de las proteínas heterólogas

Se desarrollaron cultivos de las bacterias BL21-CodonPlus® o DH10B transformadas con los plásmidos pGEX-1 λ T-TcTASV-A, pGEX-1 λ T-TcTASV-B, pGEX-3X-TcTASV-C o pGEX-3X-GST overnight en medio TB o LB según el caso, suplementados con los antibióticos correspondientes: ampicilina y/o cloranfenicol (ver Tabla MyM.5 para un resumen de las condiciones de desarrollo e inducción). Se realizó una dilución 1/20 a partir de los cultivos overnight de bacterias. Se incubó a 37°C en agitación hasta que la DO a 600 nm fuera \sim 0.6 (aproximadamente 1.5 h de desarrollo). Se conservó una alícuota de 1mL de cultivo sin inducir. A continuación, se indujo el cultivo con 0.1 mM IPTG durante 3.5 a 4 hs a 37°C con agitación. Se conservó una alícuota de bacterias inducidas y el resto del cultivo fue centrifugado durante 10 minutos a 6000 rpm 4°C y se descartó el sobrenadante. Previo a la lisis del pellet, las fracciones inducida y no inducida se compararon mediante SDS-PAGE, a fines de evidenciar la correcta expresión de la proteína de interés.

Posteriormente, se resuspendió el pellet en PBS suplementado con lisozima (1mg/mL), DNAsa (10µg/mL), MgCl₂ (10mM) e inhibidores de proteasas (Cømplete, Roche) y se incubó 1.5 hs en hielo. A los fines de aumentar el pegado del tag de GST a la columna se agregó DTT 1mM al lisado. Se realizaron 3 ciclos de sonicación de 30 segundos cada uno, más un ciclo final 1 minuto, en potencia 6 modo continuo (Sonifier 450, Brandson). Luego, se centrifugó el lisado a 11000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se ultracentrifugó a 40000rpm por 40 minutos a 4°C. El lisado se pasó por un filtro de 0.2µm para eliminar restos de impurezas y se agregó Triton X100 para una concentración final 1%.

Pruebas de solubilidad

Esta prueba se realizó a partir de la inducción de pequeños volúmenes (~3mL) de cultivo de bacterias transformadas con el plásmido pGEX-1λT conteniendo los insertos de TcTASV-A y TcTASV-B. La prueba consistió en comparar, mediante SDS-PAGE, las fracciones pellet y sobrenadante resultantes de la lisis de las bacterias inducidas a fines de determinar la solubilidad de la proteína sobre expresada. Si la banda correspondiente al antígeno se evidenció mayormente en el sobrenadante, se procedió a la inducción de grandes volúmenes de cultivo (500 mL) para la posterior purificación de las proteínas recombinantes.

Para TcTASV-C_{GST} (y GST) no fue necesaria la realización de esta prueba ya que el protocolo para la obtención de la proteína soluble ya había sido estandarizado previamente en el laboratorio.

Estrategia alternativa para expresión soluble de proteínas

Particularmente, en el caso de TcTASV-A_{GST} la proteína precipitó en cuerpos de inclusión que se depositaron en el pellet tras la inducción de las bacterias transformadas con pGEX-1λt-TcTASV-A (ver resultados en sección I.2). Para superar esta dificultad, se evaluaron en primer lugar, y sin resultados positivos (sección I.2), diferentes combinaciones de tiempo-temperatura de inducción: 18°C overnight, 28°C durante 8hs y 37°C durante 4hs. Por otra parte, se evaluó la posibilidad de expresar TcTASV-A_{GST} soluble mediante una estrategia que aprovecha las cualidades de las chaperonas moleculares y chaperoninas. Las chaperonas moleculares son proteínas que se

unen a las proteínas desplegadas o parcialmente plegadas, a medida que éstas son sintetizadas en los ribosomas, y las estabilizan evitando así que estas se agrupen y sean degradadas (Lodish et al., 2005). Por otro lado, las chaperoninas forman grandes ensamblajes moleculares a modo de barril en el cual se insertan las proteínas recientemente sintetizadas parcialmente plegadas o mal plegadas y, tras plegarse en su conformación nativa, son liberadas al medio nuevamente (Lodish et al., 2005). Se utilizaron dos cepas de bacterias competentes DH10B transformadas con los plásmidos pG-KJE8 y pG-Tf2 cedidas gentilmente por los Dres. J.J. Cazzulo y V. E. Alvarez, del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-(IIB-INTECH)-UNSaM-CONICET. El plásmido pG-KJE8 porta los insertos para la expresión de las chaperonas dnaK-dnaJ-grpE y chaperoninas groES-groEL bacterianas; mientras que pG-Tf2, porta los insertos para las chaperoninas groES-groEL-tig. Las cepas de bacterias competentes mencionadas se transformaron entonces con el plásmido pGEX-1AT-TcTASV-A y se desarrollaron. La inducción de las chaperonas se realizó con tetraciclina y/o L-arabinosa previo a la inducción de la proteína de interés con IPTG. A continuación, se llevó a cabo lisis de las bacterias y prueba de solubilidad según lo especificado anteriormente.

MyM.I.12. Purificación de las proteínas recombinantes

Para la purificación de las proteínas TcTASV y GST, el lisado con Triton 1% se pasó por columnas de glutatión-sefarosa (GE Healthcare) a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con PBS-Tritón 1% y la elución de las proteínas se realizó con L-glutatión reducido 5 mM en buffer Tris 50 mM (pH=8). Se recolectó el eluido de la columna en fracciones de 1mL.

MyM.I.13. Análisis de proteínas

MyM.I.13.i. Electroforesis en geles SDS-PAGE

La electroforesis se llevó a cabo mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE desnaturalizantes 7-12%. Una vez polimerizados se los llevó a una cuba electroforética con buffer de corrida 1X (25mM Tris, 0,1% SDS, 250mM glicina) y se sembraron las muestras previamente tratadas con buffer de crackeo (SDS 4%, 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 200 mM DTT, 0.01 % azul bromofenol). La corrida se realizó a 170 V a temperatura ambiente en cubas de corrida vertical Mini Protean (BioRad). Los geles se tñieron con azul de brillante de Coomassie R-250 al

0.25%, y luego fueron desteñidos con agua destilada para su posterior análisis y fotografiado. Alternativamente, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa y procesados por Western-Blot.

MyM.I.13.ii. Western-Blot

Luego de la corrida electroforética, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™- ECL, GE Healthcare) durante 1 hora en frío a 100V (cuba MiniProtean II, BioRad) utilizando buffer de transferencia (Tris HCl 0.025M (Sigma), 14,4 g Glicina (BioRad), 200 mL de Metanol (Sintorgan) y 800 mL de agua desionizada, pH 8,5). La correcta transferencia se verificó por medio de la tinción reversible de la membrana con una solución de Rojo Ponceau (5% p/v) en ácido acético 1% (v/v). Se bloqueó la membrana con PBS-Leche 3% durante 1 hora y luego se lavó con buffer de lavado (PBS-Tween 0,05%). Se incubó de 1 a 2 horas con el anticuerpo primario diluído en PBS-Tween 0.05%-Leche 1% en la concentración correspondiente. Se repitió el lavado, y se agregó anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific) durante 1 hora. Luego de lavar, se agregó el reactivo quimioluminiscente (SuperSignal West Pico, Thermo Scientific; SuperSignal West Femto, Thermo Scientific), y las señales en las membranas fueron reveladas por exposición de placas radiográficas (AFGA) en cuarto oscuro.

MyM.I.13.iii. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el Método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se realizó una curva de calibración con una solución estándar de albúmina de suero bovino 0.5 mg/mL (0 µg; 2.5 µg; 5 µg; 7.5 µg; 10 µg). A cada tubo se le agregó 200µL de reactivo de Bradford (BioRad). Se cuantificaron los eluídos de los antígenos TcTASV, agregándole 200 µL de reactivo de Bradford a 10 µL de cada eluído. Luego, de 5 minutos de reacción se midió la absorbancia a 595 nm en cada pocillo mediante un lector de placas. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Además, cada eluído fue cuantificado mediante Picodrop para el chequeo de las estimaciones.

En la Tabla MyM.5, a continuación, se resumen las condiciones de expresión para las proteínas de cada subfamilia TcTASV y para GST:

Tabla MyM.5. Resumen de condiciones de desarrollo e inducción para expresión de los antígenos TcTASV							
Producto de expresión	Cepa bacteriana	Plásmido	Inserto	Medio de desarrollo	Antibiótico de selección	Inductor	Peso Molecular del producto de expresión
TcTASV-A _{GST}	DH10B	pGTF2	Chaperonas GroEL-GroES-tig	Terrific Broth (SIGMA)	Cm 20µg/mL Amp 50µg/mL	Tetraciclina	-
		pGEX-1λT	TcTASV-A08 (136aa)			IPTG 0.1mM	37KDa
TcTASV-B _{GST}	BL21-codon plus	pGEX-1λT	TcTASV-B (189aa)	Terrific Broth (SIGMA)	Cm 35µg/mL y Amp 50µg/mL	IPTG 0.1mM	56KDa
TcTASV-C _{GST}	BL21	pGEX-3X	TcTASV-C (265aa)	LB (SIGMA)	Amp 50µg/mL	IPTG 0.1mM	65KDa
GST	BL21	pGEX-3X	GST	LB (SIGMA)	Amp 50µg/mL	IPTG 0.1mM	29KDa
Cm: cloranfenicol Amp: ampicilina							

Capítulo II

MyM.II.1. Muestras de sueros

El presente trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Bioética del Colegio de Médicos de la Provincia de Salta (ver anexo). Cabe mencionar, además, que las muestras de pacientes chagásicos de la Provincia de Chaco (cedidas por el Dr. Patricio Diosque) y las muestras de pacientes con leishmaniosis y strongiloidiosis de la seroteca del Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (IIET, Orán, UNSa) utilizadas en este trabajo, fueron colectadas en el marco de estudios debidamente aprobados por el Comité de Bioética del Colegio de Médicos de la Provincia de Salta o por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta. En todos los casos, los beneficios y los peligros para la salud fueron informados a los pacientes adultos o los padres o tutores, en el caso de tratarse de menores de edad; luego firmaron el formulario de consentimiento informado.

MyM.II.1.i. Sueros para determinación de parámetros de eficacia diagnóstica:

Para determinar la eficacia diagnóstica de cada uno de los antígenos, o mezcla antigénica, se utilizó el panel de sueros especificado en la Figura II.1. El panel utilizado se compuso de 312 sueros, de los cuales: 172 correspondían a muestras de pacientes con infección por *T. cruzi* positiva (HTc+) provenientes mayormente de las provincias de Chaco o Salta, que fueron reactivos ante dos o más pruebas de serología convencional; mientras que, 140 correspondían a pacientes sin infección chagásica (negativos por serología convencional) que incluían: 47 personas sanas de la localidad de Salta Capital, Provincia de Salta, y 73 pacientes leishmaniásicos y 20 pacientes con strongiloidiosis del departamento de Orán, Provincia de Salta.

Las muestras de pacientes chagásicos provenientes de la Provincia de Chaco fueron obtenidas por el Dr. Patricio Diosque y su equipo del Instituto de Patología Experimental (IPE-CONICET), de Salta. Las mismas se recolectaron durante estudios transversales llevados a cabo entre 1999-2000 en las localidades de Pampa Ávila y Tres Estacas, departamento Chacabuco, y en 2008 en la localidad de Las Leonas, departamento 12 de Octubre, Provincia de Chaco. En estos

trabajos, se recolectaron tanto muestras de pacientes, incluyendo niños y adultos, como muestras de perros. La detección de la infección en las muestras de pacientes chagásicos fue llevada a cabo mediante ELISA-Homogenado, ELISA-recombinante, Hemoaglutinación Indirecta (HAI) (todos de Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina) y/o Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Diosque et al., 2004; Monje Rumi et al., 2013; Monje-Rumi et al., 2015). De los 80 sueros de pacientes de la Provincia de Chaco incluidos en el grupo HTc+, 31 correspondían a niños menores a 16 años que fueron tratados y monitoreados posteriormente (ver detalles en sección MyM.II.1.iii).

Por otro lado, las muestras de pacientes chagásicos de Salta, fueron recolectadas en el marco de una colaboración con una campaña de atención sanitaria de la Asociación para el Desarrollo Sanitario Regional (ADESAR, Provincia de Buenos Aires). La campaña consistió en atención médica y screening de parasitologías (Chagas y parásitos intestinales), mediante consultorios y laboratorios móviles, en comunidades wichi de las localidades de Coronel Juan Solá (Morillo), La Unión, Santa Victoria Este y Alto La Sierra, departamento Rivadavia, Provincia de Salta. En total alrededor de 1000 personas recibieron atención médica y a unos 700 se les tomó muestra de sangre, para el diagnóstico de infección chagásica mediante Hemoaglutinación Indirecta (BIOZIMA, Laboratorio Lemos) y ELISA lisado (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina) en nuestro laboratorio. Algunas muestras fueron también evaluadas por inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (ARCHITECT Chagas®, Abbott) o mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) por personal del Hospital Alemán, Provincia de Buenos Aires. Del total de muestras analizadas, 93 fueron reactivas por dos o más técnicas considerándose positivas y 67 contenían volumen suficiente para ser evaluadas por los ensayos de ELISA-TcTASV posteriormente.

Se estudiaron 493 muestras de niños y adultos de la localidad de Pichanal, departamento de Orán, Provincia de Salta. Estas muestras fueron tomadas en el marco de una campaña de desparasitación masiva anti-geohelminthos llevada a cabo en el marco de un proyecto conjunto entre Fundación Mundo Sano y el Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IIET, Sede Regional Orán, Universidad Nacional de Salta). Todas las muestras fueron analizadas por Hemoaglutinación Indirecta HAI Chagas Polychacho (Laboratorio Lemos), ELISA Biozima (Laboratorio Lemos) y/o ELISA lisado (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina), resultando 15 muestras positivas por dos de los métodos.

Por último, se incluyeron 10 muestras de sueros de adultos oriundos de Bolivia establecidos en Cucullú, partido de San Andrés de Giles, Provincia de Buenos Aires, gentilmente

cedidas por la fundación ADESAR. La infección chagásica en estos pacientes fue confirmada mediante dos pruebas positivas de serología convencional (HAI y ELISA). Estos pacientes fueron tratados con nifurtimox y monitoreados posteriormente (ver detalles en sección MyM.II.1.iii).

Los sueros de pacientes sanos, leishmaniásicos y con estrongiloidosis fueron tomados de las serotecas de la Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta y del Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales, Sede Regional Orán, Universidad Nacional de Salta. Los sueros de pacientes leishmaniásicos pertenecen a pacientes del departamento de Orán, Salta, con ELISA-Homogenado de *Leishmania spp.* y frotis positivo, negativos por ELISA-Lisado de *T. cruzi*, ELISA-recombinante y HAI (Chagatest, Laboratorios Wiener) (Hoyos et al., 2016). Los sueros de pacientes con estrongiloidosis tienen la misma procedencia que el grupo anterior. Estos fueron diagnosticados para *Strongyloides stercoralis* por coproparasitología y fueron negativos para *T. cruzi* por ELISA-lisado (Chagatest, Laboratorios Wiener) y HAI (Laboratorios Lemos).

MyM.II.1.ii. Sueros de niños con infección congénita

Los sueros de niños con infección chagásica congénita fueron cedidos gentilmente por la Bioquímica Irma Torrejón del Laboratorio Central de la Provincia de Jujuy. Las muestras fueron obtenidas durante un trabajo multicéntrico (entre los años 2013-2014) en el marco de las becas Carrillo-Oñativia en el cual se estudiaron los núcleos familiares de madres chagásicas con residencia en Perico, Provincia de Jujuy, que dieron a luz en los distintos hospitales de la Región. Estos casos no se consideran autóctonos de la mencionada provincia debido a que todas las pacientes estudiadas eran originarias de Bolivia o hijas de madres bolivianas. Por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha certificado en el 2000 y recertificado en el 2012, que la Provincia de Jujuy se encuentra libre de transmisión vectorial. Sumado a esto, en el marco de este trabajo se llevó a cabo la inspección de los domicilios, no habiéndose registrado presencia de triatominos. Se considera entonces que las muestras de niños infectados en estos núcleos familiares como casos auténticos de transmisión connatal. Se contaba con muestras de 7 familias donde 5 pares de muestras incluían muestra de madre más un hijo con infección congénita y 2 familias incluían madres con tres hijos con infección congénita (Tabla II.2). Todas las muestras fueron evaluadas por el personal del correspondiente Hospital mediante serología convencional (HAI, ELISA) y por Inmunofluorescencia, resultando positivas las tres pruebas.

MyM.II.1.iii. Sueros de pacientes tratados

Se estudiaron en total 41 muestras de pacientes tratados: 31 muestras provienen de niños tratados de Chaco y 10 muestras de sueros de adultos tratados procedentes de Bolivia establecidos en Cucullú, Provincia de Buenos Aires. Las muestras de niños tratados de Chaco fueron obtenidas por el grupo del Dr. Patricio Diosque durante el estudio llevado a cabo en las localidades de Pampa Ávila y Tres Estacas, departamento de Chacabuco, Provincia de Chaco (Diosque et al., 2004; Monje Rumi et al., 2013). En ambas zonas todos los niños fueron diagnosticados para infección por *T. cruzi* y todos aquellos seropositivos por dos pruebas serológicas fueron tratados con benznidazol durante 60 días. Las muestras de los pacientes de Pampa Ávila fueron colectadas antes del tratamiento en 2007 y dos años después del tratamiento en 2009. En Tres Estacas, las muestras se tomaron antes del tratamiento en 2004 y dos y cinco años después (2006 y 2009, respectivamente). Las muestras pre- y post-tratamiento fueron estudiadas por pruebas serológicas de ELISA (Chagatest ELISA recombinante, Laboratorios Wiener) y HAI (Chagatest HAI, Laboratorios Wiener) y por PCR para amplificar la región hipervariable de los minicírculos de ADNk (cebadores 121-122). La negativización de dos pruebas serológicas al final del periodo de seguimiento fue considerado el criterio de cura, mientras que una PCR positiva post-tratamiento fue considerada como falla terapéutica. Los resultados de ELISA, HAI y PCR obtenidos por (Monje Rumi et al., 2013) fueron comparados con la reactividad de los ensayos de ELISA con TcTASVs realizados aquí. Se utilizaron en total 31 muestras de las cuales 14 provienen de niños tratados de Tres Estacas y 17 de Pampa Ávila.

Los pacientes de Cucullú realizaron tratamiento completo de 60 días con Nifurtimox en junio del 2013 (muestra de suero pre-tratamiento). Se contaba con muestra de suero post-tratamiento tomada en octubre de 2016. Cabe destacar que los pacientes no regresaron a zona endémica entre 2013 y 2016.

MyM.II.2. Serología convencional

Como pruebas de referencia para diagnosticar la infección chagásica se utilizaron kits comerciales de Hemoaglutinación Indirecta (Chagatest HAI, Laboratorios Wiener, Rosario Argentina, o HAI Chagas Polychaco, Laboratorio Lemos, Buenos Aires, Argentina) y ELISA de

Homogenado proteico de *T. cruzi* (Biozima Chagas, Laboratorio Lemos o Chagatest ELISA lisado, Laboratorios Wiener). En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante. La obtención de dos pruebas serológicas positivas fue tomado como criterio de positividad de infección por *T. cruzi*. En esta tesis se estudiaron por estas pruebas 700 pacientes de Rivadavia, 493 pacientes de Pichanal, los sueros de pacientes de área no endémica y los pacientes con *S. stercoralis*. El resto de las muestras fueron serodiagnosticadas por otros en trabajos anteriores.

MyM.II.3. ELISA Indirecto con antígenos TcTASV para sueros de humanos

En este trabajo se utilizó la técnica de ELISA indirecto. Esta técnica es versátil, simple y económica, a la vez que aporta mucha información al ser una técnica semicuantitativa que permite procesar los resultados numéricos y luego analizar los datos mediante estadísticos adecuados. Brevemente, para realizar esta técnica se procedió, en primera instancia, al “pegado” de los antígenos a las placas de poliestireno de 96 pocillos (Extrogene, Taiwán), colocando en los pocillos el antígeno en buffer de plaqueo a 4°C durante toda la noche. Luego de la sensibilización de las placas, se procedió a bloquear los sitios libres con 200µL/pocillo de PBS-leche descremada 5% para evitar uniones inespecíficas. Se incubaron las placas con 100µL/pocillo de los sueros a evaluar en la dilución adecuada y, a continuación se incubó con 100µL/pocillo de anticuerpo anti-IgG de humanos conjugado con peroxidasa (SIGMA). Todas las incubaciones se realizaron a 37°C durante 1 hora, lavándose 5 veces con PBS-Tween 0,1% entre las mismas. Finalmente, se colocó en los pocillos el cromógeno tetrametilbenzidina (TMB, SIGMA) junto con H₂O₂ en buffer citrato. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 0.5 N. La lectura de densidad óptica (DO) a 450nm se realizó en el lector placas de ELISA Biotek ELx800.

Estandarización de los ensayos de ELISA con antígenos TcTASV

Placa “cero”: Previo al inicio de la optimización de todos los ELISAs, se llevó a cabo un ensayo en el que se evaluó la reactividad de un grupo de sueros infectados por *T. cruzi* y no infectados contra cada uno de los antígenos (o mezcla antigénica) a estudiar y contra GST. Luego se calculó para cada suero el ratio DO_{TcTASV}/DO_{GST} . De esta forma se identificaron los sueros que se utilizarían como controles positivos (preferentemente se escogió un suero con alta reactividad y uno con reactividad menor).

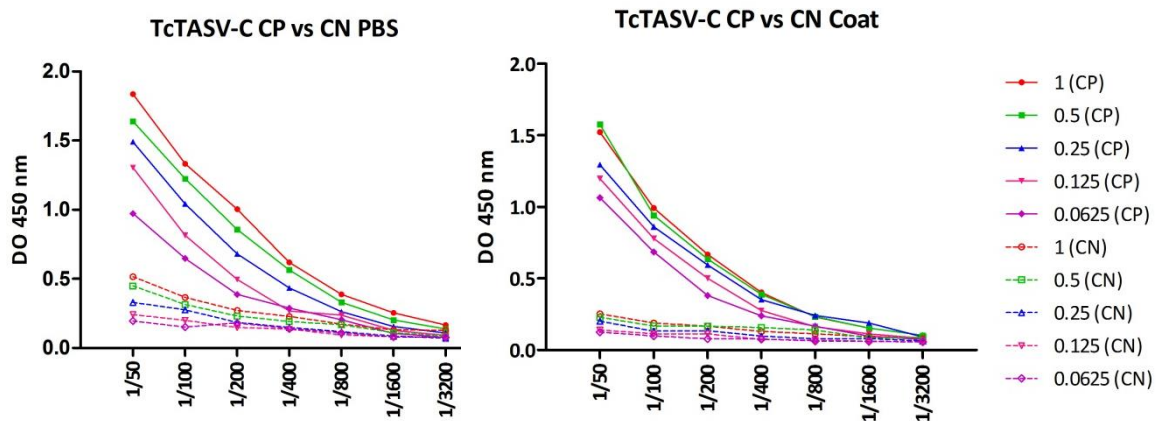


Figura MyM 1 Optimización del ELISA-TcTASV-C. Condiciones ensayadas: PBS vs Coating como buffer de plaqueo; diluciones sucesivas de antígeno desde $1\mu\text{g}$ hasta $0.0625\mu\text{g}$ por pocillo; dilución de un suero desde 1/50 hasta 1/3200.

Los ensayos de ELISA para cada uno de los antígenos TcTASV fueron estandarizados de modo de seleccionar las condiciones óptimas de buffer de plaqueo, concentración de antígeno, dilución de suero y dilución de conjugado. Las concentraciones de cada uno de los reactivos se optimizaron de acuerdo al método “checkerboard” de titulaciones dobles (Crowther, 2009). En primera instancia se evaluaron diluciones sucesivas de antígeno desde $1\mu\text{g}/\text{pocillo}$ hasta $0.0625\mu\text{g}/\text{pocillo}$ en dos buffers de plaqueo: PBS ($\text{pH}=7.4$) y Buffer Carbonato ($\text{pH}=9.6$) y diluciones sucesivas de dos sueros controles positivos de infección por *T. cruzi* y dos sueros controles negativos de infección por *T. cruzi* (un control sano y un control leishmaniásico) desde 1/50 hasta 1/3200. En la Figura MyM.1 se muestran, por ejemplo, los resultados de la doble titulación de suero y antígeno en buffer PBS versus buffer Coating para el ELISA-TcTASV-C. En este caso, se escogió el buffer Coating ya que con este buffer de plaqueo se obtiene una menor reactividad de fondo en los controles negativos y, por lo tanto, una mejor discriminación entre positivos y negativos. De ser necesario y a fines de seleccionar entre las concentraciones de antígeno y diluciones de suero que mejor discriminación entre controles positivos y negativos lograba, se llevaron a cabo titulaciones dobles de antígeno y suero evaluando sólo esas diluciones y utilizando como buffer de plaqueo el que mejores resultados obtuvo en la primera etapa de titulación.

A continuación, se procedió a evaluar la dilución óptima del anticuerpo anti-IgG de humano conjugado con peroxidasa (SIGMA, EEUU). Para ello se realizó una doble titulación del conjugado desde 1/2500 hasta 1/40000 titulando a la vez los sueros controles y manteniendo constante las condiciones de plaqueo del antígeno óptimas elegidas en los pasos anteriores. En esta instancia, además, se plaqueó GST como control de background utilizando las mismas

condiciones que del antígeno en cuestión. En la Figura MyM.2 se muestran la doble titulación de conjugado y suero para el caso del ensayo de ELISA con una mezcla antigénica de TcTASV-A y TcTASV-C.

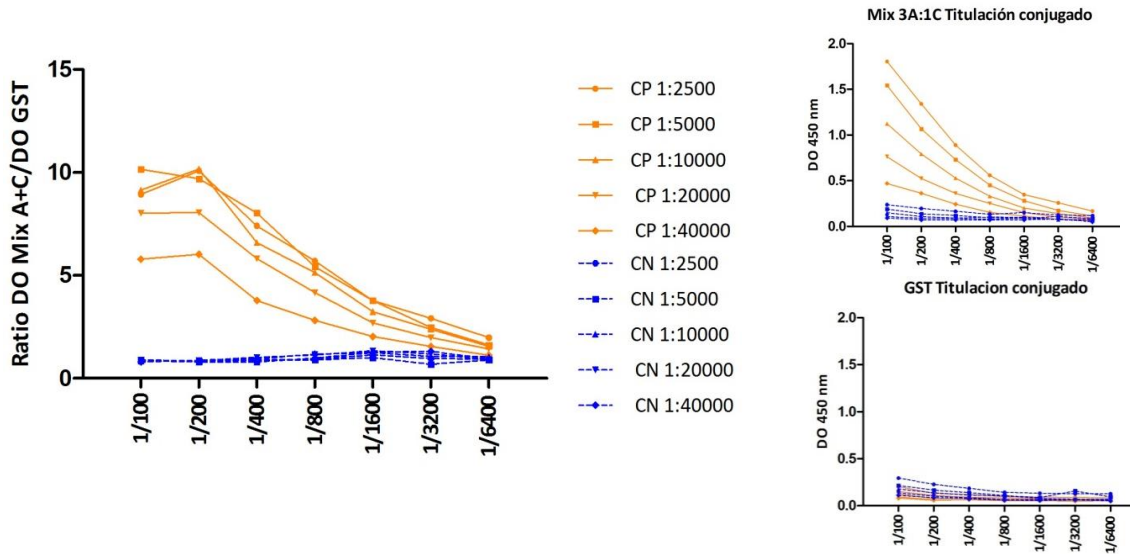


Figura MyM 2 Optimización del ELISA-Mix A+C. Condiciones ensayadas: dilución de un sueros desde 1/100 hasta 1/6400; dilución de conjugado desde 1/2500 hasta 1/40000. Las placas se sensibilizaron con la mezcla antigénica en proporción TcTASV-A / TcTASV-C 3:1 (0.375µg y 0.125µg por pocillo, respectivamente) según se optimizó en ensayos previos. Para descontar la absorbancia de la proteína de fusión GST, se sensibilizaron las placas con 0.5µg de esta proteína por pocillo. Se muestran a la derecha la absorbancia para la mezcla (Mix 3A:1C) y para GST, y a la izquierda los ratios de absorbancia ($DO_{\text{Mix A+C}}/DO_{\text{GST}}$) de las diluciones de sueros controles.

En la Tabla MyM.6 se resumen las condiciones optimizadas para los ensayos de ELISA con TcTASV-A, TcTASV-B, TcTASV-C y una mezcla de TcTASV-A y TcTASV-C. Se escogió probar una mezcla de estos dos últimos antígenos ya que fueron los que individualmente mostraron el mejor desempeño en cuanto a sensibilidad y especificidad al evaluar el panel de sueros control.

Tabla MyM.6. Condiciones óptimas para los ensayos de ELISA con antígenos TcTASV en sueros de humanos.			
ELISA	Condiciones de plaqueo	Dilución de suero	Dilución de conjugado
TcTASV-A	0.5µg/pocillo en PBS	1/100	1/10000
TcTASV-B	0.5µg/pocillo en Coating	1/50	1/5000
TcTASV-C	0.25µg/pocillo en Coating	1/100	1/10000
Mix A+C	0.375µg de TcTASV-A + 0.125µg/pocillo en Coating	1/100	1/10000

MyM.II.4. Determinación de eficacia diagnóstica de los ELISAs con TcTASV

Una vez optimizadas las condiciones de los ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos anti-TcTASV en humanos, se procedió a analizar el panel de sueros especificado en MyM.II.1.i, Figura II.1. Cada placa de ELISA se sensibilizó con el antígeno TcTASV o mezcla a estudiar en una mitad de la placa, y con GST en la otra mitad. En cada placa se evaluaron los sueros utilizados como controles positivos y negativos en el proceso de optimización. Para cada suero se calculó una relación entre la absorbancia obtenida con los antígenos TcTASV y la obtenida para GST ($\text{ratio} = \text{DO}_{\text{TcTASV}}/\text{DO}_{\text{GST}}$), para descontar el posible efecto del GST en la absorbancia (Bernabó et al., 2013).

MyM.II.5. Análisis estadístico y parámetros de eficacia diagnóstica

Para cada uno de los ELISA con los antígenos TcTASV, el cut off se seleccionó a través del análisis de múltiples pares de sensibilidad-especificidad mediante curvas ROC (*Receiver-Operating characteristic*), software GraphPad Prism v.5 (Swets, 1996; Linnet et al., 2012; Menezes-Souza et al., 2015). El criterio utilizado para la selección del valor umbral fue aquel que permita la máxima sensibilidad para una especificidad del 100%. Además, el análisis mediante curvas ROC permitió establecer el grado de exactitud de las distintas pruebas al clasificar un resultado como positivo o negativo mediante la estimación del parámetro AUC (*Area Under the Curve*) ROC (Swets, 1996). El valor de este último parámetro se interpreta de la siguiente manera: valores entre 0.5 y 0.7 indican baja exactitud, entre 0.7 y 0.9, una exactitud moderada y pueden ser útiles para algunos propósitos y un valor mayor de 0.9 indica exactitud alta (Swets, 1996).

Luego, el ratio de cada suero se relativizó al valor de cut-off siguiendo la fórmula: $\text{Ratio}_{\text{rel}} = \text{Ratio}/\text{cut-off}$. El objetivo de este procedimiento fue lograr resultados comparables entre los distintos sets de datos procedentes de los ELISAs evaluados (por ejemplo: resultados de ELISA que usan diferentes TcTASVs), debido a que los ratios fueron transformados para alcanzar la misma escala (Caballero et al., 2007; Floridia-Yapur et al., 2014). Las muestras se consideraron positivas cuando el valor del $\text{Ratio}_{\text{rel}}$ resultara igual o mayor que 1, y negativa, cuando el valor del $\text{Ratio}_{\text{rel}}$ resultara menor que 1.

La distribución normal de los datos fue testeada mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilk ($p < 0.05$). La prueba U de Mann Whitney ($p < 0.05$) fue aplicada para evaluar las diferencias entre los grupos de sueros controles positivos y negativo. La significancia estadística de

la diferencia de reactividad pre-tratamiento y post-tratamiento se estudió mediante la prueba de comparación de medias de muestras pareadas de Wilcoxon ($p < 0.05$). Además, se calculó un porcentaje de variación de los niveles de anticuerpos detectados por ELISA luego del tratamiento como: $[(\text{React}_{\text{Tfinal}} - \text{React}_{\text{Tbasal}}) / \text{React}_{\text{Tbasal}}] * 100$ (Escribà et al., 2009). Si el signo del porcentaje, resultaba negativo, por lo tanto, indicaba una disminución de niveles de anticuerpos post-tratamiento; si por el contrario el signo resultaba positivo, significaba un incremento de los mismos. Si el porcentaje de disminución de los niveles de anticuerpos era mayor al 30% con respecto a los niveles pre-tratamiento interpretamos esa disminución como criterio indicativo del impacto positivo de la terapia (Viotti et al., 2011; Santamaría et al., 2013); mientras que un valor de disminución de los anticuerpos mayor al 75% es indicativo de tendencia hacia la seroconversión (Escribà et al., 2009). Todos los análisis de datos y pruebas estadísticas de este capítulo se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism v.5.

Capítulo III

MyM.III. Sección 1. Evaluación de la capacidad diagnóstica de los antígenos TcTASV mediante ensayos de ELISA para la detección de la infección chagásica en perros

MyM.III.1.1. Sueros

Las muestras de sueros de perros con infección natural utilizadas en este trabajo fueron obtenidas (y cedidas gentilmente) por el Dr. Patricio Diosque y su equipo de trabajo. Las mismas se recolectaron durante un estudio transversal llevado a cabo en las localidades de Las Leonas (Marzo de 2008) y El Palmar (Febrero de 2010), Departamento 12 de Octubre, Provincia de Chaco. En mencionado trabajo, además de muestras de pacientes, se recolectaron muestras de 323 perros (142 de Las Leonas y 181 de El Palmar) que fueron analizados para determinar su infección por *T. cruzi* mediante PCR, xenodiagnóstico y ELISA-Homogenado proteico de epimastigotes (ELISA-H) (Monje-Rumi et al., 2015). El protocolo aplicado en este estudio contaba con la aprobación por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta, Argentina (Monje-Rumi et al., 2015).

Para la realización de esta tesis, se seleccionaron 70 sueros ELISA-H positivos como controles positivos de infección por *T. cruzi* (PTc+). A pesar de que se utilizó un homogenado de proteínas del parásito como antígeno, la posibilidad de que estos sueros sean falsos positivos por reactividad cruzada con antígenos de *Leishmania spp.* es poco probable ya que este parásito no fue reportado en el área de estudio. Además, algunos de estos sueros fueron reactivos con antígenos recombinantes de *T. cruzi* previamente (Cimino et al., 2011; Floridia-Yapur et al., 2014).

Los sueros del grupo PTc+ fueron clasificados en grupo I (GI) o grupo II (GII) de acuerdo a resultados previos de xenodiagnóstico y/o PCR. Los perros con PCR y/o xenodiagnóstico positivos fueron incluidos en GII mientras que los perros del GI fueron sólo positivos por H-ELISA. Para evaluar la especificidad de la técnica, se utilizaron 28 sueros de perros sanos de Buenos Aires como controles negativos (GIII).

Por otra parte, se incluyeron 25 sueros de perros infectados por *L. infantum* (GIV), que fueron cedidos gentilmente por el Dr. Diego Marco del IPE-CONICET. Estos perros fueron diagnosticados mediante una combinación de métodos parasitológicos, moleculares y serológicos (Barroso, Marco, et al., 2015; Barroso, Nevot, et al., 2015). Cabe destacar que estas muestras fueron tomadas en el marco de estudios cuyos procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Veterinarias de la Universidad Católica de Salta (23 de abril de 2014), Argentina (Barroso, Marco, et al., 2015; Barroso, Nevot, et al., 2015). Los dueños de los perros voluntariamente solicitaron la atención médica de sus animales. Bajo sospecha clínica de la enfermedad, ellos dieron su consentimiento informado para incluir el caso en este estudio.

MyM.III.1.2. ELISA Indirecto con antígenos TcTASV para sueros de perros

Para realizar esta técnica se procedió de modo similar a lo especificado en la sección MyM.II.3 de Materiales y Métodos. En primera instancia, se realizó el “pegado” de los antígenos a las placas de poliestireno, colocando en los pocillos el antígeno en PBS 1 hora a 37°C. Luego, se procedió a bloquear los sitios libres con PBS-leche descremada 5% durante 1 hora para evitar uniones inespecíficas. A continuación, se incubaron las placas con los sueros de perros a evaluar en la dilución adecuada durante 1 hora. Se incubaron las placas con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de perros (SIGMA) durante 30 minutos, seguido de una incubación del mismo tiempo con avidina-peroxidasa (SIGMA). Todas las incubaciones se realizaron a 37°C y se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0,1% entre incubaciones. Finalmente, se colocó en los pocillos el cromógeno tetrametilbenzidina (TMB, SIGMA) junto con H₂O₂ en buffer citrato. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 0.5 N. La lectura de densidad óptica (DO) a 450nm se realizó en el lector placas de ELISA Biotek ELx800.

Estandarización de los ensayos de ELISA con antígenos TcTASV

Placa “cero”: De la misma manera que con la estandarización de los ELISAs con sueros de humanos, se llevó a cabo un ensayo preliminar en el que se evaluó la reactividad de un grupo de sueros de perros infectados por *T. cruzi* y no infectados contra cada uno de los antígenos (o mezcla antigénica) a estudiar y contra GST. Se calculó para cada suero el ratio DO_{TcTASV}/DO_{GST} . De esta

forma se identificaron los sueros que se utilizarían como controles positivos (preferentemente se escogió un suero con alta reactividad y uno con reactividad menor).

En primera instancia, las condiciones de la técnica de ELISA fueron estandarizadas para cada antígeno recombinante. Para ello se seleccionaron como controles positivos de infección dos sueros de perros con PCR y xenodiagnóstico positivos, es decir con evidencia directa del parásito. Y se utilizaron dos controles negativos de la infección por *T. cruzi* un suero de perro sano de Buenos Aires (área no endémica) y un pool de sueros de perros Leishmaniásicos, cedido gentilmente por el Dr. Diego Marco. Se titularon diluciones sucesivas al medio de antígeno (desde 1µg/poc hasta 0.0625µg/pocillo) en combinación con diluciones sucesivas de suero (1/50 hasta 1/3200) mediante “checkerboard titration” (Crowther, 2009). Se seleccionaron para cada ensayo la combinación de condiciones de antígeno y suero con las que se obtenían la mejor discriminación entre negativos y positivos, priorizando la mayor densidad óptica del control positivo en combinación con el menor *background* posible.

A continuación se evaluaron dos diluciones de anticuerpos secundarios (anti-dog IgG whole molecule, biotin conjugate, SIGMA): 1/1250; 1/2500; y dos diluciones de avidina-peroxidasa (SIGMA): 1/8000; 1/16000. Utilizando el mismo criterio explicitado anteriormente, se seleccionó la mejor combinación de dilución de anticuerpo secundario y avidina-peroxidasa.

Tabla MyM.7. Condiciones óptimas para los ensayos de ELISA con antígenos TcTASV en sueros de perros.				
Antígeno*	Condiciones de plaqueo	Dilución de Suero	Anticuerpo Secundario	Avidina-peroxidasa
TcTASV-A	0.5µg/poc. en PBS	1/200	1/1250	1/8000
TcTASV-B	0.5µg/poc. en PBS	1/200	1/2500	1/8000
TcTASV-C	0.125µg/poc. en PBS	1/200	1/2500	1/16000
Mix A+C	0.25µg/poc. TcTASV-A + 0.25µg/poc. TcTASV-C en PBS	1/400	1/2500	1/16000
*Para cada ELISA con los antígenos TcTASV, se ensayó en paralelo el GST como control de background usando las mismas condiciones de plaqueo y dilución de suero que para el antígeno evaluado.				

En la Tabla MyM.7 y Figura MyM.3, se resumen los resultados de la estandarización para los ensayos de ELISA con TcTASV-A, TcTASV-B, TcTASV-C y una mezcla de TcTASV-A y TcTASV-C. Al igual que en humanos, se escogió probar una mezcla de estos dos últimos antígenos ya que fueron

los que individualmente mostraron la mejor performance en cuanto a sensibilidad y especificidad obtenida al evaluar el panel de sueros control.

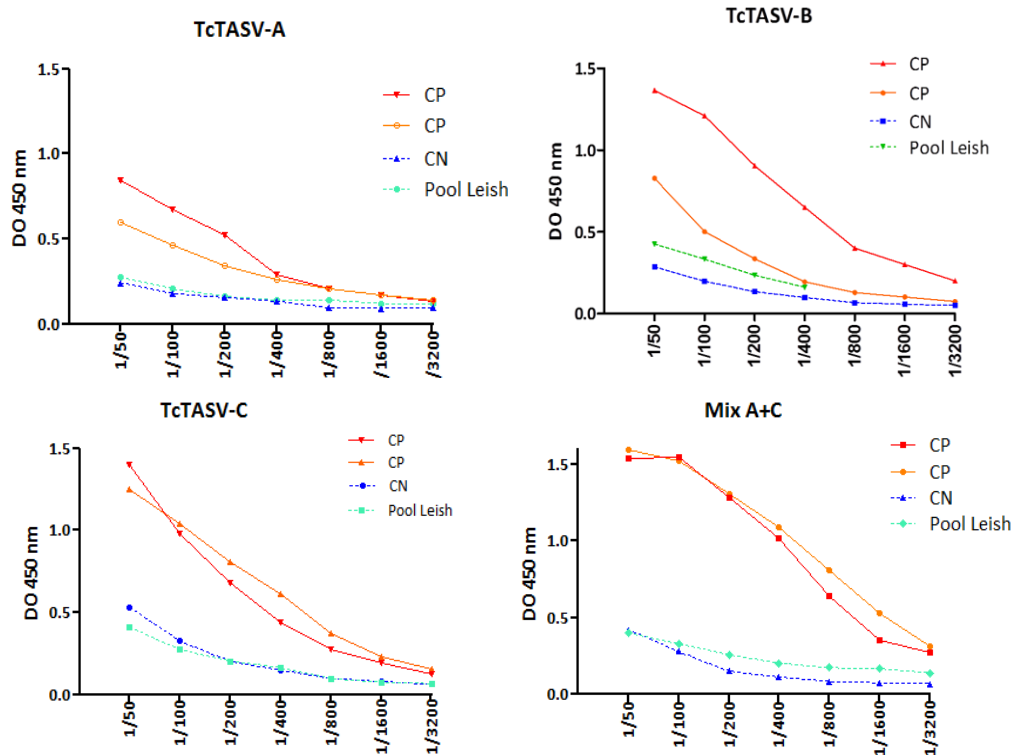


Figura MyM 3 Titulación de sueros controles positivos (línea continua roja y línea continua naranja), de suero control negativo (línea punteada azul) y de pool de sueros leishmaniásicos (línea punteada celeste), para la concentración óptima de antígeno seleccionada (Tabla MyM.7)

MyM.III.1.3. Evaluación del panel de sueros

Una vez estandarizados los ensayos de ELISA-TcTASV, se evaluó la reactividad de las muestras contenidas en el panel de sueros de perros seleccionado (Figura III.1). Además, se evaluó la reactividad de los sueros del panel frente a una mezcla de los antígenos que mejor performance obtuvieron en forma individual. Cabe aclarar que para considerar el posible efecto del tag de GST en la absorbancia total, cada placa se diseñó de forma de poder determinar de forma simultánea la actividad anti-TcTASV_{GST} y anti-GST, de los sueros. Los sueros fueron evaluados por duplicado.

MyM.III.1.4. Análisis estadístico de los datos

Al igual que en el caso de humanos la reactividad de cada suero se relativizó mediante el cálculo de la razón (ratio) entre la DO media de TcTASV_{GST} y GST (ratio= DO_{TcTASV}/ DO_{GST}), para descontar el posible efecto del GST en la absorbancia (Bernabó et al., 2013). Para cada uno de los antígenos, el cut off se seleccionó a través del análisis de múltiples pares de sensibilidad-especificidad mediante curvas ROC (*Receiver-Operating characteristic*), software GraphPad Prism v.5 (Swets, 1996; Linnet et al., 2012; Menezes-Souza et al., 2015). El criterio utilizado para la selección del valor umbral fue éste que permita la máxima sensibilidad para una especificidad del 100%. Luego, el ratio de cada suero se relativizó al valor de cut-off ($Ratio_{rel}=Ratio/cut-off$). Las muestras se consideraron positivas cuando el valor del Ratio_{rel} resultara igual o mayor que 1, y negativa, cuando el valor del Ratio_{rel} resultara menor que 1. La distribución normal de los datos fue testada mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilk ($p < 0.05$). Debido a que los datos no se distribuyeron de forma normal la prueba U de Mann Whitney ($p < 0.05$) fue aplicada para evaluar las diferencias. Todos los análisis de datos y pruebas estadísticas de este capítulo se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism v.5.

MyM.III. Sección 2. Mapeo de epítopes de TcTASV-C mediante ELISA

MyM.III.2.1. Péptidos

Se disponía en el laboratorio de 6 péptidos sintéticos de la secuencia de TcTASV-C de entre 16 y 19 aminoácidos de longitud (Rodríguez et al., 2015). La información sobre las secuencias, grado de conservación y correspondientes denominaciones de los péptidos utilizados se muestran en la Tabla MyM.8 y Figura III.4.

Tabla MyM.8. Descripción de los péptidos de TcTASV-C utilizados.			
Péptido	Secuencia	Ubicación dentro del gen	Posición respecto a motivos <i>tasv_all-tasv_c</i>
P304_319	STENIAALLQNFVGPD	aa 304 a 319	Fuera - Fuera
P189_207	KSPDQTAEDGSAQRPSENI	aa 189 a 207	Fuera - Fuera
P172_188	QSGVGSPSREAAEAPQK	aa 172 a 188	Fuera - Fuera
P46_62	PGTDGKLSWRLRGEEEW	aa 46 a 62	Dentro - Dentro
P47_63	PGTDGKLSWRLQGEEEW	aa 47 a 63	Dentro -Dentro
P73_89	VDQDSDERARLCVAGG	aa 73 a 89	Fuera-Dentro

MyM.III.2.2. Ensayos de ELISA-péptidos de TcTASV-C

Los ensayos de ELISA se realizaron en placas de 384 pocillos de fondo plano (NuncMaxiSorp) que permitieron analizar de forma simultánea todos los péptidos. Brevemente, las placas se sensibilizaron con 30µL de péptidos 10 ng/µL y 30µL de las proteínas recombinantes TcTAVS-C_{GST}, GST y TcTASV-C_{HIS} 1ng/µL, en PBS overnight a 4°C. Estas últimas se incluyeron en las placas con fines comparativos y de tener una referencia de reactividad. Se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 0.05% y se procedió al bloqueo de los sitios inespecíficos con PBS-Leche descremada 5%, durante 1hs a 37°C. Luego de lavar, se colocaron los sueros en dilución 1/100 en PBS-Leche descremada 1% durante 1hs a 37°C. Los siguientes lavados se realizaron agregando un último lavado con PBS solo. Se incubó con anticuerpo secundario (anti-dog IgG biotinilado, SIGMA) en dilución 1:5000 durante 30 minutos a 37°C y, luego de lavar, se incubó con avidina-peroxidasa (SIGMA) en dilución 1/16000 en las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Por último, y posterior al lavado, se agregó el sustrato TMB y se llevó a cabo la lectura de DO sin cortar la reacción a 405nm a los 30 minutos (lector FilterMax F5 Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, EEUU). Para el análisis se tomó como valor de Abs el último punto de la cinética. Los sueros se evaluaron en todos los casos por duplicado.

El cut off para discriminar entre sueros reactivos y no reactivos ante los distintos péptidos de TcTASV-C se calculó para cada péptido en cada placa de la siguiente forma:

$$cut\ off = M + 3SD + 10\%$$

Donde M es la media de la DO de los controles negativos y SD es el desvío estándar de los valores de DO de los controles negativos. El 10% del valor se sumó a fines de definir una zona de indeterminación que permitió diferenciar aquellos sueros realmente reactivos ante un determinado péptido de aquellos que no lo fueran. Los sueros se consideraron péptido (+), si la Media de la DO/Cut off ≥ 1 y péptido (-), si la Media de la DO/Cut off < 1 .

MyM.III. Sección 3. Estudio de TcTASV-C como un biomarcador serológico de la infección chagásica en perros

MyM.III. Sección 3. A. Ensayos de Western Blot para detección de TcTASV-C en sueros de perros infectados

El protocolo de Western-Blot para la detección de TcTASV-C en sueros de perros infectados naturalmente se estandarizó mediante la utilización de un pool de sueros de perros sanos “contaminado” con distintas cantidades de TcTASV-C recombinante: 1 μ g, 0.5 μ g, 0.25 μ g, 0.125 μ g, 0.0625 μ g y 0.03175 μ g. Se prepararon los geles con un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida (29:1) de 7.5% de forma que permita una mejor separación de las bandas de bajo peso molecular. Debido a que el suero sanguíneo contiene una elevada concentración de proteínas, que dificultan la resolución mediante SDS-PAGE, entre las cuales se encuentran albúmina y gran cantidad de inmunoglobulinas (que podrían cruzar con el anticuerpo secundario en la detección), las muestras de suero a analizar se diluyeron 1:20. Luego, las muestras se prepararon de la siguiente forma: 7 μ l de cada suero diluido + 5 μ l de PBS 1X + 3 μ l de Cracking Buffer 5X (SDS 4 %, 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 200 mM DTT). Además, se preparó una muestra de 500 ng de TcTASV-C recombinante como control positivo. Se sembraron las muestras en el gel preparado anteriormente. En cada gel se sembró el marcador de peso con banda de 70KDa roja (PageRuler, BioRad). Se corrió el gel a 170 voltios hasta que las bandas de 35KDa, 25KDa, 15KDa y 10KDa se hayan “caído” del gel (aproximadamente 90 minutos). Esto último, permitió que las proteínas entre 70-50 KDa se resuelvan mejor y que las cadenas livianas de la inmunoglobulinas (~25KDa) presentes en el suero sean eliminadas, evitando de esta forma reacciones cruzadas con el conjugado. Por otro lado, se cortó el gel aproximadamente a 5mm por debajo de la banda de 70KDa para asegurar la eliminación de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (~50KDa) que pudieran interferir en el posterior revelado. En la Figura MyM.4.A, se muestra un esquema de corrida y corte de los geles de poliacrilamida.

A continuación, las proteínas del gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™- ECL, GE Healthcare) en cubas verticales Mini Protean II (BioRad) durante a 1 h, a 100 voltios con potencia baja, en Buffer de Transferencia. Las membranas fueron teñidas con Rojo Ponceau para chequear la correcta transferencia de las proteínas (Figura MyM.4.B). Todos los lavados entre incubaciones se realizaron con PBS-Tween 0.05%. Las membranas fueron

bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con PBS-1% gelatina de pescado. Se realizó un segundo bloqueo con anticuerpo anti-IgG de ratón (SIGMA) 1/200 en PBS-0.1% gelatina de pescado durante 2.5 hs. A continuación, se incubaron las membranas con anticuerpo primario de conejo y/o de ratón inmunizados con TcTASV-C_{GST} (sueros anti-TcTASV-C) en una dilución 1/200 en PBS 0.1% gelatina de pescado durante toda la noche con agitación a 4°C.

Se trabajó de forma paralela con dos sistemas de revelado y, por lo tanto, con dos conjugados distintos. Para el revelado por quimioluminiscencia, se incubó la membrana con el anticuerpo anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa durante 1h y posteriormente se reveló utilizando placas radiográficas (AGFA) y reactivo quimioluminiscente (SuperSignal West Pico, Thermo Scientific y SuperSignal West Femto, Thermo Scientific) en cuarto

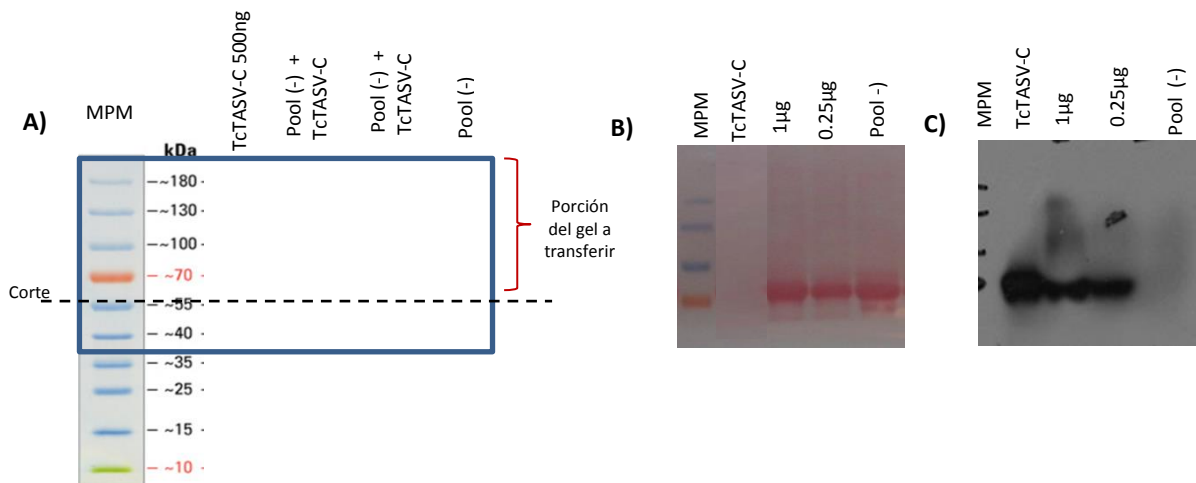


Figura MyM 4 Estandarización de la técnica de W-B para la detección de TcTASV-C en sueros de perros. A) Esquema de la corrida y corte del gel de poliacrilamida. B) Membrana transferida teñida con Rojo Ponceau. En las calles del gel transferido se sembró de izquierda a derecha: calle 1: MPM; calle 2: 500ng de TcTASV-C recombinante; calle 3 y 4: dilución 1/20 de pool de sueros sanos contaminados con 1µg y 0.25µg de TcTASV-C, respectivamente; calle 5: pool sin proteína recombinante. La banda mayoritaria que se observa con rojo probablemente corresponde a seroalbúmina canina. C) Revelado de la membrana en B) por quimioluminiscencia con anticuerpo primario de conejo anti-TcTASV-C.

oscuro. Por otro lado, se revelaron las membranas por fluorescencia utilizando el scanner Odyssey para lo cual se incubaron las mismas durante 1 h con anticuerpo anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón conjugado con cromóforo 800nm (IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG/anti-Mouse IgG (H + L)) o 680nm (IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG/anti-Mouse IgG (H + L)).

En la Figura MyM.4.B y C se muestra uno de los ensayos de estandarización del Western-Blot para detectar TcTASV-C recombinante en sueros de perros utilizando un anticuerpo primario anti-TcTASV-C de conejo. Se muestran, para tres concentraciones de TcTASV-C recombinante en pool de sueros de perros sanos (1µg, 0.25µg y control sin contaminar), la tinción de la membrana

con Rojo Ponceau (Figura MyM.4.B) y el revelado de la membrana con quimioluminiscencia (Figura MyM.4.C). Se observó una elevada intensidad de señal en los pooles contaminados con antígeno recombinante y en el control de antígeno y no se observó banda en el pool negativo. En la Figura MyM.4.C, se muestra el revelado por quimioluminiscencia de la membrana sembrada con el pool de sueros negativos contaminado con distintas cantidades de TcTASV-C recombinante.

MyM.III. Sección 3. B. Captura de TcTASV-C a partir de sueros de perros infectados con T. cruzi mediante columna de afinidad

MyM.III.3.B.1. Purificación de IgGs anti-TcTASV-C

En primera instancia se hizo una purificación de IgGs a partir de un suero de conejo y dos sueros de ratón inmunizados con distintas fusiones de TcTASV-C, utilizando el Melon Gel Purification kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sueros se diluyeron 1/10 en Buffer de Purificación (200 µL de volumen final). Las diluciones de suero se agregaron a las columnas y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente con rotación. Se centrifugaron las columnas a 3000g durante un minuto para obtener los anticuerpos purificados en un microtubo colector. Sólo para el caso del suero de conejo se obtuvo la banda deseada correspondiente a las cadenas pesadas de IgGs (~55KDa). Dado el volumen de suero de conejo inmunizado que se disponía, se decidió trabajar con el suero de esa especie.

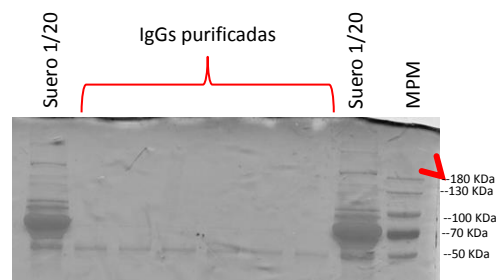


Figura MyM 5 SDS-PAGE de purificaciones con Melon Gel Purification kit para purificación de IgGs a partir de sueros. Calles de 2-7: IgGs purificadas a partir de suero de conejo inmunizado con TcTASV-C. Calles 1 y 8: suero dilución 1/20 sin purificar. Calle 9: MPM.

A continuación, se realizaron varias purificaciones de manera simultánea con el objetivo de obtener un volumen final de IgGs purificadas de 3 mL. Las purificaciones se chequearon mediante SDS-PAGE sembrando 4 μ L de cada purificación, obteniéndose una banda con el peso molecular esperado para las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (~55KDa) (Figura MyM.5). Se realizó un pool de las IgGs purificadas que fue cuantificado por Picodrop y método de Bradford.

MyM.III.3.B.2. Armado de la columna SulfoLink™ (Thermo)

a) Reducción de las IgGs

Para la reducción de las IgGs purificadas se agregó a 2mL de muestra, 3.7mg de EDTA-Na, 4.3mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 24mg de NaH_2PO_4 . A continuación, se agregaron 2 viales de 2-MEA del kit (1mL a cada vial) y se incubó a 37°C durante 110 minutos para permitir que las proteínas se reduzcan. Luego de equilibrar la columna Desalt Spin, se agregaron los 2mL de inmunoglobulinas reducidas y 0.2mL de Coupling Buffer. Se centrifugó la columna durante 1 minuto a 1000g para colectar la muestra reducida y libre de sales. A continuación, se agregaron a la muestra 2mL de Coupling Buffer y se guardó a -20°C. Se le agregó 1mL de Coupling Buffer a la columna y se guardó a 4°C.

b) Coupling de las IgGs reducidas a la columna SulfoLink™

Se resuspendió la resina de la columna y se centrifugó para eliminar el buffer de guardado. Luego de lavar dos veces con 2mL de Coupling Buffer, se agregaron los 4mL de proteínas reducidas y se puso a rotar 30 minutos a temperatura ambiente. La columna fue incubada durante 1 hora sin rotación a temperatura ambiente. Se centrifugó y se colectó el percolado para determinar luego la eficiencia de coupling. Se lavó 4 veces con 2mL de Wash Buffer y 2 veces con 2mL de Coupling Buffer.

A continuación, se bloqueó la columna con 2mL de 50mM L-cisteína-HCl (17.8mg en 2mL de Coupling Buffer). Se incubó la columna con rotación a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego 30 minutos sin rotación. Se lavó columna con 2mL de PBS BupH (kit) degaseado 3 veces. Se conservó a 4°C la columna hasta el día siguiente con 4mL de PBS BupH.

MyM.III.3.B.3. Purificación de afinidad de TcTASV-C a partir de sueros de perros infectados

Se realizaron dos purificaciones: una a partir de un pool de sueros de perros infectados y otra a partir de un pool de sueros normales de perros como control. Se prepararon 3mL de dilución de los pools de sueros de perros 1/20 en PBS BupH.

Luego de equilibrar la columna a temperatura ambiente se centrifugó 1 minuto a 1000g para eliminar la solución de guardado. Se agregaron 6mL de PBS y se dejaron fluir a través de la columna. Se agregó el pool de sueros diluido y se puso a rotar la columna 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 minuto a 1000g y sin cambiar el tubo de colección se agregó 1mL de PBS para volver a centrifugar. Se conservó el percolado. Se lavó 4 veces con 2mL de PBS. Para eluir, se agregó 2mL de 0.1M glicina-HCl pH=3 a la columna y se colectó el eluído por centrifugación en un tubo conteniendo 100µl de 1M Tris-HCl pH=8.8 (Buffer de Neutralización). Se repitió 3 veces más. Por último, se lavó dos veces la columna con 4mL de PBS dejando que la solución fluya a través de la columna. Para preservar la columna se agregó PBS azida y se guardó a 4°C.

MyM.III.3.B.4. Evaluación de las purificaciones mediante Western-Blot

Para evaluar la purificación de TcTASV-C partir de los sueros de perros infectados se realizaron dos geles de poliacrilamida 7.5% en los que se sembraron las siguientes muestras: pool de sueros infectados/sanos 1/20, el percolado de las columnas Sulfolink™-anti-TcTASV-C, dos lavados, los eluídos, el marcador de peso molecular y 100ng de TcTASV-C_{GST} recombinante como control. La transferencia, bloqueo y revelado por quimioluminiscencia se realizó según lo especificado anteriormente. Se utilizó un suero de conejo inmunizado con TcTASV-C_{GST} 1/200 como anticuerpo primario.

Bibliografía

- Affranchino J, Ibañez C, Luquetti A, Rassi A, Reyes M, Macina R, Aslund L, Pettersson U & Frasch A (1989) Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* 34:221-228.
- Aguirre S, Silber AM, Brito MEF, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS, Ribone E & Marcipar S (2006) Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *Journal of Clinical Microbiology* 44:3768-74.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A & Noya O (2015) Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 110:377-386.
- De Alencar BCG, Persechini PM, Haolla FA, De Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, Machado A V., Gazzinelli RT, Bruna-Romero O & Rodrigues MM (2009) Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infection and Immunity* 77:4383-4395.
- Alonso-Padilla J, Gallego M, Schijman AG & Gascon J (2017) Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 17:699-710.
- Aphasizhev R & Aphasizheva I (2012) Uridine insertion/deletion editing in Trypanosomes: a playground for RNA-guided information transfer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 76:211-220.
- Araujo FG (1986) Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. *Infection and Immunity* 53:179-185.
- Araújo FMG, Bahia MT, Magalhaes NM, Martins-Filho OA, Veloso VM, Carneiro CM, Tafuri WL & Lana M (2002) Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Tropica* 81:21-31.
- Balouz V, Agüero F & Buscaglia CA (2017) Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Adv Parasitol.* 97:doi:10.1016/bs.apar.2016.10.001.
- Balouz V, De Cámara MLM, Cánepa GE, Carmona SJ, Volcovich R, Gonzalez N, Altcheh J, Agüero F &

- Buscaglia CA (2015) Mapping antigenic motifs in the trypomastigote small surface antigen from *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Vaccine Immunology* 22:304-312.
- Barcán L, Lunaó C, Clara L, Sinagra A, Valledor A, De Rissioí AM, Gadanoá A, García MM, de Santibañes E & Riarte A (2005) Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transplantation* 11:1112-6.
- Barroso PA, Marco JD, Locatelli FM, Cardozo RM, Hoyos CL, Mora MC, García Bustos MF, López-Quiroga I, Mimori T, Gentile AG, Barrio AB, Korenaga M, Hashiguchi Y & Basombrío MA (2015) Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: possible reservoirs and vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93:334-339.
- Barroso PA, Nevot MC, Hoyos CL, Locatelli FM, Lauthier JJ, Ruybal P, Cardozo RM, Russo PD, Vassiliades CN, Mora MC, Estévez JO, Hashiguchi Y, Korenaga M, Basombrío MA & Marco JD (2015) Genetic and clinical characterization of canine leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in northeastern Argentina. *Acta Tropica* 150:218-223.
- Bartholomeu DC, Cerqueira GC, Leão AC a, DaRocha WD, Pais FS, Macedo C, Djikeng A, Teixeira SMR & El-Sayed NM (2009) Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research* 37:3407-17.
- Bautista-López NL, Ndao M, Vasquez Camargo F, Nara T, Annoura T, Hardie D, Borchers C & Jardim A (2017) Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. *Journal of Clinical Microbiology* 55:744-758.
- Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Khan M, Acosta Rodríguez E V., Montes CL, Amezcua Vesely MC, Toellner KM, Mohr E, Taylor D, Cunningham AF & Gruppi A (2011) *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology* 132:123-133.
- Bernabó G (2008) Caracterización de TcYASP-C, una nueva subfamilia de proteínas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Fac. Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Trabajo de investigación realizado en el Instituto de .
- Bernabó G, Levy G, Ziliani M, Caeiro LD, Sánchez DO & Tekiel V (2013) TcTASV-C, a protein family in *Trypanosoma cruzi* that is predominantly trypomastigote-stage specific and secreted to the medium. *Plos One* 8:1-10.
- Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar AF, Monnerat S, Cruz Mata I, Picado de Puig A, Curto M de

- los Á, Kubota Y, Wehrendt DP, Pavia P, Mori Y, Puerta C, Ndung'u JM & Schijman AG (2017) Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005779.
- Bhattacharyya T, Brooks J, Yeo M, Carrasco HJ, Lewis MD, Llewellyn MS & Miles MA (2010) Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *International Journal for Parasitology* 40:921-928.
- Bhattacharyya T, Falconar AK, Luquetti AO, Costales J a, Grijalva MJ, Lewis MD, Messenger LA, Tran TT, Ramirez J-D, Guhl F, Carrasco HJ, Diosque P, Garcia L, Litvinov S V & Miles MA (2014) Development of peptide-based lineage-specific serology for chronic Chagas disease: geographical and clinical distribution of epitope recognition. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8:e2892.
- Bilate AMB & Cunha-Neto E (2008) Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 50:67-74.
- Bisio M, Seidenstein ME, Burgos JM, Ballering G, Risso M, Pontoriero R, Moreau M, Altchek J, Leguizamón MS, Freilij H, Marceillac M & Schijman AG (2011) Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105:543-549.
- Bontempi IA, Bizai ML, Ortiz S, Manattini S, Fabbro D, Solari A & Diez C (2016) Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. *Infection, Genetics and Evolution* 43:123-129.
- Brenière FS, Waleckx E & Barnabé C (2016) Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10:1-19.
- Brisse S, Verhoef J & Tibayrenc M (2001) Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology* 31:1218-1226.
- Brossas JY, Gulin JEN, Bisio MMC, Chapelle M, Marinach-Patrice C, Bordessoules M, Palazon Ruiz G, Vion J, Paris L, Altchek J & Mazier D (2017) Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. *PLoS One* 12:e0185504.
- Brunoro GVF, Almeida Caminha M, Teixeira da Silva Ferreira A, da Veiga Leprevost F, Costa

- Carvalho P, Perales J, Hemmi Valente R & Menna-Barreto RFS (2015) Reevaluating the Trypanosoma cruzi proteomic map: the shotgun description of bloodstream trypomastigotes. *Journal of Proteomics* 115:58-65.
- Bryan MA, Guyach SE & Norris KA (2010) Specific humoral immunity versus polyclonal B Cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4.
- Buscaglia CA, Alfonso J, Competella O & Frasch ACC (1999) Tandem amino acid repeats from Trypanosoma cruzi shed antigens increase the half-life of proteins in blood. *Blood* 93:2025-2032.
- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch ACC & Di Noia JM (2006) Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology* 4:229-236.
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A & Umezawa ES (2007) Evaluation of serological tests to identify Trypanosoma cruzi infection in humans and determine cross-reactivity with Trypanosoma rangeli and Leishmania spp. *Clinical and Vaccine Immunology* 14:1045-1049.
- Caeiro L, Sánchez D & Tekiel V (2015) Las proteínas de superficie TcTASV-C de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi se secretan mayoritariamente en vesículas pequeñas. XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Museo Argentino de Ciencias Naturales «Bernardino Rivadavia», Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Cai CW, Blase JR, Zhang X, Eickhoff CS & Hoft DF (2016) Th17 cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite Trypanosoma cruzi. *PLoS Pathogens* 12:1-23.
- Cámara M de los M, Canepa GE, Lantos AB, Balouz V, Yu H, Chen X, Competella O, Mucci J & Buscaglia CA (2017) The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates Trypanosoma cruzi infectivity and differentiation. *PLoS Neglected Tropical Diseases* Aug:1-21.
- Camussone C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM & Marcipar IS (2009) Comparison of recombinant Trypanosoma cruzi peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 16:899-905.
- Cánepa GE, Degese MS, Budu A, Garcia CRS & Buscaglia CA (2012) Involvement of TSSA (Trypomastigote Small Surface Antigen) in Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. *Biochemical Journal* 444:211-218.
- Cardinal MV, Castañera M, Lauricella M, Cecere M, Ceballos L, Vazquez-Prokopec G, Kitron U &

- Gürtler RE (2006) A prospective study of the effects of sustained vector surveillance following community-wide insecticide application on *Trypanosoma cruzi* infection of dogs and cats in rural northwestern Argentina. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75:753-761.
- Cardinal M V., Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati LA, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE & Schijman AG (2008) Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *International Journal for Parasitology* 38:1533-1543.
- Cardinal MV, Orozco MM, Enriquez GF, Ceballos LA, Gaspe MS, Alvarado-Otegui JA, Gurevitz JM, Kitron U & Gürtler RE (2014) Heterogeneities in the ecoepidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection in rural communities of the Argentinean Chaco. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90:1063-1073.
- Cardinal M V., Reithinger R & Gürtler RE (2006) Use of an immunochromatographic dipstick test for rapid detection of *Trypanosoma cruzi* in sera from animal reservoir hosts. *Journal of Clinical Microbiology* 44:3005-3007.
- Cardoso MS, Reis-Cunha JL & Bartholomeu DC (2016) Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in Immunology* 6:1-15.
- Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO & Buekens P (2015) Congenital Chagas disease: An update. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 110:363-368.
- Carmona SJ, Nielsen M, Schafer-Nielsen C, Mucci J, Altcheh J, Balouz V, Tekiel V, Frascch AC, Campetella O, Buscaglia CA & Agüero F (2015) Towards high-throughput immunomics for infectious diseases: use of next-generation peptide microarrays for rapid discovery and mapping of antigenic determinants. *Molecular & Cellular Proteomics* 14:1871-1884.
- Castañera M, Lauricella M, Chuit R & Gürtler RE (1998) Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92:671-683.
- Castro A, Luquetti A, Rassi A, Rassi G, Chiari E & Galvão L (2002) Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 88:894-900.
- Ceballos LA, Ordoñez-Krasnowski P, Lanati LA, Gürtler RE, Stariolo R & Kitron U (2009) Strong host-feeding preferences of the vector *Triatoma infestans* modified by vector density: implications for the epidemiology of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3:1-12.

- Cimino RO, Diosque P, Lopez Quiroga IR, Gil JF & Nasser JR (2012) Evaluación inmunoenzimática del antígeno recombinante SAPA en perros infectados naturalmente por *Trypanosoma cruzi*. *Revista Argentina de Microbiología* 44:1-5.
- Cimino RO, Monje Rumi M, Ragone P, Lauthier JJ, Alberti D' Amato A, Lopez Quiroga IR, Gil JF, Cajal SP, Acosta N, Juarez M, Krolewiecki A, Orellana V, Zacca R, Marcipar I, Diosque P & Nasser JR (2011) Immuno-enzymatic evaluation of the recombinant TSSA-II protein of *Trypanosoma cruzi* in dogs and human sera: a tool for epidemiological studies. *Parasitology* 138:1-8.
- Committee on Animals as Monitors of Environmental, Hazards B on ES and & Toxicology, National Research Council US of A (1991) *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*.
- Cooley G, Etheridgel RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, Minning T, Haney M, Postan M, Laucella S & Tarleton RL (2008) High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2.
- Coura JR, Carlos J & Dias P (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:31-40.
- Crowther JR (2009) *The ELISA Guidebook*. Humana Press, Hatfield, Hertfordshire, UK.
- Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM & Kalil J (2009) Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:252-258.
- Diez CN, Manattini S, Zanuttini JC, Bottasso O & Marcipar I (2008) Short Report : The value of molecular studies for the diagnosis of ongenital Chagas disease in northeastern Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78:624-627.
- Diosque P, Padilla AM, Cimino RO, Cardozo RM, Sanchez Negrette O, Marco JD, Zacca R, Meza C, Juarez A, Rojo H, Rey R, Corrales RM & Nasser JR (2004) Chagas disease in rural areas of Chaco Province, Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs and vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71:590-593.
- Diosque P, Tomasini N, Lauthier JJ, Messenger LA, Monje Rumi MM, Ragone PG, Alberti-D'Amato AM, Pérez Brandán C, Barnabé C, Tibayrenc M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA & Yeo M (2014) Optimized Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8.
- DosReis GA (2011) Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of

- Chagas disease. *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44:84-90.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H & Schijman AG (2009) Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3:e419.
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz N a, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I & Schijman AG (2013) Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7:e2000.
- Durante I, La Spina P, Carmona SJ, Agüero F & Buscaglia CA (2017) High-resolution profiling of linear B-cell epitopes from mucin-associated surface proteins (MASPs) of *Trypanosoma cruzi* during human infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005986.
- El-Sayed N, Myler P, Bartholomeu D, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A, Ghedin E, Worthey E, Delcher A, Blandin G, Westenberger S, Caler E, Cerqueira G, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenz D, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson A, Sisk E, Tammi M, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward P, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser C, Stuart K & Andersson B (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* July 15.:409-15.
- Eloy LJ & Lucheis SB (2012) Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. *ISRN Veterinary Science* 2012:1-6.
- Enriquez GF, Bua J, Orozco MM, Wirth S, Schijman AG, Gürtler RE & Cardinal M V. (2014) High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. *Infection, Genetics and Evolution* 25:36-43.
- Erdmann H, Steeg C, Koch-Nolte F, Fleischer B & Jacobs T (2009) Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cellular Microbiology* 11:1600-1611.
- Escribà JM, Ponce E, Romero A de D, Viñas PA, Marchiol A, Bassets G, Palma PP, Lima MA, Zúniga C & Ponce C (2009) Treatment and seroconversion in a cohort of children suffering from recent

- chronic Chagas infection in Yoro, Honduras. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:986-991.
- Fabbro De Suasnábar D, Arias E, Streiger M, Piacenza M, Ingaramo M, Del Barco M & Amicone N (2000) Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 42:99-109.
- Fabbro DL, Olivera V, Bizai ML, Denner S, Diez C, Mancipar I, Streiger M, Arias E, del Barco M, Mendicino D & Bottasso O (2011) Humoral immune response against P2 β from *Trypanosoma cruzi* in persons with chronic Chagas disease: its relationship with treatment against parasites and myocardial damage. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84:575-580.
- Fernández-Villegas A, Pinazo MJ, Marañón C, Thomas MC, Posada E, Carrilero B, Segovia M, Gascon J & López MC (2011) Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC Infectious Diseases* 11:2-8.
- Fernandez A, Nunes M, Clark E, Samuels A, Menacho S, Gomez J, Bozo Gutierrez R, Crawford T, Gilman R & Bern C (2015) Electrocardiographic and echocardiographic abnormalities in residents of rural Bolivian communities hyperendemic for Chagas disease. *Global Heart* 28:1304-1314.
- Flores-Chavez M, Bosseno M, Bastrenta B & Dalenz JA (2006) Polymerase Chain Reaction detection and serologic follow-up after treatment with benznidazole in bolivian children infected with a natural mixture of *Trypanosoma cruzi* I and II. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75:497-501.
- Florida-Yapur N, Monje Rumi M, Ragone P, Lauthier JJ, Tomasini N, Alberti D'Amato A, Diosque P, Cimino R, Marco JD, Barroso P, Sanchez DO, Nasser JR & Tekiel V (2016) The TcTASV proteins are novel promising antigens to detect active *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Parasitology*:1-8.
- Florida-Yapur N, Vega-Benedetti F, Monje Rumi M, Ragone P, Lauthier J, Tomasini N, Alberti D'Amato A, Lopez Quiroga I, Diosque P, Mancipar I, Nasser J & Cimino R (2014) Evaluation of recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* to diagnose infection in naturally infected dogs from Chaco region, Argentina. *Parasite Immunology* 36:694-699.
- Frasch ACC (2000) Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 16:282-286.
- Freire-De-Lima L, Fonseca LM, Oeltmann T, Mendonça-Previato L & Previato JO (2015) The trans-

- sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology* 25:1142-1149.
- Freitas LM, dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TAO, Rodrigues TS, Gazzinelli RT, Teixeira SMR, Fujiwara RT & Bartholomeu DC (2011) Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS ONE* 6.
- Galvão LM da C, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA & Andrade ALSS (2003) PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *Journal of Clinical Microbiology* 41:5066-5070.
- García EA, Ziliani M, Agüero F, Bernabó G, Sánchez DO & Tekiel V (2010) TcTASV: a novel protein family in *Trypanosoma cruzi* identified from a subtractive trypomastigote cDNA library. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4:6.
- García EA, Ziliani M, Iglesias AA, Sánchez DO & Tekiel V (2011) Patrón de expresión y localización celular de la familia TcTASV de *Trypanosoma cruzi*. IX Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, Mar del Plata, Argentina.
- Gazzinelli RT, Galvao LMC, Krautz G, Lima PCA, Cancado J-R, Scharfstein J & Krettli AU (1993) Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas' Disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49:625-635.
- Gil J, Cimino R, Lopez Quiroga I, Cajal S, Acosta N, Juarez M, Zacca R, Orellana V, Krolewiecki A, Diosque P & Nasser J (2011) Reactividad del antígeno GST-SAPA de *Trypanosoma cruzi* frente a sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. *Medicina* 71:113-119.
- Gourbière S, Dorn P, Tripet F & Dumonteil E (2012) Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity* 10871:190-202.
- Granjon E, Dichtel-Danjoy M-L, Saba E, Sabino E, Campos de Oliveira L & Zrein M (2016) Development of a novel multiplex immunoassay Multi-cruzi for the serological confirmation of Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10:1-15.
- Gürtler RE (2009) Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:52-59.
- Gürtler RE & Cardinal M V (2015) Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 151:32-50.
- Gürtler RE, Ceballos LA, Ordoñez-Krasnowski P, Lanati LA, Stariolo R & Kitron U (2009) Strong host-

- feeding preferences of the vector *Triatoma infestans* modified by vector density: implications for the epidemiology of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3:1-12.
- Gurtler R, Cecere M, Lauricella M, Cardinal M, Kitron U & Cohen J (2007) Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134:69-82.
- Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal M V., Kitron U & Cohen JE (2007) Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134:69-82.
- Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Petersen R, Chuit R, Segura EL & Cohen JE (2005) Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73:95-103.
- Gürtler RE, Chuit R, Cecere MC, Castañera MB, Cohen JE & Segura EL (1998) Household prevalence of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in three rural villages in northwest Argentina: environmental, demographic and entomologic associations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59:741-749.
- Gürtler RE, Kravetz FO, Petersen RM, Lauricella MA & Wisnivesky-Colli C (1990) The prevalence of *Trypanosoma cruzi* and the demography of dog populations after insecticidal spraying of houses: a predictive model. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 84:313-323.
- Hoyos CL, Cajal SP, Juarez M, Marco JD, Alberti D'Amato AM, Cayo M, Torrejón I, Cimino RO, Diosque P, Krolewiecki AJ, Nasser JR & Gil JF (2016) Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis and *Trypanosoma cruzi* infection in the northwestern Argentina. *BioMed Research International* 2016:Article ID 6456031, 8 pages.
- Iborra-Bendicho MA, Albert-Hernández M, Márquez-Contreras C & Segovia-Hernández M (2012) ARCHITECT Chagas ®: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30:463-465.
- Juiz NA, Solana E, Acevedo GR, Benatar AF, Ramirez JC, Almeida da Costa P, Macedo AM, Longhi SA & Schijman AG (2017) Different genotypes of *Trypanosoma cruzi* produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005436.
- Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM & Gazzinelli RT (2010) The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and

- beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12:e29.
- Keating SM, Kassanje R, Lebedeva M, Facente SN, MacArthur JC, Grebe E, Murphy G, Welte A, Martin JN, Little S, Price MA, Kallas EG, Busch MP & Pilcher CD (2016) Performance of the Bio-Rad Geenius™ HIV1/2 supplemental assay in detecting 'recent' HIV infection and calculating population incidence. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 73:581-588.
- Kosack CS & Nick S (2016) Evaluation of two rapid screening assays for detecting hepatitis C antibodies in resource-constrained settings. *Tropical Medicine and International Health* 21:603-609.
- Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR & Goldenberg S (1992) Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46:427-34.
- Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, Radhakrishna S, Leiby D, Herron R, Mone T, Hunter R, Kuehnert M & Chagas Disease in Transplant Recipients Investigation Team and the (2009) Transmission of *Trypanosoma cruzi* by Heart Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 48:1534-1540.
- Lardeux F, Torrico G & Aliaga C (2016) Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 111:501-504.
- Laucella SA, Pérez Mazliah D, Bertocchi G, Alvarez MG, Cooley G, Viotti R, Albareda MC, Lococo B, Postan M, Armenti A & Tarleton RL (2009) Changes in *Trypanosoma cruzi* – specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. *Clinical Infectious Diseases* 49:1675-1684.
- Lauricella MA, Castañera MB, Gürtler RE & Segura EL (1998) Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) infection in naturally infected dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93:501-507.
- Lauricella MA, Riarte A, Lazzari JO, Barousse A & Segura EL (1986) Enfermedad de Chagas en perros experimentalmente infectados con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 46:195-200.
- Lauricella MA, Wisnivesky-Colli C, Gürtler RE, Petersen R, Bujas M & Segura EL (1993) Standardization of serological tests for detecting anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88:413-417.

- Li Y, Shah-Simpson S, Okrah K, Belew AT, Choi J, Caradonna KL, Padmanabhan P, Ndegwa DM, Temanni MR, Corrada Bravo H, El-Sayed NM & Burleigh BA (2016) Transcriptome remodeling in *Trypanosoma cruzi* and human cells during intracellular infection. *PLoS Pathogens* 12:1-30.
- Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR & de Messias-Reason IJ (2017) The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology* 8:1-14.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón, Javier A. Carranza JC, Pinto CM, Buck GA, Camargo EP & Teixeira MMG (2015) Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica* Nov:166-177.
- Linnet K, Bossuyt PMM, Moons KGM & Reitsma JBR (2012) Quantifying the accuracy of a diagnostic test or marker. *Clinical Chemistry* 58:1292-1301.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL & Darnell J (2005) *Biología Celular y Molecular*. Ed. Panamericana.
- Machado CM, Martins TC, Colturato I, Leite MS, Simione AJ, De Souza MP, Mauad MA & Colturato VR (2009) Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 51:309-324.
- Mallimaci MC, Sosa-Estani S, Russomando G, Sanchez Z, Sijvarger C, Alvarez IM, Barrionuevo L, Lopez C & Segura EL (2010) Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection, using shed acute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82:55-9.
- Marcet P, Duffy T, Cardinal M, Burgos J, Lauricella M, Levin M, Kitron U, Gürtler R & Schijman AG (2006) PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology* 132:57-65.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC V, Veludo HH, Silva FMDA, Campaner M, Paiva F, Nunes VLB & Texeira MG (2009) A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136:641-655.
- Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, Heiges M, Craven SH, Rosenberg CS, Collins MH, Sette A, Postan M & Tarleton RL (2006) CD8+ T-cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathogens* 2:0731-0740.

- Medeiros NI, Gomes JAS, Correa-oliveira R, Horizonte B, Gerais M, Horizonte B & Horizonte B (2017) Synergic and antagonistic relationship between MMP-2 and MMP-9 with fibrosis and inflammation in Chagas' cardiomyopathy. *Parasite Immunology* Aug; 39.
- Menezes-Souza D, Mendes TA de O, Gomes M de S, Bartholomeu DC & Fujiwara RT (2015) Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9:1-11.
- Meza SKL, Kaneshima EN, de Oliveira Silva S, Gabriel M, Marques de Araújo S, Gomes ML, Monteiro WM, Barbosa M das GV & de Ornelas Toledo MJ (2014) Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Experimental Parasitology* 146:34-42.
- Mitelman JE, Descalzo A, Gimenez L, Pesce R & Villanueva H. (2012) Consensus Statement on Chagas-Mazza Disease. *Revista Argentina de Cardiología* 79:1-20.
- Modolo-Picka CM, Meira DA, de Carvalho TB, Peresi E & Marcondes-Machado J (2007) Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11:226-233.
- Monje-Rumi MM, Pérez Brandán C, Ragone P, Tomasini N, Lauthier JJ, Alberti D' Amato A, Cimino RO, Orellana V, Basombrío MA & Diosque P (2015) *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. *Infection, Genetics and Evolution* 29:53-59.
- Monje Rumi MM, Pérez Brandán C, Gil JF, Alberti D'Amato A, Ragone PG, Lauthier JJ, Tomasini N, Cimino RO, Orellana V, Lacunza CD, Nasser JR, Basombrío MA & Diosque P (2013) Benzimidazole treatment in chronic children infected with *Trypanosoma cruzi*: serological and molecular follow-up of patients and identification of Discrete Typing Units. *Acta Tropica* 128:130-136.
- Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruendling AP, dos Reis D, Gomes ML, Marques de Araújo S, Bahia MT, Costa Magalhaes LK, de Oliveira Guerra JA, Silveira H, de Ornelas Toledo MJ & Vale Barbosa M das G (2013) *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7:1-9.
- Moretti E, Castro I, Franceschi C & Basso B (2010) Chagas disease: serological and electrocardiographic studies in Wichi and Creole communities of Misión Nueva Pompeya,

- Chaco, Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 105:621-626.
- Morillo C, Marin-Neto J, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ & Yusuf S (2015) Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 373:1295-1306.
- Mucci J, Carmona SJ, Volcovich R, Altchek J, Bracamonte E, Marco JD, Nielsen M, Buscaglia CA & Agüero F (2017) Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005972.
- Mucci J, Lantos AB, Buscaglia CA, Leguizamón MS & Campetella O (2017) The Trypanosoma cruzi Surface, a Nanoscale Patchwork Quilt. *Trends in Parasitology* 33:102-112.
- Nardy AFFR, Freire-de-Lima CG, Pérez AR & Morrot A (2016) Role of Trypanosoma cruzi Trans-sialidase on the escape from host immune surveillance. *Frontiers in Microbiology* 7:1-9.
- Di Noia JM, Buscaglia C a, De Marchi CR, Almeida IC & Frasch ACC (2002) A Trypanosoma cruzi small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *The Journal of Experimental Medicine* 195:401-13.
- de Oliveira MT, Branquinho RT, Alessio GD, Mello CGC, De-Paiva NCN, Carneiro CM, de Ornelas Toledo MJ, Reis AB, Filho OAM & de Lana M (2017) TcI, TcII and TcVI Trypanosoma cruzi samples from Chagas disease patients with distinct clinical forms and critical analysis of in vitro and in vivo behavior, response to treatment and infection evolution in murine model. *Acta Tropica* 167:108-120.
- Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff L V., Del Pozo A, Sands A, Vercauteren G & Sabino EC (2009) WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion* 49:1076-1082.
- Pechenik JA (2005) *Biology of the invertebrates*.
- Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, Pinazo MJ, Moriana S, Gold S, Pereiro A, Navarro M, Torrico F, Bottazzi ME & Hotez PJ (2016) The BENEFIT Trial: Where do we go from here? *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10:2-5.
- Pereira-Chioccola VL, Fragata-Filho AA, De Aparecida Levy MA, Rodrigues MM & Schenkman S (2003) Enzyme-Linked Immunoassay using recombinant trans-sialidase of Trypanosoma cruzi can be employed for monitoring of patients with Chagas' disease after drug treatment. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:826-830.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo a M, Franco RM, Dias VL & Passos L a (2009) Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot* 72:441-446.

- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR & Radi R (2008) Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochemical Journal* 410:359-68.
- Pinazo M-J, Cañas E, Elizalde JI, García M, Gascón J, Gimeno F, Gomez J, Guhl F, Ortiz V, Posada E de J, Puente S, Rezende J, Salas J, Saravia J, Torrico F, Torrus D & Treviño B (2010) Diagnosis, management and treatment of Chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterología y Hepatología*. 33:191-200.
- Pinazo M-J, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman AG, Viotti RJ, Ramsey J m, Ribeiro I, Sosa-Estani S & Gascón J (2014) Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 12:479-496.
- Pinto Dias JC (2007) Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102:11-18.
- Previato JO, Andrade AFB, Pessolani MC V & Mendonca-Previato L (1985) Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Molecular and Biochemical Parasitology* 16:85-96.
- «Programa Nacional de Chagas» (2006) Programa Nacional de Chagas. Síntesis de la Guía de Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes con Enfermedad de Chagas.
- Queiroz RML, Ricart CAO, Machado MO, Bastos IMD, Santana JM de, Sousa MV de, Roepstorff P & Charneau S (2016) Insight into the exoproteome of the tissue-derived trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Chemistry* 4:1-10.
- Ragone PG, Perez Brandán C, Monje Rumi M, Tomasini N, Lauthier JJ, Cimino RO, Uncos A, Ramos F, Alberti D'Amato AM, Basombrío MA & Diosque P (2015) Experimental evidence of biological interactions among different isolates of *Trypanosoma cruzi* from the Chaco Region. *PLoS ONE* 10:1-13.
- Ragone PG, Pérez Brandán C, Padilla AM, Monje Rumi M, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, Tomasini N, Cimino RO, Romero NM, Portelli M, Nasser JR, Basombrío MA & Diosque P (2012) Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. *Acta tropica* 123:196-201.
- Ramirez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-silva E, Juiz N, Pavia P, Peneau J, Marcet P, Cruz-robles D, Valencia E, Crisante GE, Costales JA, Villarroel R, Villarroel S, Bisio M, Parrado R, Espinoza B, Riarte A, Diosque P, Sosa-estani S, Guhl F, Ribeiro I, Aznar C, Schijman AG, Aires B,

- Salta N De, Paz L & Guiana F (2015) Analytical validation of Quantitative Real-Time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas Disease patients. *J. Mol Diagn* 17:605-615.
- Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-neto JA & Restrepo S (2009) Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *Journal of Clinical Microbiology* 47:3945-3951.
- Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E & Cucunubá ZM (2014) First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses and Public Health* 61:477-479.
- Rassi A, Rassi A & Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *The Lancet* 375:1388-1402.
- Ribeiro I, Sevcsik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO, Chang S & Pecoul B (2009) New, improved treatments for Chagas disease: From the R&D pipeline to the patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3:1-6.
- Risso MG, Sartor PA, Burgos JM, Briceño L, Rodríguez EM, Guhl F, Chavez OT, Espinoza B, Monteón VM, Russomando G, Schijman AG, Bottasso OA & Leguizamón MS (2011) Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84:78-84.
- Rizzi M, Florida-Yapur N, Levy G V., Sánchez DO & Tekiel V (2015) Caracterización de TcTASV-B, proteínas de la familia de TcTASV de *Trypanosoma cruzi*. XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Robertson LJ, Devleeschauwer B, Alarcón de Noya B, Noya González O & Torgerson PR (2016) *Trypanosoma cruzi*: time for international recognition as a foodborne parasite. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10:3-8.
- Rodriguez-Morales AJ (2008) Chagas disease: an emerging food-borne entity? *J Infect Developing Countries* 2:149-150.
- Rodriguez G, Sanchez DO & Tekiel VS (2015) Mapeo fino de epitopes B en la familia de proteínas TcTASV-C de *Trypanosoma cruzi*. XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Russomando G, Sánchez Z, Meza G & de Guillen Y (2010) Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 10:705-7.
- Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Samuels AM, Clark EH, Galdos-Cardenas G, Wiegand RE, Ferrufino L, Menacho S, Gil J, Spicer J, Budde J, Levy MZ, Bozo RW, Gilman RH & Bern C (2013) Epidemiology of and impact of insecticide spraying on Chagas disease in communities in the Bolivian Chaco. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7.
- Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, Scollo K, Flórez C, Guzmán-Bracho C, Luquetti AO, Calvo N, Tadokoro K, Saez-Alquezar A, Palma PP, Martin M & Flevaud L (2014) Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *Journal of Clinical Microbiology* 52:2506-2512.
- Sánchez Negrette O, Sánchez Valdéz FJ, Lacunza CD, García Bustos MF, Mora MC, Uncos AD & Basombrío MA (2008) Serological evaluation of specific-antibody levels in patients treated for chronic Chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology* 15:297-302.
- Santamaría AL, De Rissio AM, Riarte A, Garavaglia PA, Bruballa AC, Rodríguez MA, Irazu LE, Ruiz AM & García GA (2013) Use of an enzyme-linked immunosorbent assay that utilizes the Tc13Tul antigen of *Trypanosoma cruzi* to monitor patients after treatment with benznidazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 76:197-205.
- dos Santos SL, Freitas LM, Lobo FP, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA de O, Oliveira ACS, Andrade LO, Chiari É, Gazzinelli RT, Teixeira SMR, Fujiwara RT & Bartholomeu DC (2012) The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6:e1779.
- dos Santos D, Talvani A, da Mata Guedes PM, Machado-Coelho GLL, de Lana M & Bahia MT (2009) *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. *Experimental Parasitology* 121:8-14.
- Sartor PA, Cardinal M V, Orozco MM, Gu RE & Leguizamo MS (2011) Trans-Sialidase neutralizing antibody detection in *Trypanosoma cruzi*-infected domestic reservoirs. *Clinical and Vaccine Immunology* 18:984-989.
- Sartor P, Colaianni I, Cardinal MV, Bua J, Freilij H & Gurtler RE (2017) Improving access to Chagas disease diagnosis and etiologic treatment in remote rural communities of the Argentine Chaco through strengthened primary health care and broad social participation. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11:1-18.
- Schijman AG, Altchek J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ & Freilij H (2003) Aetiological

- treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:441-449.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Leon ZS, Galvão L, Nolder D, Rumi MM, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, de Castro AM, Gonzalez CI, Viana KA, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Chavez OT, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Estani SS, DaSilva A, Britto C, Luquetti A & Ladzins J (2011) International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5:1-13.
- Schmunis G & Yadon Z (2010) Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 115:14-21.
- Sgambatti de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG & Martelli CM (1996) Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348:1407-13.
- Sguassero Y, Cuesta CB, Roberts KN, Hicks E, Comandé D, Ciapponi A & Sosa-Estani S (2015) Course of chronic *Trypanosoma cruzi* infection after treatment based on parasitological and serological tests: a systematic review of follow-up studies. *PLoS ONE* 10:e0139363.
- Da Silveira JF, Umezawa ES & Luquetti AO (2001) Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology* 17:286-291.
- Solari A, Venegas J, Gonzalez E & Vasquez C (1998) Detection and classification of *Trypanosoma cruzi* by DNA hybridization with nonradioactive probes. *Journal of Protozoology* 14:5-6.
- Sosa-Estani S & Segura EL (2006) Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 19:583-587.
- Sosa-Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM & Yampotis C (1998) Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' Disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59:526-529.
- Sosa-Estani S, Viotti R & Segura EL (2009) Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:167-180.
- Souza PEA, Rocha MOC, Menezes CAS, Coelho JS, Chaves ACL, Gollob KJ & Dutra WO (2007) *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas'

- disease. *Infection and Immunity* 75:1886-1894.
- Storino R & Milei J (1994) *Enfermedad de Chagas*. Ed. Mosby.
- Swets J (1996) *Signal detection theory and ROC analysis in psychology and diagnostics: collected papers* (Scientific psychology series).
- Tarleton RL (2015) CD8+ T Cells in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Semin Immunopathol* 2:233-238.
- Tekiel V, Alba-Soto CD, González Cappa SM, Postan M & Sánchez DO (2009) Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library. *Vaccine* 27:1323-32.
- Tekiel V, Caeiro L, Sánchez D & Solana ME (2014) The expression of TcTASV-C, a trypomastigote-specific protein family of *Trypanosoma cruzi*, is upregulated in bloodstream parasites. 13th International Congress of Parasitology (ICOPA), México.
- Tibayrenc M (1998) Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology* 28:85-104.
- Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, Cunha e Silva N, de Almeida Abrahamsohn I, Colli W & Manso Alves MJ (2009) *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection* 11:29-39.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R & da Silveira JF (1999) Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology* 37:1554-60.
- Umezawa ES, Souza AI, Pinedo-Cancino V, Marcondes M, Marcili A, Camargo LM, Camacho AA, Stolf AM & Teixeira MM (2009) TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica* 111:15-20.
- Urbina JA (2010) Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* 115:55-68.
- Villalba R, Fornés G, Alvarez MA, Román J, Rubio V, Fernández M, García JM, Viñals M & Torres A (1992) Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clinical Infectious Diseases* 14:594-5.
- Viotti R, Alarcón De Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F & Gascon J (2014) Towards a paradigm shift in the

- treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58:635-639.
- Viotti R, Vigliano C, Alvarez MG, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, Armenti A, De Rissio AM, Cooley G, Tarleton R & Laucella SA (2011) Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5:e1314.
- Viotti R, Vigliano C, Armenti H & Segura E (1994) Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long-term follow-up. *American Heart Journal* 127:151-162.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez M, Postan M & Armenti A (2006) Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of Internal Medicine* 144:724-734.
- Volta BJ, Russomando G, Bustos PL, Scollo K, Rissio AM De, Sánchez Z, Cardoni RL & Bua J (2015) Diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection: a serologic test using Shed Acute Phase Antigen (SAPA) in mother – child binomial samples. *Acta Tropica* 147:31-37.
- Wendel S (2010) Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control? *Acta Tropica* 115:28-34.
- WHO/TDR Disease Reference Group on Chagas Disease HAT and L (DRG3) 2009–2010 (2012) Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization technical report series:v-xii, 1-100.
- World Health Organization (2007) Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la Enfermedad de Chagas: 17 al 20 de abril de 2005, actualizado en julio de 2007. Buenos Aires, Argentina. Geneva: World Health Organization. :96p.
- World Health Organization (2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *The Weekly Epidemiological Record* 6:33-44.
- Wyllie MP & Ramirez MI (2017) Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain independent process. *Pathog Dis* 75.
- Ziliani M (2014) Caracterización molecular e inmunológica de nuevos genes de *Trypanosoma cruzi*. Tesis del Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología. Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG,

Llewellyn MS, Lages-silva E, Machado CR, Andrade SG & Sturm NR (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* 12:240-253.

Anexo



Colegio de Médicos de la Provincia de Salta

(Decreto Ley N° 327/63)

(1963-2013) "50 Años al Servicio de la Comunidad"

Alvear N° 1310 - (4400) Salta - Tel.: (0387) 4213355 - 1714703 - Fax: (0387) 4714701
Web: www.colmedsa.com.ar - E-mail: info@colmedsa.com.ar

SALTA, 26 MAR 2013



SEÑOR
DIRECTOR DE LA
CÁTEDRA QUÍMICA BIOLÓGICA - FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ENFERMEDADES TROPICALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA - SEDE REGIONAL ORÁN
DR. JULIO RUBEN NASSER
SU DESPACHO

Habiéndose analizado el Protocolo de Investigación denominado: **"TcTASV: Evaluación diagnóstica, aplicación al seguimiento de pacientes tratados y discriminación de linajes de esta nueva familia de proteínas antigénicas de T. cruzi en el marco de la epidemiología chagásica del norte de la provincia de Salta"**, presentado a consideración en fecha 28/02/13 (Registro Interno N° 14.198), nos dirigimos a Ud., a fin de informarle que este Comité de Bioética de acuerdo al reglamento que lo rige, considera que no existen objeciones de orden bioético que formular.

Sin otro particular, saludamos a Ud. muy atentamente.



DR. RAUL MÉNDEZ

DRA. MARTA RAQUEL MARIÓN

DR. OSCAR CORNEJO TORINO

DR. PABLO HORACIO FIGUEROA

DR. FRANCISCO GENOVESE

DR. JOSÉ TOMÁS MUSELI

LIC. HERMOSINDA EGÚEZ DE CAMPOS