Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de Trypanosoma cruzi

Duffy, Tomás

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Duffy, Tomás. (2010). Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Duffy, Tomás. "Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de Trypanosoma cruzi". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Tomás Duffy

Director de Tesis: Dr. Alejandro G. Schijman
Consejero de Estudios: Dr. Jorge Muschietti

Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas
Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
CONICET

Buenos Aires, 10 de Noviembre de 2010

Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*.

Resumen

La infección por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), causante de la enfermedad de Chagas, sigue siendo un importante problema de salud pública en los 21 países endémicos de América, con una prevalencia estimada de 8 millones de personas infectadas. Esta enfermedad muestra un curso clínico variable, desde asintomática hasta fases crónicas con parasitemias bajas, cuya forma más severa es la cardiopatía. En diferentes regiones endémicas los pacientes se encuentran infectados con distintas poblaciones parasitarias que a su vez podrían desempeñar un papel en la patogenia, las formas clínicas y la gravedad de la enfermedad. Para el tratamiento de la enfermedad actualmente se dispone de quimioterapias que son más eficaces en las infecciones recientes que en la población adulta crónica. A su vez, la evaluación de la eficacia de nuevas drogas se encuentra seriamente comprometida dado que el criterio de cura actualmente se basa en la conversión serológica a negativa, lo que puede ocurrir sólo años después del tratamiento, lo que requiere un largo plazo de seguimiento.

En este contexto, nos propusimos desarrollar ensayos de PCR cuantitativa (QPCR) sensibles y precisos para la cuantificación de la carga parasitaria que permitan evaluar tempranamente la eficacia o el fracaso de nuevas drogas tripanocidas, así como monitorear la respuesta al tratamiento con las drogas actuales en casos clínicos.

El otro objetivo de la tesis ha sido el desarrollo de estrategias de PCR sensibles y con distintos grados de resolución para la genotipificación de *T. cruzi*. Estas técnicas permiten tipificar las poblaciones parasitarias directamente a partir de muestras biológicas y por lo tanto establecer asociaciones entre el genotipo del parásito y las formas clínicas de la enfermedad, así como evaluar el rol eco-epidemiológico de las distintas poblaciones parasitarias.

Palabras Clave

Trypanosoma cruzi, PCR, tipificación molecular, cuantificación de *T. cruzi*, muestras biológicas, ensayos clínicos, histotropismo clonal.

Development and application of PCR strategies for genotyping and quantification of *Trypanosoma cruzi*.

Summary

Infection with the parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), which causes Chagas disease, remains a major public health concern in 21 endemic countries of America, with an estimated prevalence of 8 million infected people. Chagas disease shows a variable clinical course, ranging from asymptomatic to chronic stages with low parasitaemias, whose severest form is heart disease. Individuals from different endemic regions are infected with distinct parasite populations that may play a role in pathogenesis, clinical forms and severity of the disease. Current chemotherapies are unsatisfactory since they are more effective in recent infections than in the chronic adult population, and the criterion of cure relies on serological conversion to negative, which may occur only years after treatment, requiring long-term follow-up, hampering novel drug trails.

In this context, we aimed to develop sensitive and accurate quantitative PCR strategies (QPCR) for *T. cruzi* quantification that may allow an early assessment of efficacy or failure of novel drugs in future trials, as well as to follow-up patients under etiological treatment with the currently available chemotherapies.

The second aim of this thesis has been the development of sensitive PCR strategies for genotyping *T. cruzi* populations. These assays allow us to establish relationships between parasite genotypes and clinical forms of the disease, as well as to evaluate the eco-epidemiological role of distinct parasite populations.

Keywords

Trypanosoma cruzi, PCR, molecular typing, quantification of *T. cruzi*, biological samples, drug trials, clonal histotropism.

Me gustaría agradecer a varias personas por su colaboración durante la realización de esta Tesis, tanto a nivel científico como personal.

Principalmente a mi excelente director de Tesis y estupenda persona, Alejandro Schijman. No tengo más que pensamientos y palabras de gratitud y satisfacción para describir nuestro trabajo conjunto. Siempre ha sido justo y honesto, comprensivo, motivador, divertido y paciente. Considero que me ha guiado atenta y sabiamente.

También quisiera agradecer muy especialmente a Mariano Levin, fundador y arquitecto del Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, por su aliento constante e inmensa libertad para trabajar, por ser un ejemplo de investigador apasionado y revolucionario. Gracias y adiós.

A los miembros del Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, por su acompañamiento, ayuda y apoyo.

A los directivos del INGEBI en general, y a Mirta Flawia en particular, por la posibilidad de realizar mi tesis en el instituto y hacerme sentir siempre bienvenido.

A Ana y Luis de la secretaría de FBMC por la eterna paciencia y siempre excelente predisposición para ayudar.

Al gran número de colaboradores que participaron de esta Tesis.

A mi familia que incondicionalmente me han apoyado en todos los aspectos posibles.

A los amigos por las inmensas alegrías que brinda la vida más allá de la ciencia.

Y por supuesto, a Lara. Mi incondicional compañera de vida y principal responsable de mi felicidad diaria sin la cual hubiese sido imposible realizar este o cualquier otro trabajo.

Contenido **Página**

Introducción 1

1. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi* 2

1.1. Clasificación sistemática 2

1.2. Ciclo de Vida de *T. cruzi* 3

1.3. Origen de *T. cruzi* 5

1.4. Estructura Poblacional 7

1.5. Origen de los 6 UTDs 8

1.6. Distribución de los 6 UTDs 11

1.7. Marcadores Moleculares 12

2. Transmisión 15

2.1. Transmisión vectorial 15

2.2. Transmisión connatal 16

2.3. Transmisión oral 17

2.4 Transmisión transfusional 17

2.5. Trasplante de órganos 17

3. La enfermedad de Chagas 18

3.1. Etapas de la infección 18

3.2. La enfermedad connatal 19

3.3. La enfermedad en pacientes inmunosuprimidos 20

3.4. Manifestaciones Clínicas 20

4. Diagnostico de la infección 21

4.1. Diagnóstico Parasitológico 22

4.1.1 Técnicas directas 22

4.1.2 Técnicas indirectas 23

4.2. Diagnóstico Inmunológico 24

4.3. Diagnóstico Molecular 25

5. Antecedentes de las técnicas moleculares desarrolladas en la tesis 27

5.1. PCR Inter-Elementos Repetitivos 27

5.2. PCR en Tiempo Real 28

5.3. Sistema Luminex 29

6. Tratamiento Quimioterapéutico 30

6.1. El tratamiento en distintos escenarios clínicos 31

6.2. Efectos Colaterales 32

6.3. Nuevas Drogas: Inhibidores de la Biosíntesis de Ergoesteroles (IBEs) 32

6.4. Criterio de cura 35

6.5. Criterios de falla terapéutica 36

Objetivos 37

Materiales y Métodos 39

1. Materiales 40

1.1 Soluciones, tampones y medios de cultivo 40

1.1.1 Soluciones generales 40

1.1.2 Solución para preparar bacterias competentes 40

1.1.3 Soluciones para la minipreparación de ADN plasmídico 40

1.1.4 Soluciones de hibridación de membranas con ADN 41

1.1.5 Soluciones Sistema Luminex 41

1.1.6 Tampones generales 41

1.1.7 Medios de cultivo de *E. coli* 41

1.1.8 Medios de cultivo de *T. cruzi* 42

1.2 Reactivos 42

1.2.1 Marcadores de peso molecular de ADN 42

1.2.2 Enzimas 43

1.2.3 Cepa de *E. coli* 43

1.2.4 Plásmidos 43

2. Métodos 45

2.1. Recolección, extracción y conservación de muestras 45

2.1.1. Muestras Humanas 45

2.1.1.1. Sangre periférica 45

2.1.1.2. Tejido 47

2.1.1.3. Líquido cefalorraquídeo 47

2.1.2. Muestras murinas 47

2.1.2.1. Músculo esquelético y cardíaco 47

2.1.2.2. Ganglio y bazo 48

2.1.3. Muestras de heces de triatominos 48

2.1.4. Muestras de cultivos de *T. cruzi* 48

2.1.5. ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos 48

2.2. Reacciones de amplificación por PCR 49

2.2.1. Termocicladores 49

2.2.2. Mezclas de reacción y programas de ciclado 49

2.2.3. Construcción de curvas estándar para QPCR 56

2.2.3.1. Para muestras de sangre periférica 56

2.2.3.2. Para muestras de tejido humano 57

2.2.3.3. Para muestras de tejido murino 57

2.3. Detección de amplicones por Luminex 57

2.3.1. Acoplamiento de las sondas a las microesferas fluorescentes 57

2.3.2. Amplificación de las secuencias de mini-exón por PCR 59

2.3.3. Hibridización de las sondas a los productos de PCR 59

2.3.4. Detección y análisis de los datos 61

2.4. Estudios de electroforesis de ADN 61

2.4.1. Geles de Agarosa 61

2.4.1.1. Identificación de productos de PCR 61

2.4.1.2. Southern Blot 61

2.4.2. Geles de Poliacrilamida 63

2.4.2.1. Perfiles Inter-RE 63

2.4.2.2. Perfiles de Microsatélites 64

2.4.2.3 Haplotipo del gen citocromo oxidasa II 65

2.5. Clonado de ácidos nucleicos 66

2.5.1. Purificación de fragmentos de ADN 66

2.5.2. Ligación a vectores de clonado 67

2.5.3. Preparación de bacterias competentes 67

2.5.4. Transformación de bacterias competentes 68

2.5.5. Selección de colonias recombinantes 69

2.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción 69

2.7. Cuantificación de ADN 69

2.8. Secuenciación de ADN 70

2.9. Alineamiento de secuencias de ácidos nucleicos 70

2.10. Construcción de dendogramas 70

2.10.1. A partir de alineamientos de secuencias de ARNr 70

2.10.2. A partir de perfiles de amplicones Inter-RE 70

Resultados 72

1. Desarrollo de estrategias para la genotipificación de *T. cruzi* 73

1.1 Estrategia para la identificación molecular diferencial de tripanosomátidos 74

1.2 Distinción molecular entre poblaciones de *T. cruzi* portadoras de secuencias satélite de Tipo I y II 75

1.3 Ensayos de genotipificación de *T. cruzi* por PCRs Inter-Elementos Repetitivos 78

1.3.1 Análisis *in silico* de la conservación y representatividad de secuencias repetitivas de *T. cruzi* 79

1.3.2 Análisis de la distribución y estabilidad de SIRE 79

1.3.3 Validación en cepas de laboratorio de distintas UTDs 81

1.3.4 Discriminación entre cepas parasitarias de UTD Tc II y Tc VI por PCR Inter-SIRE-2 84

1.4 Pr1-Pr3: una estrategia altamente sensible para la discriminación entre aislados parasitarios Tc II y Tc VI 85

1.5 Ensayos con sondas para la distinción entre grupos de *T. cruzi* según la secuencia intergénica del mini-exón 89

1.5.1 Ensayo de PCR en tiempo real Taqman multiplex 89

1.5.2 Ensayo con tecnología Luminex 92

1.6 Análisis de la variabilidad genética de Tc I por PCRs Inter-RE 94

1.7 Análisis del perfil genético de poblaciones de *T. cruzi* con microsatélites polimórficos 95

2 Desarrollo de métodos para la cuantificación de *T. cruzi* 97

2.1 QPCR-SG 98

2.1.1 Determinación de la sensibilidad y reproducibilidad de la QPCR-SG-Tc utilizando ADN purificado y muestras de sangre reconstituida 98

2.1.2 Estimación del número relativo de copias de ADN satélite por genoma en las seis UTDs de *T. cruzi* 99

2.1.3 Selección de métodos de extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas 101

2.1.4 Cuantificación de la carga parasitaria por QPCR-SG en muestras clínicas de sangre periférica 102

2.2 QPCR- MTq 103

3. Aplicación de métodos de tipificación molecular y determinación de carga parasitaria en casos clínicos y estudios eco-epidemiológicos 107

3.1 Estudios Clínicos 108

3.1.1 Perfil genético de *T. cruzi* en la transmisión connatal 108

3.1.2 Perfil genético y carga parasitaria de *T. cruzi* en muestras de placenta de madres con enfermedad de Chagas 109

3.1.3 Seguimiento de la respuesta parasitológica al tratamiento etiológico en pacientes pediátricos con enfermedad de Chagas 110

3.1.4 Perfil genético de las poblaciones involucradas en la reactivación chagásica en coinfección por VIH 112

3.1.5 Seguimiento por QPCR-SG de la reactivación parasitológica y la respuesta al tratamiento en pacientes inmunosuprimidos por trasplante cardíaco 115

3. 2 Estudios en Modelo Experimental 117

3.2.1 Análisis de la infectividad de la cepa L16 de *T. cruzi*, una mutante nula para el gen *LYT1* 117

3.2.2 Estudios de histotropismo y virulencia de cepas de *T. cruzi* de distinta UTD 120

3.3 Estudios Eco-epidemiológicos 121

3.3.1 Distinción entre *T. cruzi* y otros tripanosomátidos presentes en heces de triatominos silvestres 122

3.3.2 Determinación de las UTDs de *T. cruzi* presentes en heces de triatominos de región endémica del noroeste Argentino 123

3.3.3 Determinación de las UTDs de *T. cruzi* presentes en heces de triatominos silvestres del sur de Estados Unidos de América 125

Discusión 127

1. Métodos de tipificación de *T. cruzi* 128

1.1 Tipificación en estudios eco-epidemiológicos 128

1.1.1. PCRs convencionales 128

1.1.2. Tipificación por PCR Inter-RE 130

1.1.3. Identificación molecular de tripanosomátidos 131

1.1.4. PCR MTq 132

1.2. Tipificación de muestras clínicas 134

1.2.1. Microsatélites 134

1.2.2. PCR Pr1-Pr3: Discriminación entre Tc II y Tc VI 136

1.3. Ensayos con tecnología Luminex 138

2. Métodos de Cuantificación de *T. cruzi* 140

2.1. Aplicación en modelo experimental 142

2.2. Aplicación en estudios clínicos 143

2.2.1. QPCR Aplicación en estudios clínicos 144

2.2.2. QPCR-MTq 146

Conclusiones 148

Bibliografía 150

Publicaciones originales con resultados de esta tesis 163

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis producida por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. La principal vía de transmisión es a través de las heces de insectos vectores de la subfamilia Triatominae (*Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus*). En la Argentina el principal vector es *Triatoma infestans*, comúnmente denominado ¨vinchuca¨. Es una enfermedad crónica debilitante que afecta la salud y el bienestar de un gran número de seres humanos. Está íntimamente relacionada al desarrollo socio-económico de la población constituyendo la enfermedad parasitaria principal del continente americano y representando uno de los problemas de salud pública más importantes de América Latina. Es endémica en 21 países de América Latina, desde el sur de EEUU (42°N) hasta el norte de la Patagonia (43°S). Tiene una prevalencia del 1,5%, con 8 millones de personas infectadas y 28 millones en riesgo de infección, generando anualmente 12 mil muertes. Su incidencia anual es de 40 mil personas por infección vectorial y 15 mil por transmisión connatal (OMS, 2007). En nuestro país, datos oficiales muestran la existencia de más de 2 millones de personas infectadas de las cuales el 20% se encuentra enferma.

1. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

1.1. Clasificación sistemática

La clasificación sistemática de este parásito es la siguiente:

- Reino: Protozoa
- Phylum: Euglenozoa
- Clase: Kinetoplastida
- Orden Tripanosomatida
- Género: Trypanosoma

Otros esquemas consideran que el Orden es Kinetoplastida y la familia es Trypanosomatidae. Los Kinetoplastida son flagelados con 1 o 2 flagelos que se originan de una abertura conocida como bolsa flagelar, normalmente contienen una estructura

prominente y paraflagelar conocida como cinetoplasto que corresponde a una condensación de DNA localizado en el interior de una única mitocondria que esta ramificada por todo el cuerpo del parásito. Otras estructuras características de estos organismos son organelas especializadas, tipo peroxisomas, conocidos como glicosomas y la presencia de microtúbulos subpeliculares. Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género Trypanosoma es uno de los más importantes por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, *T. gambiensi* y *T. rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño y en animales, como es el caso de *T. brucei, T. equiperdum y T. equinum.*

En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector, el género Trypanosoma se ha dividido en dos grupos. El primero, llamado Stercoraria, incluye los Tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, progresando en el sentido de la porción intestinal con liberación de las formas infectivas con las heces. En este grupo tenemos a *T. cruzi y T. lewisi*. El segundo grupo, llamado Salivaria, incluye tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y llegan a las glándulas salivales, donde las formas infectivas son inoculadas mecánicamente. En este grupo se encuentran: *T. brucei, T. congolense* y *T. rangeli.*

1.2. Ciclo de Vida de *T. cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito unicelular que altera su vida entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado y uno vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético (Fig. 1). En función de la forma general de las células (esférica, piriforme o alargada), la posición relativa entre el núcleo y el cinetoplasto (anterior, lateral o posterior), la manera de salida del flagelo (central o lateral), se definen 3 estadios para los tripanosomatideos (Fig. 1):

• **Epimastigote:** (20 - 40 x 2 µm) forma elongada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo arrastrando la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta

y se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi.* Es también la forma de más fácil cultivo "in vitro".

• **Amastigote:** (2 - 4 µm) forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre; estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero.

• **Tripomastigote:** (20 x 25 µm) forma elongada con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión; este estadio está presente en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico), en cultivo de células y en el espacio intracelular del hospedador vertebrado, carece de capacidad replicativa.

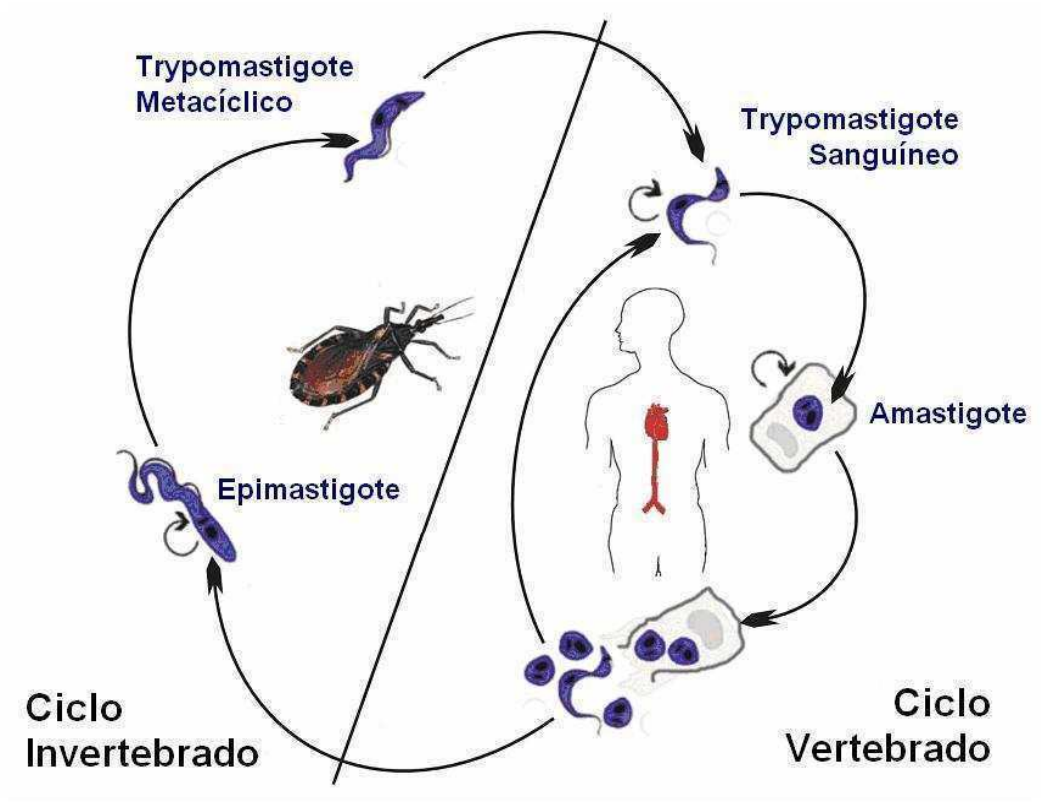

Fig. 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *T. cruzi*.

También se puede encontrar una forma llamada esferomastigota (en el estómago del insecto vector y en determinadas situaciones experimentales in vitro). Obviamente, se pueden observar una serie de formas intermedias.

La infección es transmitida por triatominos a más de 100 diferentes especies de mamíferos salvajes y domésticos. Los triatominos son hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, de aproximadamente 6 cm de largo, que se alimentan de sangre durante la noche. Se infectan al picar a un animal infectado, ingiriendo así al parásito (en su estadío de tripanosomas). Dentro del triatomino y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones antes de ser expulsado en las heces. En el estómago del insecto, los tripanosomas se redondean formando amastigotes, a mitad del intestino se transforman en epimastigotes que se replican mediante fisión binaria y finalmente, aproximadamente 2 semanas después, llegan al recto, donde se convierten en tripanosomas metacíclicos. La infección del mamífero se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando tripanosomas metacíclicos en sus heces y orinas. Los tripanosomas, incapaces de atravesar la piel intacta, entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel (sitio de la mordedura), o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas. Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula, se transforman en tripomastigotes procíclicos, los cuales son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, rompiendo la célula. Los tripomastigotes tiene la habilidad de invadir otras células, dónde se transforman de nuevo en amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino no infectado se alimenta de un animal con tripanosomas circulando.

1.3. Origen de *T. cruzi*

Todos los tripanosomátidos son parásitos, por eso se propone un origen monofilético de una forma parásita ancestral que haya dado origen a los tripanosomas de mamíferos de África, América y Australia, como también otras varias formas parásitas de peces. Esta hipótesis es apoyada por el análisis filogenético de los genes ribosomales 18S (Fig. 2). La aludida correlación entre esos grupos de tripanosomátidos de mamíferos y sus hospedadores se basa en la Teoría de las Placas Tectónicas,

sugiriendo que la forma ancestral del parásito surgió antes de la separación de los continentes en la era Mesozoica (230 millones de años atrás).

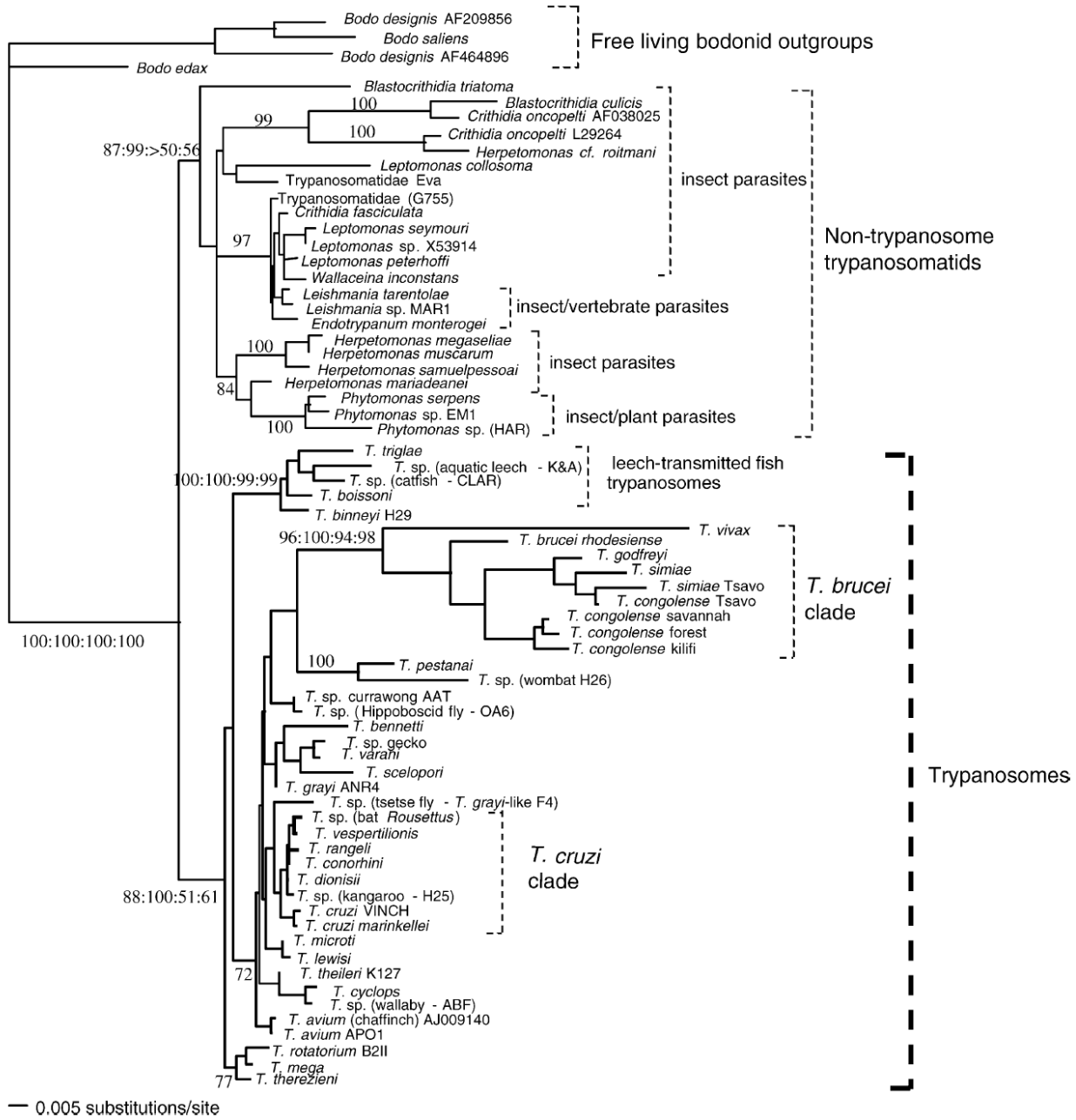

Fig. 2. Árbol de 69 taxones de protozoarios construido por Máxima Verosimilitud (MV) utilizando secuencias del gen ribosomal 18S. Los valores únicos en los nodos corresponden a valores de bootstrap por MV (250 replicas). Los valores múltiples corresponden a: valor de bootstrap por MV, probabilidad posterior Bayesiana, valor de bootstrap por Máxima Parsimonia y valor de bootstrap de Distancia por MV. Tomado de (Maslov y col., 1996).

Posiblemente, el surgimiento de la rama cruzi ocurrió antes de la separación del supercontinente (*Gondwana*) en la era Cenozoica y evolucionaron en los ancestros de los marsupiales, aproximadamente, 40 millones de años atrás. Se defiende que en ese período los ancestrales de los modernos didélfidos americanos (comadrejas) comenzaron su dispersión y los ancestros de *T. cruzi* pasaron a ser transmitidos directamente entre los marsupiales a través de las secreciones de las glándulas anales y/o urinarias. Basados en esa hipótesis, se sugiere una primitiva asociación de este parásito con los marsupiales del género *Didelphis* (Yeo y col., 2005).

1.4. Estructura Poblacional

Muchas evidencias apoyan la existencia de una estructura multiclonal de las poblaciones de *T. cruzi* (Sturm y Campbell, 2010; Tibayrenc y Ayala, 2002; Tibayrenc y col., 1986). El modelo propuesto no implica ausencia absoluta de recombinación genética, sino una frecuencia muy baja que no altera significativamente la propagación uniparental del parásito. Aún más, la recombinación ha sido observada mediante diversas estrategias, como isoenzimas (Bogliolo y col., 1996; Carrasco y col., 1996), RAPDs y estudios de cariotipo (Brisse y col., 2003), análisis de secuencias nucleotídicas (Machado y Ayala, 2001; Sturm y col., 2003) y microsatélites (de Freitas y col., 2006). En particular, en el año 2003 Gaunt y colaboradores (Gaunt y col., 2003) demuestran la capacidad de recombinación de *T. cruzi in vitro* mediante selección artificial de recombinantes resistentes a drogas. Estas experiencias mostraron ausencia de recombinación a nivel mitocondrial y la formación de un subtetraploide a nivel nuclear (Gaunt y col., 2003). Sin embargo, los híbridos observados naturalmente son diploides. No está claro, si los híbridos naturales y los experimentales se generaron por mecanismos distintos, o si los requisitos para volver a la diploidía se encuentran ausentes bajo condiciones experimentales.

Como consecuencia de esta particular estructura poblacional del parásito, que es mayoritariamente clonal con aislados eventos de recombinación, ha sido necesario generar consensos para la nomenclatura de *T. cruzi*. En 1999 se realizó la Primera Reunión Satélite (Anónimo, 1999) donde se decidió dividir a *T. cruzi* en dos linajes,

denominados Tc I y Tc II. Con el desarrollo de nuevos marcadores moleculares, Michel Tibayrenc propuso dividir a *T. cruzi* en 6 Unidades de Tipificación Discretas (UTD), donde se mantiene el Tc I original, pero el linaje Tc II se subdivide en 5 UTD (Tc IIa-e) (Tibayrenc, 2003). Estas unidades están comprendidas por cepas que son más parecidas entre ellas que con el resto de la población, y a su vez son identificables por marcadores genéticos, moleculares y/o inmunológicos. Sin embargo, teniendo en cuenta los estudios filogenéticos más recientes (ver ítem 1.5) la subdivisión propuesta de Tc II no sería apropiada. Con el objetivo de modificar la nomenclatura de *T.* cruzi de forma consensuada en base a los nuevos conocimientos, se realizó la segunda reunión satélite, donde se modificó la denominación de los 6 UTD (*T. cruzi* I-VI) (Zingales y col., 2009) (Tabla 1).

Tibayrenc y col. 2003	Tc I	Tc IIa	Tc IIb	Tc IIc	Tc IId	Tc IIe
Nueva nomenclatura	**Tc I**	**Tc II**	**Tc III**	**Tc IV**	**Tc V**	**Tc VI**

Tabla 1. Nomenclatura de *T. cruzi* acordada en la Segunda Reunión Satélite 2009 (Zingales y col., 2009).

1.5. Origen de los 6 UTD

El origen de los UTD no solamente es interesante, si no que es relevante para el diseño de estrategias de tipificación molecular. La ubicación temporal y espacial, así como los mecanismos que llevaron a la formación de las distintas UTD definen la actual distribución y composición genómica de cada grupo. Esto determina que tractos génicos son diferenciales entre las UTD, pero suficientemente conservados entre los organismos pertenecientes a una misma UTD, como para ser utilizados para la genotipificación de poblaciones naturales.

Como se había comentado anteriormente, los hospedadores originales de *T. cruzi* probablemente fueron marsupiales ancestrales. El origen de los marsupiales data del inicio del medio Pleistoceno y la familia *Didelphidae* surgió hace 65 millones de años atrás, en el Cretáceo. La fauna de mamíferos de América del Sur en el Cretáceo estaba formada principalmente de marsupiales y placentarios ancestrales del Orden *Xenarthra* (armadillos, osos hormigueros y perezosos). Algunos miembros de estos dos grandes

grupos de mamíferos serían los reservorios naturales del parásito en aquel entonces. Los distintos ecotopos en los cuales se encontraban y se encuentran aun estos dos grupos de hospedadores habrían llevado a una evolución por propagación clonal de dos grupos de parásitos que dio lugar a las UTD ancestrales Tc I y Tc II. Los mamíferos marsupiales del género *Didelphis* (comadrejas) suelen habitar un ecotopo arbóreo y estar infectados con parásitos Tc I, mientras los mamíferos placentarios de la familia Dasypodidae (mulitas) habitan un ecotopo terrestre y suelen estar infectados con parásitos Tc II (Yeo y col., 2005). Esta asociación entre Tc I y el ecotopo arbóreo, y Tc II con el ecotopo terrestre se mantiene hasta hoy en el ciclo silvestre de la enfermedad (Marcili y col., 2009; Yeo y col., 2005).

A diferencia del origen por propagación clonal para Tc I y Tc II, para los otros cuatro UTD se propone que fueron originados como consecuencia de eventos aislados de hibridización seguidos por propagación clonal.

En las poblaciones naturales, las secuencias nucleares, ya sean homocigota, heterocigota, multi-copia o de copia única, se pueden observar 4 grupos de secuencias. Estas secuencias se encuentran en homocigosis en las UTD Tc I, IV, II y III, mientras que las secuencias de las UTD V y VI son principalmente alelos heterocigotas que tienen gran similitud con secuencias de las UTD Tc II o III. Esta evidencia sugiere que las UTD V y VI son producto de al menos un evento de hibridización entre parásitos de las UTD II y III. Una excepción a esta estructura de cuatro grupos de secuencias es el gen multi-copia de la histona H2A en las UTD V y VI, el cual pertenece a un quinto grupo. Este gen es un mosaico entre las secuencias de los grupos II y III, posiblemente debido a la recombinación entre los alelos heredados de ambos parentales (Sturm y Campbell, 2010). Este proceso de homogenización de alelos por recombinación parece haber actuado también en las UTD IV y III, que a pesar de tener secuencias homocigotas propias, las mismas contienen SNPs característicos de las UTD Tc I y Tc II, posiblemente indicando al menos un antiguo evento de hibridización que dio lugar a estos dos UTD (Westenberger y col., 2005). Al analizar marcadores nucleares de mayor velocidad de evolución que las secuencias codificantes, como son los microsatélites (de Freitas y col., 2006), también observaron que los parásitos de UTD V y VI eran

dialélicos, conteniendo un alelo del II y otro del III, también claramente apoyando la hipótesis de su origen híbrido. Sin embargo, no encontraron este patrón en las UTD IV y III, donde encontraron alelos propios. Esto no se contradice con los resultados obtenidos por Westenberger y colaboradores mencionados anteriormente, ya que las huellas dejadas por un evento de hibridización antiguo entre las UTD I y II para dar origen a los IV y III, es posible que hayan desaparecido en loci de rápida evolución como son los microsatélites. Algunos de los genes heredados por las UTD Tc V y VI no se heredaron de ambos parentales y son homocigotas.

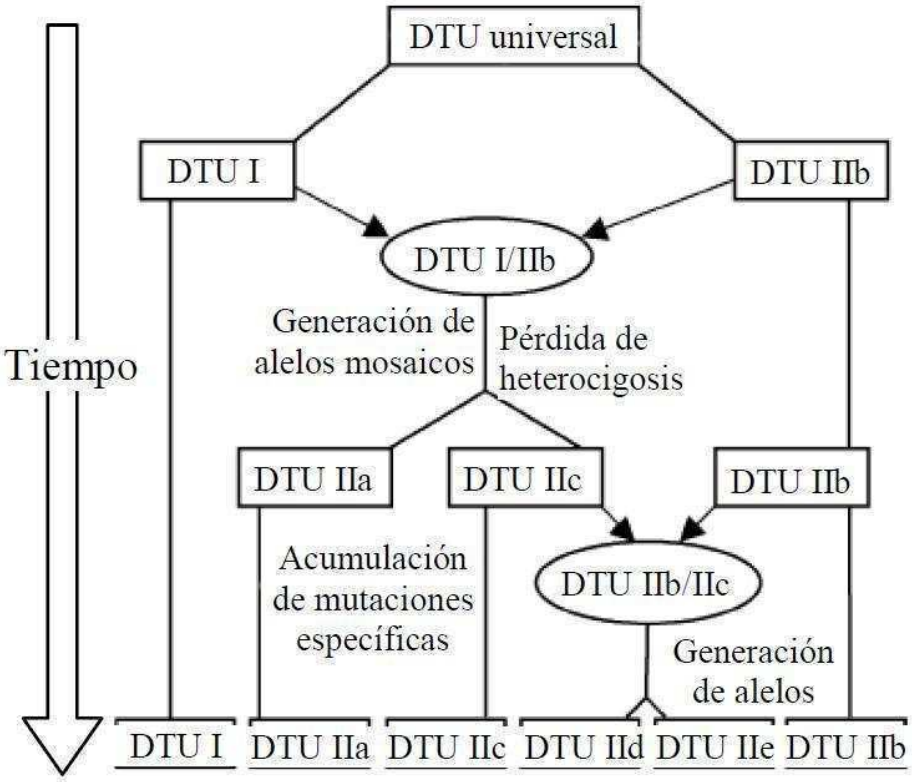

Fig. 3. Esquema de eventos de hibridización que generaron las UTD actuales según (Westenberger y col., 2005).

Para el genoma mitocondrial el mecanismo de herencia en los eventos de hibridación es aparentemente distinto al del genoma nuclear. Tanto en el modelo experimental descripto por Gaunt y colaboradores (Gaunt y col., 2003), como en las UTD híbridos naturales, siempre el contenido genómico mitocondrial se hereda uniparentalmente. En la actualidad se observan 3 clados de secuencias mitocondriales en *T. cruzi*. El clado A incluye a Tc I, el clado B a Tc IV, III, V y VI, y al clado C Tc II (de Freitas y col., 2006)

(Fig. 3). En este esquema, los híbridos homocigotas Tc IV y III, han heredado sus maxicírculos del parental Tc I, con subsecuente acumulación de mutaciones que dieron lugar al clado B. En la hibridación de Tc II y III el genoma mitocondrial del parental Tc III fue heredado por ambos UTD híbridos heterocigotas Tc V y Tc VI.

1.6. Distribución de los 6 UTD

Tc I: Es el principal agente etiológico de la enfermedad de Chagas en los países al norte del Amazonas y en el Amazonas. Están fuertemente asociados con el ecotopo arbóreo. Su principal vector en el Amazonas es el *Rhodnius*, mientras que en América del Norte y Central es *Triatoma*. Su reservorio principal son las comadrejas (Coura y col., 2002; Roellig y col., 2008).

Tc II: Es el principal causante de la enfermedad de Chagas en la región este y central de Brasil (Lages-Silva y col., 2006). Rara vez ha sido aislado del ciclo silvestre y se encuentra asociado al ciclo doméstico y peridoméstico. Su vector principal es el *Pastrongylus* (Sturm y Campbell, 2010).

Tc III: Al igual que Tc IV es poco común encontrarlo en el ciclo doméstico, ya que está fuertemente asociado al ciclo silvestre terrestre. Sin embargo, en Santiago del Estero, Argentina, ha sido aislado a partir de muestras de sangre periférica de perro (Cardinal y col., 2008). El principal reservorio es la mulita (*Dasypus novemcinctus*) y los vectores son del género *Pastrongylus* y *Triatoma*. Está asociado al ecotopo terrestre. Geográficamente ha sido asilado desde el norte de América del Sur hasta Argentina (Sturm y Campbell, 2010).

Tc IV: Es endémico en América del Norte junto a Tc I, donde se encuentra asociado al ecotopo terrestre infectando fundamentalmente a mapaches, mientras que Tc I infecta a las comadrejas de las mismas zonas. También se encuentra presente en el Amazonas, aun que aparentemente estas poblaciones serían distintas a las de América del Norte (Roellig y col., 2008).

Tc V: Este UTD es el principal causante de la enfermedad de Chagas en la zona conocida como el Gran Chaco, que comprende partes de Argentina, Paraguay, Bolivia,

Chile y el sur de Brasil. Se encuentra asociado casi exclusivamente al ciclo doméstico de la enfermedad y su principal vector es la vinchuca, *Triatoma infestans* (del Puerto y col., 2010; Diosque y col., 2003).

Tc VI: Al igual que Tc V, se encuentra asociado al ciclo doméstico y peridoméstico en el cono sur de América Latina. Particularmente, en Argentina se lo vio asociado a la infección de perros y gatos (Cardinal y col., 2008; Marcet y col., 2006).

1.7. Marcadores Moleculares

Trypanosoma cruzi muestra niveles muy altos de diversidad genética, y un gran número de marcadores genéticos han sido utilizados para estratificar a la especie en varias subdivisiones. Dependiendo de los marcadores utilizados y la tecnología aplicada se han logrado ensayos con distintos grados de resolución. Estrategias de tipificación de polimorfismos genéticos en loci relativamente conservados son utilizadas para definir las principales subdivisiones genéticas (Fernandes y col., 1998a) (Souto y col., 1996), mientras que el análisis de loci altamente variables, tales como las secuencias de los minicírculos del ADNk (Burgos y col., 2007) (Telleria y col., 2006) o microsatélites (Oliveira y col., 1998) (Llewellyn y col., 2009) permiten un mayor nivel de resolución. En particular, los microsatélites por ser secuencias que cuentan con solo dos alelos por genoma, permiten deducir la clonalidad de una población.

Término	Criterio	Nomenclatura						Referencia
UTD	RAPD y MLEE	Tc I	Tc Iia	Tc IIb	Tc IIc	Tc IId	Tc IIe	(Brisse y col., 2000)
Zimodema	MLEE	ZI	ZIII	ZII	ZIII-ASAT I	Heterocigota ZII	Heterocigota ZII	(Miles, 2003)
Clonet	MLEE	1-25	26-29	30-34	35-37	38,39	40-43	(Tibayrenc, 1988)
Linaje	polimorfismos tamaño ADNr	2		1		1/2	1	(Souto y col., 1996)
Linaje	mini-exón	2	2'	1	2'	1	1	(Fernandes y col., 1998a) (Fernandes y col., 1998b)
Grupo	Consenso de expertos	*T. cruzi I*	*T. cruzi**	*T. cruzi II*	*T. cruzi**	*T. cruzi**	*T. cruzi**	(Anonymous, 1999)
Zimodema	PCR-RFLP del ADNr		ZIII-B		ZIII-A			(Mendonca y col., 2002)
Linajes mayores	Microsatélites, polimorfismo tamaño ADNr, secuencias ADNmt	Tc I		Tc II	Tc III	Tc Híbrido	Tc Híbrido	(de Freitas y col., 2006)

Tabla 2. Comparación de esquemas de nomenclatura de *T. cruzi*. Adaptado de Lewis y colaboradores (Lewis y col., 2009). * Grupo indefinido.

Históricamente, el estudio de la diversidad genética de *T. cruzi* se ha visto obstaculizada por la falta de métodos estandarizados de tipificación y por el uso de varias nomenclaturas distintas (Tabla 2).

A los efectos de la epidemiología molecular, un desarrollo conceptual útil ha sido el de la Unidad de Tipificación Discreta (UTD) que tiene valor taxonómico (Tibayrenc, 1998). Como se mencionó anteriormente, las seis UTD comprenden cepas agrupadas en base a características comunes de genotipos multilocus (Brisse y col., 2000; Brisse y col., 2001) (Zingales y col., 2009) cada una con sus características epidemiológicas y evolutivas particulares.

Dos de las estrategias más utilizadas para la genotipificación de *T. cruzi*, son ensayos que tienen como blanco molecular a la secuencia del dominio D7 del gen 24Sα ARNr y a la región intergénica no transcripta del mini-exón. Ambas permiten la discriminación de algunos de las diferentes UTD por simple visualización de las diferencias en el tamaño del producto amplificado por PCR (Fernandes y col., 1998a; Souto y col., 1996; Brisse y col., 2001; Mendonca y col., 2002) (Tabla 3).

En particular, el dominio D7 del gen 24Sα ARNr tiene tractos altamente conservados en todos los tripanosomátidos y se han diseñado oligonucleótidos complementarios a estas regiones (Briones y col., 1999; Souto y col., 1999). El fragmento amplificado por estos oligonucleótidos es polimórfico y su tamaño varía en algunas especies de tripanosomátidos.

Por otro lado, el espaciador intergénico del mini-exón permite la separación de *T. cruzi* en 4 grandes grupos en concordancia con los eventos de hibridización que llevaron al origen de las 6 UTD. El análisis de este marcador permite la discriminación de las UTD hibridas más antiguas, Tc III y Tc IV, donde por evolución clonal prolongada en cada UTD se han fijado varios polimorfismos que permiten su identificación precisa. Las secuencias del espaciador intergénico del mini-exón de Tc I también contienen polimorfismos originales que permiten su identificación.

	Producto de PCR esperado (productos de digestión) (pb)					
Blanco /enzima	Tc I	Tc IV	Tc II	Tc III	Tc V	Tc VI
Miniexón	350	400 * o ninguno†	300	250 * o ninguno†	300	300
24Sα ADNr	110	117‡ o 120† o 125∫ o 130•	125	110	110 o 110 + 125**	125
HSP60 /EcoRV	432-462 (432-462)	432-462 (432-462)	432-462 (432-462)	432-462 (314+418-118)	432-462 (432-462+314+148-118)	432-462 (432-462+314+148-118)
Histona *HI/Aat*II	486 (364+122)	486 (486+364+122)	486 (486)	486 (364+122)	486 (486+364+122)	486 (486+364+122)
*GPI/Hha*I	1,264 (817+447)	1,264 (490+447+253)	1,264 (490+447+253)	1,264 (817+447)	1,264 (817+490+447+253)	1,264 (817+490+447+253)

Tabla 3. Genotipificación según los tamaños de productos de amplificación por PCR (pb), adaptado de Lewis y colaboradores (Lewis y col., 2009). * Según Yeo y col. 2005. † Según Brisse y col. 2001. ‡ Según Kawashita y colaboradores (Kawashita y col., 2001). ∫ Para la cepa, Saimiri3, según Brisse y col. 2001. • Para las cepas de origen norteamericano, según Brisse y col. 2001. ** Patrón de bandas dobles observado para la mayoría de las muestras.

Sin embargo, el o los eventos de hibridización que dieron lugar a las UTD Tc V y Tc VI ocurrieron, en términos evolutivos, hace relativamente poco y en ambos casos habría/n involucrado a las mismas UTD parentales (Tc II y Tc III) (de Freitas y col., 2006; Westenberger y col., 2005). Como consecuencia de este proceso de hibridización, ambas UTD Tc V y Tc VI, incorporanron de manera casi exclusiva secuencias del espaciador intergénico del mini-exón proveniente de la UTD parental Tc II, haciendo imposible la discriminación entre estas tres UTD con este marcador molecular. Puntualmente, la discriminación entre Tc II y Tc VI ha sido particularmente problemática y no se han podido encontrar marcadores moleculares individuales lo suficientemente sensibles que permitan su tipificación a partir de muestras biológicas.

El polimorfismo del fragmento A-10 fue originalmente descripto por Brisse y colaboradores (Brisse y col., 2000) en un trabajo donde identifican fragmentos amplificados diferencialmente en las distintas UTD por la técnica de RAPD, que utiliza pequeños oligonucleótidos con secuencias al azar. El fragmento A-10 se secuenció ya que era amplificado en todas las cepas menos en las Tc II. Dada la inexistencia en aquel momento de un marcador molecular para diferenciar a las UTD Tc II y TC VI, se propusieron los oligonucleótidos P3 y P6, complementarios al fragmento A-10, que generaban un amplicón de 625 pb en las cepas Tc VI, pero no en las Tc II. El fragmento A-10 es una secuencia repetitiva de bajo número de copias, polimórfica, no codificante.

2. Transmisión

2.1. Transmisión vectorial

La principal vía de transmisión es la vectorial. Esta se produce cuando parásitos presentes en las heces del insecto penetran por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz. Los insectos capaces de infectarse y por lo tanto capaces de transmitir la enfermedad son de la subfamilia Triatominae, compuesta por más 130 especies, casi todas confinadas en las Américas. La mayoría de las especies americanas pertenecientes a esta subfamilia han sido reportadas infectadas por *Trypanosoma cruzi*. Su hábitat natural incluye palmeras, huecos en los arboles, grietas en las piedras, pequeñas cuevas y otros refugios de animales donde puede encontrar alimento. Los reservorios naturales del parásito son los mamíferos de pequeño y mediano porte. Han sido reportados más de 100 especies de mamíferos infectados por *T. cruzi*. Este ciclo de transmisión enzoótico entre vectores y reservorios silvestres se viene dando hace millones de años y es conocido como el ciclo silvestre de la enfermedad. Sin embargo, con la llegada del hombre a América hace aproximadamente 15.000 años, algunas especies de triatominos, como *T. infestans*, han logrado adaptarse a colonizar y prosperar en los domicilios y peridomicilios humanos donde transmiten el parásito a los hombres y animales domésticos como los perros, gatos y cuises. Este ciclo de transmisión es conocido como el ciclo doméstico. Ambos ciclos no ocurren necesariamente aislados uno de otro, sino que según las características eco-epidemiológicas de cada lugar se pueden superponer con distinta frecuencia. Esta superposición de ambos ciclos ocurre cuando el hombre incursiona en lugares donde la transmisión es fundamentalmente enzoónotica, como por la invasión ocasional de vectores silvestres a los domicilios.

Con el fin de disminuir la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas al hombre, se han realizado numerosos planes de desinfestación domiciliaria aplicando insecticidas. Durante la fase de vigilancia después de la desinfestación, se ha observado que otras especies de triatominos silvestres o peridomésticos han surgido como supuestos vectores secundarios de *T. cruzi* (Schofield y col., 1999). En el Gran Chaco, *Triatoma sordida*, *Triatoma guasayana* y *Triatoma garciabesi* han sido considerados como candidatos para la domesticación (Wisnivesky-Colli y col., 1993; Diotaiuti y col., 1995; Noireau y col., 1995; Noireau y col., 1999; Castanera y col.,

1998). De hecho, en Argentina, *T. cruzi* ha sido aislado en ejemplares peridomésticos de *T. guasayana* (Lauricella y col., 2005).

Los programas de control y seguimiento periódicamente controlan la prevalencia de infección por *T. cruzi* en triatominos a través de la observación por microscopía óptica (MO) de las heces diluidas en busca de tripanosomas. Sin embargo, la MO presenta escasa sensibilidad y puede carecer de especificidad debido a infecciones con otros tripanosomátidos, como *Trypanosoma rangeli* y *Blastocrithidia triatomae* (Cerisola y col., 1971; Chiurillo y col., 2003). Un método más sensible y específico para evaluar la infección por *T. cruzi* en triatominos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se ha sido aplicada directamente a las preparaciones de ADN de muestras fecales (Breniere y col., 1995; Russomando y col., 1996).

Los programas de desinfestación domiciliaria han logrado interrumpir la transmisión vectorial en Brasil, Chile y Uruguay, mientras que en Argentina y Bolivia ha disminuido notablemente (Dias y col., 2002). Esto le ha dado una mayor importancia relativa a otras formas de transmisión como la connatal, transfusional y por trasplante de órganos.

2.2. Transmisión connatal

Con una incidencia variable según la región geográfica, entre el 0,1 y el 8%, la transmisión connatal, también conocida como vertical o congénita, ha sido tradicionalmente la tercera vía en importancia de la infección por *T. cruzi* (Lorca y col., 1995; Schenone y col., 1985; Zaidenberg y Segovia, 1993) (Blanco y col., 1999; Freilij y Altcheh, 1995; Gurtler y col., 2003; Mendoza Ticona y col., 2005; Mora y col., 2005; Russomando y col., 1998; Torrico y col., 2004). Sin embargo, con la aplicación de planes de desinsectación que han reducido la transmisión vectorial y con los controles en bancos de sangre que disminuyeron los riesgos transfusionales, la transmisión connatal se ha vuelto un mecanismo relativamente más importante para la persistencia de la infección. Datos del año 2007 indican una incidencia anual de 15 mil casos por transmisión connatal en el continente (OMS, 2007) lo cual representa un 25% de incidencia total de la infección. En particular, en la Argentina se calcula que es 10 veces superior a la incidencia de la transmisión vectorial (Gurtler y col., 2003). Además, sumado al fenómeno de migración de las poblaciones hacia zonas no endémicas, esta

vía toma particular importancia como mecanismo de urbanización de la infección. Epidemiológicamente, la vía vertical de infección se define si: i) la madre está infectada; ii) el individuo nació y vivió fuera de área endémica (sin viajes a ella) y iii) no recibió transfusiones.

2.3. Transmisión oral

Otra fuente de transmisión, epidemiológicamente más importante en los reservorios que en el hombre, es por la ingestión de vectores o huéspedes infectados. Esta forma de transmisión juega un rol importante en el mantenimiento del ciclo silvestre (Zeledon, 1974). En la literatura se han reportado varios brotes de Chagas agudo que han sido atribuidos a la transmisión oral, principalmente en Brasil, debido al consumo de bebidas o alimentos contaminados con heces de triatominos infectados (Alarcon de Noya y col., 2010; Benchimol Barbosa, 2006; Maguire y col., 1986; Nery-Guimarães F, 1968; Pinto y col., 2004; Shikanai-Yasuda y col., 1991)

2.4 Transmisión transfusional

En las últimas décadas, las dificultades económicas en América Latina han estimulado la migración desde zonas rurales hacia zonas urbanas, concentrando en éstas más del 60% de la población. Dicho fenómeno reduce la exposición al vector infectado pero aumenta la probabilidad de transmisión por transfusión, la cual presenta una incidencia calculada en un 5 a 20% (Schmunis, 1999). Además, la infección transfusional se ha convertido en un serio problema en los países desarrollados no endémicos debido a la migración de pobladores infectados provenientes de regiones endémicas (OMS, 2002). En todos los casos, la población de riesgo está constituida principalmente por los individuos poli-transfundidos (pacientes hemofílicos y sometidos a diálisis).

2.5. Trasplante de órganos

La transmisión por trasplante de órganos provenientes de personas infectadas con *T. cruzi* también ha sido reportada (Barcan y col., 2005; Riarte y col., 1999). Estos

casos, al igual que los trasplantes a personas ya infectadas por *T. cruzi*, presentan una problemática particular debido a la inmunosupresión post-trasplante del receptor y deben ser monitorizados. En los casos en que se detectan parásitos en sangre por el método de Strout, chagomas en la piel o nidos de amastigotes en muestras de biopsias, es recomendable que el paciente sea medicado con drogas anti-parasitarias (Diez y col., 2007).

3. La enfermedad de Chagas

3.1. Etapas de la infección

La enfermedad presenta tres períodos bien definidos: fase aguda, fase crónica indeterminada o latente y fase crónica determinada. El período de incubación en la fase aguda es de 4 a 10 días y de menor duración cuando la vía de adquisición es transfusional.

Período agudo: Generalmente es asintomático, y más frecuente en personas jóvenes. Se evidencia una alta parasitemia, con síntomas y signos transitorios. Este período se extiende por dos a cuatro meses. Alrededor del 1 a 2% de los casos de enfermedad de Chagas se detectan en esta etapa. Los pacientes agudos sintomáticos presentan: fiebre, signos de puerta de entrada (ver siguiente párrafo), edema, adenopatías satélites, hepatomegalia y esplenomegalia. La fiebre es frecuente, irregular, pero puede ser continua y alta. Se acompaña de anorexia, astenia, mialgias, cefalea y ocasionalmente artralgias. El cuadro febril suele persistir por un período de dos a cuatro semanas. Los signos de puerta de entrada o *chagomas de inoculación*, son lesiones cutáneas, más frecuentes en la cara y extremidades por ser los sitios más expuestos a las vinchucas. Muy típico es el de la región ocular llamado signo de Romaña-Mazza. Los chagomas pueden presentarse en cualquier parte de la piel, con aspecto furúnculoideo y de color rosado violáceo e indurados; tienen una duración variable, la que puede extenderse hasta 15 días. En este período, el compromiso cardíaco se presenta como una miocarditis: el paciente presenta taquicardia e hipotensión, a veces existe ritmo de

galope. Algunos casos pueden llegar a la insuficiencia cardíaca congestiva. Se presenta hepatomegalia en 40% de los casos y compromiso meningo-encefálico, más frecuente en niños menores, representando un índice de gravedad. Es de curso habitualmente benigno en inmunocompetentes. La tasa de letalidad es de 2 a 7%.

Período crónico indeterminado: Representa entre 50 y 70% de todos los pacientes chagásicos. Se caracteriza por la ausencia de síntomas cardíacos, digestivos, etc. Los pacientes tienen baja parasitemia y serología positiva (títulos de IgG bajos), pero otros exámenes de laboratorio son normales, tales como: electrocardiograma y radiografías. Esta forma persiste, por lo menos en 30% de los chagásicos, durante toda su vida. El resto puede evolucionar a una forma crónica determinada, en un lapso de 10 a 30 años.

Período crónico determinado: Las formas crónicas determinadas son principalmente la cardiopatía, colopatía y esofagopatía. El compromiso de otros órganos es infrecuente, tales como estómago, duodeno, vejiga, uréteres, etc. Estas formas de presentación pueden ocurrir separadamente o coexistir en un mismo paciente. En esta etapa existe una parasitemia baja, con títulos elevados de anticuerpos (si el paciente es inmunocompetente). Se estima que ~30% de las personas infectadas tendrían manifestaciones de la etapa crónica, lo que podría aumentar al emplear métodos diagnósticos más sensibles.

3.2. La enfermedad connatal

No existen marcadores específicos de la enfermedad connatal. Generalmente la detección de la infección se realiza en la adultez, en el transcurso de la fase indeterminada, o más adelante, al aparecer las manifestaciones de la enfermedad (Bittencourt y col., 1988; Freilij y Altcheh, 1995). La infección connatal puede ser causante del bajo peso al nacer, hepatomegalia, esplenomegalia, síntomas respiratorios agudos, anemia, manifestaciones digestivas y compromiso del sistema nervioso central. Estas y otras manifestaciones, con frecuencias diferentes según el área geográfica, han sido ampliamente descriptas (Atias y col., 1962; Atias y col., 1985; Freilij y Altcheh, 1995). En los casos particulares de nacimientos con doble infección (*T. cruzi*-VIH),

además de altas parasitemias, pueden hallarse signos de miocarditis y/o meningoencefalitis con mayor frecuencia (Freilij y Altcheh, 1995).

3.3. La enfermedad en pacientes inmunosuprimidos

Desde la década del ´80 el número de pacientes inmunosuprimidos ha crecido considerablemente. El incremento del número y tipo de trasplantes de órganos, las nuevas combinaciones de drogas inmunosupresoras utilizadas para controlar el rechazo de injerto, el número de pacientes con neoplasias y enfermedades autoinmunes, así como el advenimiento del SIDA, han generado un nuevo grupo de pacientes con inmunosupresión crónica altamente susceptible a las infecciones oportunistas, tanto primarias como reactivaciones, normalmente evitadas por la acción de un sistema inmune competente. De esta manera *T. cruzi*, así como otros protozoarios y hongos, ha entrado en la lista de patógenos oportunistas, principalmente, entre pacientes con inmunosupresión celular. El aumento de la proliferación parasitaria puede verse reflejado en un incremento de la parasitemia y/o en la aparición de nuevas manifestaciones clínicas o el agravamiento de las preexistentes. Entre ellas suelen aparecer manifestaciones de miocarditis u otras de baja frecuencia en pacientes crónicos, como las lesiones en el sistema nervioso central, meningoencefalitis y los chagomas epiteliales que definen, en muchos casos, eventos de reactivación clínica Chagásica (Corti, 2000; Neto y col., 1968; Pizzi y col., 1982; Rivero y col., 1974).

3.4. Manifestaciones Clínicas

Cardiopatía chagásica crónica (CCC): Se presenta en 10 a 30% de estos pacientes. Se caracteriza por su gravedad y representa la principal causa de muerte de estos enfermos. Los síntomas más frecuentes son palpitaciones y disnea de esfuerzo. La cardiopatía evoluciona a la insuficiencia cardíaca. Las arritmias son frecuentes y variadas, todos signos de mal pronóstico. En un comienzo, la CCC puede ser asintomática, pero con evidentes alteraciones electrocardiografícas. Los pacientes refieren palpitaciones, disnea, lipotimia y, raramente, se encuentran soplos cardíacos. La enfermedad lleva a la insuficiencia cardíaca, que junto con las arrítmias, son la causa

de muerte de estos pacientes. La incidencia de la progresión de la cardiopatía chagásica es de ~24,8% y la de las complicaciones es de 3,5% en pacientes tratados y 16,9% en los no tratados.

Esofagopatía chagásica: Conocida como megaesófago, aperistalsis o acalasia del esófago. Se diagnostica, frecuentemente, antes de los 40 años de edad. El esófago se presenta dilatado en diferentes grados y más tardíamente elongado (dolicomegaesófago). Tiende a la hipertrofia de las capas musculares y en la mucosa se producen paraqueratosis. Microscópicamente existe destrucción de las neuronas parasimpáticas con áreas de inflamación crónica, lo que ocasiona la pérdida progresiva de la coordinación motora y de la capacidad contráctil en la manometría esofágica. Luego aparece disfagia, dolor y regurgitación. Es posible que se asocie con megacolon o cardiopatía. Las manifestaciones clínicas, radiología y manometría esofágica permiten efectuar el diagnóstico. Es conveniente realizar endoscopia digestiva alta para descartar la presencia de cáncer.

Colopatía chagásica: La colopatía se presenta entre los 40 y 50 años de edad. Se produce una disfunción motora de los segmentos del colon, por denervación parasimpática intramural. La alteración toma, preferentemente, el sigmoides y el recto, originando una dilatación de esa zona. La expresión clínica básica del megacolon es la constipación progresiva con dificultad para la evacuación. El enfermo suele utilizar laxantes, y enemas y consultar tardíamente. En estos cuadros clínicos se producen períodos de distensión abdominal y, secundariamente, abdomen prominente. Se puede palpar un fecaloma en la fosa iliaca izquierda o directamente al realizar un tacto rectal. Las complicaciones del megacolon chagásico son el vólvulo y la obstrucción intestinal por fecaloma.

4. Diagnostico de la infección

En la fase aguda, la infección se diagnostica por un examen físico con hallazgos referentes a los síndromes de entrada, edema, fiebre, hepatoesplenomegalia, adenopatías, taquicardia, arritmias y signos de insuficiencia cardiaca. En esta etapa los

métodos parasitológicos presentan gran sensibilidad (ver más adelante). De igual forma, estos métodos son los utilizados para el diagnóstico de la infección connatal en recién nacidos y en menores de 6 meses, también caracterizados por las altas parasitemias. La falta de maduración del sistema inmune y la presencia de anticuerpos maternos impide, en estos últimos, la utilización de la serología para el diagnóstico de la infección.

En la fase crónica indeterminada, por el contrario, la serología reactiva contra *T. cruzi* es considerada la técnica de referencia para el diagnóstico. Las técnicas parasitológicas presentan menor sensibilidad por la reducida parasitemia característica de esta fase de la infección. En todos los casos, el diagnóstico se completa con los antecedentes epidemiológicos y clínicos, como procedencia actual y pasada del paciente, el tipo de vivienda donde habita, los viajes que pudiera haber realizado a zonas endémicas y los antecedentes de transfusiones sanguíneas y de madre infectada.

En la práctica, el diagnóstico de la fase aguda de la infección o la reactivación en pacientes inmunosuprimidos se basa en el diagnóstico parasitológico, mientras que el diagnóstico de la fase crónica de la infección y exámenes para la selección de donadores de sangre depende esencialmente en resultados serológicos.

4.1. Diagnóstico Parasitológico

4.1.1. Técnicas Directas

La mejor y más simple forma para hacer el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad se realiza a través de la examinación microscópica de una gota de sangre fresca anticoagulada (5mL) permitiendo la observación del rápido movimiento del tripomatigote de *T. cruzi*. Es necesaria la examinación de por lo menos 100 campos microscópicos para llegar a la conclusión de la ausencia de los parásitos.

Si repetidas examinaciones de sangre fresca fallan para revelar la evidencia de infección, se pueden utilizar otros métodos directos para concentrar a los parásitos, principalmente microhematocrito y método de Strout. El primero, se emplea en recién nacidos, cuando se dispone de poca sangre; consiste en obtener uno o más capilares

heparinizados, con sangre, y someterlos a centrifugación en la microcentrífuga apropiada para microhematocrito (Freilij y Altcheh, 1995). En la interfase entre el empaquetado de hematíes y el plasma, se encuentra una capa de leucocitos, en la que se observan los movimientos del flagelado, con el auxilio del microscopio con ocular de 10 x y objetiva de 40 aumentos. Alternativamente, se podrá cortar con sierra el capilar en la interfase y poner el contenido como si fuese examen en fresco. El otro método de concentración, llamado técnica de Strout, y utilizado también para otros hemoflagelados (Strout, 1962), consiste en la colecta de sangre (mínimo 3,0 mL) sin anticoagulante, dejando el tubo a 37ºC durante dos horas, para la debida formación y retracción del coágulo. Si existen parásitos, migrarán para fuera del coágulo. El suero exudado se transfiere a otro tubo, el que se centrifuga suavemente (5 min a 50 g, aproximadamente 400 rpm), de lo cual queda un sobrenadante más claro, que se transfiere a un segundo tubo y se somete a centrifugación, ahora intensa (10 min a 400 g, aprox. 2.000 rpm). El sobrenadante, constituido por suero límpido, se desprecia y se hace una preparación a fresco, como ya se explicó, resuspendiendo la última gota del sedimento.

4.1.2. Técnicas Indirectas

Los métodos indirectos permiten la multiplicación de los parásitos de la muestra.

Xenodiagnóstico: este método se basa en la amplificación del parásito dentro del vector alimentado con sangre del paciente. Se utilizan ninfas de triatominos no infectados y la observación al microscopio del contenido intestinal se realiza entre 30 y 45 días después de la ingestión. La sensibilidad del método durante la fase crónica puede llegar al 60% (Portela-Lindoso, 2004).

Hemocultivo: consiste en cultivar muestras de sangre del paciente. Los cultivos son analizados al microscopio a los 20, 30 y 45 días buscando formas epimastigotes (Chiari, 1999). En la fase aguda, su sensibilidad puede alcanzar el 100%. Durante la fase crónica, presenta niveles de sensibilidad inferiores al xenodiagnóstico, pero permite aislar más fácilmente cepas del parásito.

Inoculación en animales sensibles: se utiliza principalmente ratones o cobayos. Se los inocula con sangre del paciente tratada con anticoagulantes o con la porción de la "capa blanca". El período de observación de la sangre del animal es a partir de 3-4 semanas.

Por muchas razones, los métodos indirectos parasitológicos se han vuelto menos populares. Estos son menos sensibles que los otros métodos (método directo en la fase aguda y serológico en la infección). El material necesario para realizar estos exámenes no está disponible comercialmente. Estas examinaciones requieren mucho tiempo y necesitan personal altamente especializado. Los resultados están disponible en 1-6 meses después de realizado el examen. Sin embargo el método indirecto parasitológico se usa para continuar el diagnóstico en casos raros de dudarse en resultados serológicos y para evaluar nuevos medicamentos.

4.2. Diagnóstico Inmunológico

Así como se indica la búsqueda del parásito durante la fase aguda, se recomienda la serología para el diagnóstico durante la fase crónica, que envuelve la mayoría de las situaciones del día a día. Siendo el *Trypanosoma cruzi* un protozoario extremamente antigénico, se espera que pocos meses después de la infección exista una respuesta inmune humoral eficaz para controlar el aumento de la parasitemia, lo que se consigue en general por medio de anticuerpos llamados líticos, con auxilio de las enzimas del complemento sérico. Estos y otros anticuerpos sintetizados contra diferentes componentes del parásito, sirven de forma indirecta para el diagnóstico. Así, hay anticuerpos contra diferentes antígenos del *Trypanosoma cruzi*, de superficie, somáticos, de excreción, y que pertenecen a diferentes clases (IgG, IgA, IgM) y subclases (Rottenberg y col., 1991). Los más frecuentes y en mayor concentración, pertenecen a la clase IgG, subclases IgG1 e IgG3. Los métodos de detección convencionales son la IFI (Camargo, 1966), la hemoaglutinación indirecta (HAI) (Knierim y col., 1973), y el test inmunoenzimático de ELISA (Voller y col., 1975). Todos ellos emplean antígenos no purificados del parásito, existen en diversidad de marcas en el mercado de América Latina, hay suficiente experiencia en todos estos países con su empleo, así como evaluaciones de calidad de la mayoría y se conocen como tests o

técnicas convencionales para el diagnóstico serológico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Su desempeño es aceptable en la mayoría de los casos, pues es posible diagnosticar más del 95% de los infectados (Gomes y col., 2009). Debido a que la especificidad no es del 100%, existen reacciones cruzadas, en particular con algunos casos de Kala-Azar (leishmaniasis visceral) en aquellas regiones en donde ambas infecciones se superponen (Malchiodi y col., 1994). En la tentativa de mejorar la especificidad de las técnicas convencionales, se estudiaron y publicaron resultados de diferentes antígenos purificados (Mendes y col., 1997; Schechter y col., 1986), seguidos de antígenos recombinantes (Moncayo y Luquetti, 1990), y de peptídeos sintéticos (Hernandez y col., 2010; Umezawa y col., 2003) que en general pueden mejorar el desempeño en cuanto a la especificidad, perdiendo a veces en la sensibilidad. Estas técnicas llamadas no-convencionales, pueden ser pruebas rápidas, con resultados similares a las convencionales, algunas de gran simplicidad (Rabello y col., 1999). Otras más complejas no se encuentran comercializadas, por lo que su empleo es más restringido a servicios universitarios y de investigación.

Las pruebas serológicas convencionales permiten hacer el diagnóstico en diferentes circunstancias, como el diagnóstico de caso clínico, la exclusión del donante de sangre o de órganos, la confirmación de la madre infectada y el seguimiento en su niño a los 6 u 8 meses de edad. En el diagnóstico de casos es necesario emplear técnicas de buena especificidad para evitar los falsos positivos, como la HAI combinada con otro test convencional. En cambio, en la exclusión de donantes de sangre, se exigen pruebas de elevada sensibilidad, como el ELISA, en detrimento de la especificidad; con esa medida se obtiene un hemoderivado seguro en relación con la posibilidad de transmisión del parásito, pero no todos los excluidos son necesariamente infectados, por lo que un servicio especializado debe confirmarlos.

4.3. Diagnóstico Molecular

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido objeto de continuo estudio y desarrollo hace ya 20 años. Mediante esta técnica se amplifica y detecta ADN del

parásito presente en la muestra. La elección de la secuencia a amplificar es fundamental para poder desarrollar un ensayo con alta especificidad y sensibilidad. La secuencia específica de *T. cruzi* con el mayor número de repeticiones en el genoma nuclear es la secuencia satélite, una secuencia conservada, organizada en serie, con unas 10 mil copias por genoma. Por otro lado, el ADN del cinetoplasto (ADNk) está compuesto por redes de maxicírculos y minicírculos concatenados. Con un número variable de minicírculos por célula, entre 5000 y 10000 según el aislamiento. Ambas secuencias repetitivas son utilizadas como blanco de amplificación para el diagnóstico por PCR de la infección por *T. cruzi* (Avila y col., 1991; Britto y col., 1995; Sturm y col., 1989; Vago y col., 1996).

La prueba de PCR ha funcionado con éxito durante la fase aguda de la infección (Antas y col., 1999) y para diagnosticar casos de infección connatal. Estudios en áreas endémicas de Bolivia mostraron una sensibilidad del 93,6% entre niños infectados (Wincker y col., 1997). En Paraguay, diagnosticaron un 10% de transmisión connatal contra un 3% detectado por microscopia (Russomando y col., 1998). Nuestro grupo realizó el primer estudio prospectivo de la PCR en una cohorte de pacientes pediátricos con enfermedad de Chagas connatal en una zona no endémica en la Argentina, sin riesgo de reinfecciones vectorial. El estudio se centró en la evaluación de la terapia anti-parasitaria en pacientes con infección connatal. El diagnóstico y seguimiento se realizó por medio de ensayos convencionales y PCR-ADNk (Schijman y col., 2003).

En la fase indeterminada y crónica de la infección, la técnica ha funcionado con un 100% de especificidad. Sin embargo, la baja reproducibilidad y la falta de estandarización han dificultado su práctica con fines diagnósticos. En este sentido, nuestro grupo encabezó un estudio que involucró a 26 laboratorios con el objetivo de avanzar en la armonización de estrategias de PCR utilizadas para el diagóstico de *T. cruzi*. En este estudio fueron evaluadas las estrategias aplicadas por distintos laboratorios en base a los resultados obtenidos en muestras ciegas de ADN de *T. cruzi* + tampón, epimastigotes de *T. cruzi* + sangre con tampón guanidina y un panel de muestras de pacientes sero-positivos y sero-negativos del cono sur de América. Se eligieron las 4 estrategias de mejor rendimiento (específicas y sensibles) y fueron

evaluadas en nuestro laboratorio por distintos operadores. Como resultado de este estudio se llegó a un consenso entre los expertos donde se dictaron recomendaciones y un protocolo armonizado para el diagnóstico de *T. cruzi* por PCR convencional (Schijamn y col. 2010 en prensa).

5. Antecedentes de técnicas moleculares desarrolladas en la tesis

5.1. PCR Inter-Elementos Repetitivos

Más de un 50% del genoma de *T. cruzi* está compuesto por secuencias repetitivas. Distintas familias de elementos repetitivos de *T. cruzi* han sido identificadas y cuantificadas por varios métodos.

El número de secuencias repetitivas que se encuentran dispersas por todo el genoma, en gran medida depende de la técnica y de los criterios que se aplican para su detección. Cuando el número de elementos se calcula utilizando información de secuenciación genómica, principalmente secuencias completas se tienen en cuenta, mientras que en experimentos de hibridización secuencias parciales también se cuentan y el número estimado es generalmente mayor. Para SIRE, Vázquez y colaboradores utilizando técnicas de hibridización informaron entre 1500-3000 copias por genoma dependiendo de la cepa (Vazquez y col., 1999), mientras que El-Sayed y colaboradores utilizando información de secuenciación genómica reportaron sólo 480 por genoma haploide (El-Sayed y col., 2005); para L1Tc Martin y colaboradores utilizando técnicas de hibridización informaron de al menos 2300 copias por genoma (Martin y col., 1995), mientras que El-Sayed y colaboradores reportaron sólo 320 por genoma haploide (El-Sayed y col., 2005). Esto significaría que hay un gran número de secuencias truncadas de estos elementos.

En particular, los elementos repetitivos móviles son segmentos de ADN que se transponen a una frecuencia relativamente alta en los genomas de una amplia gama de organismos y su distribución también suele verse afectada por mecanismos de

recombinación, por lo tanto podrían mostrar un nivel considerable de la variación de posición entre cepas parasitarias (Hartl y col., 1997). Un sistema basado en la PCR que detecta la variación de posición de elementos repetitivos podría ser utilizado como una herramienta para la tipificación de *T. cruzi*. De hecho, se han utilizado con éxito en parásitos como *Toxoplasma gondii* (Terry y col., 2001) y *Trypanosoma brucei* (Hide and Tilley, 2001).

5.2. PCR en Tiempo Real

PCR en tiempo real (del inglés *real time PCR*) es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de amplificación. Para ello se adiciona un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Mackay, 2004). Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real. La PCR cuantitativa es la metodología más moderna para la cuantificación de patógenos en muestras biológicas, debido a su alta sensibilidad y especificidad. La variabilidad que se introduce en la cuantificación y que conlleva a un error en la estima deriva de la integridad del ADN, la eficiencia enzimática y otros muchos factores, por lo que se han desarrollado numerosos sistemas de estandarización. Además de permitir una cuantificación precisa, también cuenta con la ventaja de no requerir una posterior corrida electroforética para el análisis de los resultados. Esto reduce el tiempo necesario para realizar la técnica y a su vez disminuye la probabilidad de contaminación cruzada con amplicones de corridas anteriores. Las técnicas de PCR en tiempo real se distinguen según el empleo de fluorocromos no específicos o bien de sondas moleculares dependientes de la secuencia. En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos se detecta la generación exponencial de ADN de doble cadena empleando un fluorocromo que se une inespecíficamente a aquél. Un ejemplo de colorante que permite esta detección es el SYBR Green, que excitado mediante luz azul (λ_{max} = 488 nm) emite luz verde (λ_{max} = 522 nm) (Zipper y col., 2004). Estas técnicas poseen la ventaja de requerir sólo un par de oligonucleótidos para efectuar la amplificación, lo que abarata su costo; sin embargo,

sólo es posible amplificar y cuantificar un solo producto en cada reacción. Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan al menos un oligonucleótido marcado fluorescentemente. Por ejemplo, las sondas TaqMan permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema en el cual la sonda se encuentra marcada por dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 5' y una molécula en el 3' que bloquea la emisión de fluorescencia del fluoróforo en el extremo 5´ (denominada en inglés «quencher»); esta sonda marcada hibridiza específicamente con el producto de PCR. De este modo, cuando se efectúa la reacción (con la sonda más el par de oligonucleótidos específicos), la sonda hibridiza en el amplicón, pero debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación física del quencher del fluorocromo y por tanto la emisión de fluorescencia. Esta emisión de fluorescencia está cuantitativamente asociada a la cantidad de amplicón producido (Heid y col., 1996). Una gran ventaja sobre los colorantes inespecíficos es que sondas marcadas con fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda se pueden combinar para detectar varios productos en una misma reacción.

En particular, para *T. cruzi* se han diseñado algunas estrategias de PCR en tiempo real para su cuantificación, tanto para modelo experimental murino (Cummings y Tarleton, 2003), como para pacientes con enfermedad de Chagas (Virreira y col., 2006) (Piron y col., 2007). Sin embargo han elegido como control interno una secuencia de ADN del huésped, pero el contenido de ADN presente sangre periférica humana puede ser variable, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. Otro factor, es que estrategias anteriores no han implementado procedimientos para normalizar los valores en función de la representatividad del blanco molecular de la PCR en la población parasitaria infectante.

5.3 Sistema Luminex

El sistema Luminex utiliza microesferas que contienen una mezcla precisa de dos colorantes, a las cuales se acoplan los oligonucleótidos que se utilizan como sondas

al incubarse con el producto de una reacción de PCR. La variación en la proporción de los dos colorantes utilizados permite contar con hasta 100 microesferas distintas. Cada una de estas 100 microesferas puede ser potencialmente acoplada a una sonda distinta, permitiendo así detectar un gran número de amplicones en un mismo ensayo. A su vez, la reacción de PCR es realizada utilizando un oligonucleótido biotinilado para cada amplicón, lo que permite luego permite marcar los productos con streptoavidina-fluoresceína. De esta manera es posible distinguir las microesferas que contienen productos de PCR hibridizados a las que no, ya que estas estarán marcadas con fluoresceína. Para identificar las microesferas y poder detectar las que contienen productos de PCR con fluoresceína se utilizan dos laser en un sistema muy similar a la citometría de flujo (Dunbar, 2006) (Fig. 4).

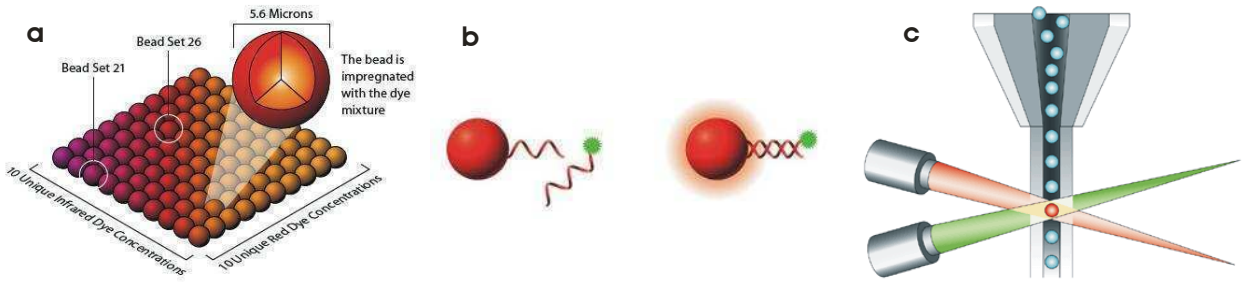

Fig. 4. Sistema Luminex. a) Hasta 100 microesferas con concentraciones distintas de dos colorantes pueden ser acopladas a sondas de ácidos nucleicos. b) Las sondas acopladas a las micro-esferas hibridizan con los productos de PCR biotinilados que se unen a la estreptoavidina-fluoresceína. c) Las microesferas y la fluoresceína son reconocidas por un sistema de dos láseres, similares al citómetro de flujo.

6. Tratamiento Quimioterapéutico

Las drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Benznidazol y el Nifurtimox (OMS, 2002). El rol del parásito en la evolución de la enfermedad queda demostrado en el éxito del tratamiento que, administrado en las etapas iniciales de la infección, evita el desarrollo de la misma. Dicho éxito terapéutico está íntimamente relacionado con la etapa de la infección que está cursando el paciente al momento del inicio del tratamiento. Tanto individuos en fase aguda

(independientemente de la vía de infección) como neonatos y niños infectados connatalmente tienen el mejor pronóstico terapéutico. Por otro lado, individuos con mayor evolución de la infección, en fase asintomática o crónica, carecen de un régimen terapéutico establecido debido al limitado éxito de dichas drogas en este grupo de pacientes.

6.1. El tratamiento en distintos escenarios clínicos

Casos Agudos: Siempre deben ser tratados tanto los pacientes con manifestación clínica: infección menor a 2 meses como los casos agudos biológicos con detección fácil de parásitos al fresco, frotis y con serología convencional. Se recomienda tratar estos casos con Nifurtimox o Benznidazol. El Nifurtimox se administra 8-10 mg/kg/peso día por 60 - 90 días en adultos. En niños 10-15 mg/kg/día por 60-90 días. Esta dosis diaria se debe repartir en tres tomas después de las comidas. El Benznidazol se administra 5mg/kg/día por 60 días en adultos y 5-10mg/kg/ día por 60 días en niños.

Infección connatal: La OMS indica el tratamiento temprano con Benznidazol o Nifurtimox, durante 60 días (OMS, 2002). Esta terapéutica ha demostrado tener una buena eficacia y tolerancia en Argentina, Chile y Paraguay (Freilij y Altcheh, 1995; Russomando y col., 1998; Schenone y col., 2003; Solari y col., 2001; Sosa Estani y col., 1998). El pronóstico de cura alcanza al 100% de los infectados tratados antes del año de vida (Blanco y col., 2000; Freilij y Altcheh, 1995).

Infección accidental: Se deben tratar todos los casos con los mismos fármacos que las infecciones agudas adquiridas a través del vector, durante 10 días. En este grupo debe considerarse la transfusión sanguínea por error desde un dador con enfermedad de Chagas (Amato Neto, 1999).

Trasplante de órganos: Los pacientes que han recibido trasplante de órganos se les realizan diagnósticos de reactivación clínica por el método de Strout (visualización de parásitos en sangre periférica), así como el análisis de muestras de tejido en busca de nidos de amastigotes. En caso de detectarse reactivación clínica, se inicia el tratamiento con benznidazol (5 mg/kg/día) por 60 días (Diez y col., 2007).

Reactivaciones de la enfermedad de Chagas crónica: En pacientes chagásicos crónicos con VIH-SIDA, o a quienes se les administra terapia inmunosupresora deben recibir tratamiento a igual dosis que el grupo anterior. No hay consenso con respecto a la duración del tratamiento, pero ante la ausencia de una reconstitución inmunológica, probablemente sea necesario aplicar un tratamiento etiológico crónico (Vaidian y col., 2004).

Etapa crónica: El tratamiento de adultos está indicado únicamente en la etapa aguda de la infección. El tratamiento de pacientes crónicos está recomendado (OPS, 1998), aunque no establecido, en base a estudios que muestran un menor progreso de la enfermedad en los pacientes tratados, aún en los casos donde no se alcanza la erradicación de la infección (Viotti y Vigliano, 2007; Viotti y col., 1994). El tratamiento de mujeres embarazadas no está recomendado por desconocerse los efectos teratogénicos de las drogas en uso.

6.2. Efectos Colaterales

Son raros durante la fase aguda o en niños, pero más frecuentes (hasta del 30%) en adultos. Los más comunes son las dermopatías por hipersensibilidad, que aparecen después de la primera semana y pueden ser de intensidad variable, desde leves, que no contraindican la continuación de su uso, hasta generalizadas, en donde la medicación debe interrumpirse. Otro efecto colateral con Benznidazol es la polineuropatía periférica, que suele aparecer al final del tratamiento y en general indica la suspensión del fármaco. Los cuadros más graves, de depresión de la médula ósea, son excepcionales (Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas - (OPS, 1998)).

6.3. Nuevas Drogas: Inhibidores de la Biosíntesis de Ergoesteroles (IBEs)

Durante las últimas dos décadas, varias líneas de investigación han demostrado consistentemente que *T. cruzi*, así como la mayoría de los hongos y levaduras, requiere esteroles específicos para la viabilidad celular y la proliferación en todas las etapas de su ciclo de vida. En particular, la ruta de biosíntesis de ergosterol ha sido validada químicamente *in vitro,* a distintos niveles (Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003).

Desafortunadamente, varios estudios han demostrado que los IBEs disponibles en el mercado, con gran éxito para el tratamiento de micosis (como ketoconazol, itraconazol o terbinafina), tienen efectos supresores pero no curativos contra las infecciones por *T. cruzi* en humanos o en animales de experimentación y no son capaces detener la progresión de la enfermedad (Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003). Sin embargo, en los últimos 15 años, nuevos derivados de triazoles, por ejemplo, D0870 (Zeneca Pharmaceuticals) y posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute, SPRI) (Fig. 5), que son potentes y selectivos inhibidores de la esterol C14α-desmetilasa (CYP51) dependiente del citocromo P-450 en hongos y protozoos, han demostrado producir cura parasitológica en modelos murinos de enfermedad de Chagas aguda y crónica (Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003; Urbina y col., 1996). Estos han sido los primeros compuestos en demostrar efectos curativos en ambas formas de la enfermedad. Posaconazol se registró en 2005 en la Unión Europea y Australia para el tratamiento y, en 2006, en los EE.UU. para la profilaxis de infecciones fúngicas invasivas y para la candidiasis resistente al tratamiento convencional. Está previsto que la evaluación del posaconazol en humanos, como droga anti-*T. cruzi,* se lleve a cabo dentro de los próximos 12 meses (Urbina, 2009).

Otros triazoles (Fig. 5), como TAK-187 (Takeda Chemical Company) (Corrales y col., 2005) (Urbina y col., 2003b), UR-9825 (Uriach & Company) (Guedes y col., 2004; Urbina y col., 2000) y ravuconazol (ER-30346, Eisai Co.; BMS 207.147; Bristol-Myers Squibb) (Urbina y col., 2003a) también presentan actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo*. En particular, ravuconazol también ha demostrado ser muy activo contra *T. cruzi in vitro*, pero su actividad *in vivo* en ratones fue limitada, muy probablemente debido a las inadecuadas propiedades farmacocinéticas en este modelo animal (vida media terminal de 4,5 h) (Urbina y col., 2003a). Del mismo modo, la actividad de ravuconazol en un modelo canino de la enfermedad aguda de Chagas resultó ser de supresión, no curativo, un resultado que se atribuyó de nuevo a la vida media relativamente corta de los compuestos en los perros (8,8 h) (MT Bahía y JA Urbina, observaciones no publicadas). Sin embargo, estos resultados no necesariamente descartan la posible utilidad de este compuesto en el tratamiento de las infecciones humanas por *T. cruzi*, ya que su concentración mínima inhibitoria contra amastigotes intracelulares (1 nM) es

1,000-5,000 veces inferiores a los niveles alcanzables en el plasma humanos tras múltiples dosis orales, y su de la vida media terminal en el hombre es ≥ 120 h (Mikamo y col., 2002). Este compuesto es otro de los principales candidatos para ensayos clínicos en relación con los pacientes la enfermedad de Chagas y está pronosticada su evaluación para este año.

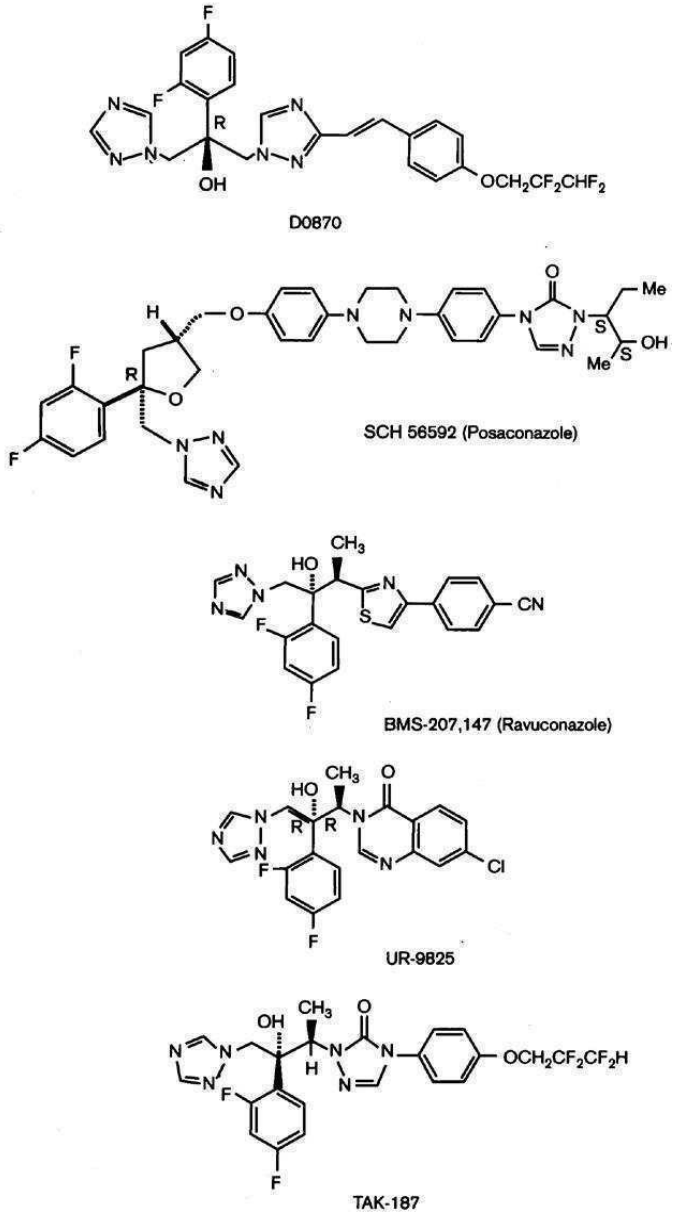

Fig. 5. Estructuras químicas de los triazoles, inhibidores específicos de la esterol C14α-desmetilasa (CYP51) de hongos y protozoos, con actividad curativa en modelos animales de enfermedad de Chagas aguda y crónica.

Las principales ventajas de los IBEs respecto a las terapias actualmente disponibles son los de mayor potencia y selectividad en tanto infecciones agudas como crónicas,

actividad contra las cepas de *T. cruzi* resistente a benznidazol y nifurtimox, así como mejor tolerabilidad y perfiles de seguridad. Las limitaciones pueden incluir la complejidad y el coste de fabricación de los nuevos compuestos. Como con cualquier nuevo fármaco, tales compuestos requieren numerosas pruebas clínicas antes de ser introducidos para uso clínico, y la complejidad de tales estudios, sobre todo en pacientes crónicos, se verá agravado por las limitaciones actuales en la verificación de la verdadera cura parasitológica para *T. cruzi* infecciones. Actualmente la alternativa es la utilización de la PCR para evaluar positividad en los pacientes antes y después del tratamiento, como indicador de la eficacia etiológica. En este sentido, este año se proyecta comenzar protocolos de fase I en pacientes con las drogas posaconazol y ravuconazol. El Posaconazol será evaluado en el hospital Valle d-Hebron en Barcelona, España y el Ravuconazol por el Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) y Médicos Sin Fronteras en Cochabamba, Bolivia. Estas serán las primeras drogas racionalmente diseñadas en ser evaluadas en ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

6.4. Criterio de cura

El único criterio de cura aceptado hasta el momento, es la negativización persistente de la serología, que antes del tratamiento se encontraba positiva. La experiencia indica que para llegar a ella, debe esperarse un tiempo proporcional al tiempo de infección. En los lactantes con transmisión connatal, se logra la negativización hasta en dos años. En la fase aguda, si se ha tratado durante los primeros 30 días del inicio de los síntomas, la serología se negativiza en 3 a 5 años. En la fase crónica reciente se logran esos resultados en 5 a 10 años y en aquellos tratados durante la fase crónica tardía, en general entre 20 y 30 años después (Rassi, 2003). Existen diferencias individuales y comienzan a surgir evidencias de que también habría diferencias regionales en cuanto al tiempo en que se obtienen estos cambios. Para que el seguimiento sea más eficaz, se recomienda que se guarden muestras de suero de cada paciente antes del tratamiento, que servirán para efectos comparativos, para cotejar con muestras obtenidas durante el seguimiento. Esto se puede lograr con facilidad

conservando los sueros en 50% de glicerina, que permite la manutención de los anticuerpos con sus características originales, sin pérdida de título (Rassi, 2004).

6.5. Criterios de falla terapéutica

Son parasitológicos, dado que el hallazgo de parásitos después del tratamiento, demuestra claramente que el paciente continúa infectado y que el medicamento usado ha sido ineficaz (Schijman y col., 2003). A largo plazo, puede sospecharse la ineficacia por medio de la serología, por ejemplo, un niño tratado en la fase aguda o en la fase crónica reciente, que después de 10 años persiste con una concentración de anticuerpos similar a la del inicio (Luquetti, 1998).

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

1. Desarrollar metodologías de tipificación molecular que permitan estudiar la variabilidad genética de las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* presentes en vectores, reservorios animales y humanos infectados, procedentes de diferentes áreas endémicas de la Argentina.

2. Desarrollar metodologías para la cuantificación precisa de *T. cruzi* directamente a partir de muestras biológicas.

Objetivos Específicos.

1 -Buscar secuencias genómicas de *T. cruzi* que sirvan como blanco para desarrollar métodos de tipificación molecular altamente sensibles y específicos, capaces de caracterizar las poblaciones parasitarias naturales directamente de muestras biológicas infectadas.

2 -Desarrollar procedimientos de amplificación génica para tipificar con distinto grado de resolución las entidades parasitarias presentes en las muestras biológicas infectadas.

3- Desarrollar sistemas de cuantificación de la carga parasitaria que sirvan como herramientas para el análisis del riesgo de reactivación chagásica en pacientes inmunosuprimidos.

4- Desarrollar sistemas de cuantificación de la carga parasitaria que permitan una valoración temprana de la eficacia o el fracaso de nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Soluciones, tampones y medios de cultivo

1.1.1 Soluciones generales

Acetato de Sodio 3M pH 5,2 (1L): 408,1g de Acetato de Sodio Trihidratado; 800ml de H_2O; llevar a pH 5,2 con Acido Acético Glacial. Completar con H_2O hasta volumen. Esterilizar por autoclave.

Acrilamida-Bisacrilamida 29:1 (100ml): 29g acrilamida; 1g bisacrilamida; H_20 MQ hasta volumen. Filtrar. Conservar a 4°C en botella oscura.

BrEt: 10mg/ml de Bromuro de Etidio en H_20. Conservar a T° amb en botella oscura.

Cloroformo-Isoamílico 24:1 (100ml): Cloroformo 96ml; Alcohol Isoamílico 4ml.

EDTA 0,5 M pH 8 (250ml): 46,5g EDTA; 175ml H_20; agitar con calor; llevar a pH 8,0 con NaOH 10N. Esterilizar en autoclave.

Fenol-Cloroformo 1:1 (100ml): Fenol 50ml; Cloroformo 50ml (saturado con tampón Tris 0,1M pH 8,0).

Fisiológica (100ml): NaCl 9gr; completar con H_20. Esterilizar en autoclave.

Glicógeno: 20mg/ml en H_20.

Hidróxido de Sodio 0,4M (1L): 16gr NaOH. Llevar a 1L con H_20.

IPTG 100 mM: 2,4mg de IPTG en 10ml de H_20.

X-Gal 2%: 0,2g de X-Gal en DMF. Conservar a –20°C en oscuridad.

1.1.2 Solución para preparar bacterias competentes

Inoue: MOPS 10mM; KCl 250mM; $CaCl_2$ 15mM; $MnCl_2$ 55mM; pH 6,7.

1.1.3 Soluciones para la minipreparación de ADN plasmídico

Solución I: Tris-HCl 25mM; Glucosa 50mM; EDTA 10mM; pH 8,0. Esterilizar en autoclave.

Solución II: NaOH 0,2N; SDS 1% (p/v).

Solución III (100ml): Acetato de Potasio (5M) 60ml; Acido Acético Glacial 11,5ml; H_20 28,5ml.

1.1.4 Soluciones de hibridización de membranas con ADN

Solución pre-hibridización: 4% leche descremada Molico; NaCl 1M; Citrato de Sodio 0,1M; SDS 0,1%.

Solución hibridización: solución de pre-hibridación (el mínimo volumen que bañe la membrana); sonda marcada radiactivamente.

1^{era} solución de lavado: NaCl 0,3M; Citrato de Sodio 0,03M; SDS 0,2%.

2da solución de lavado: Citrato de Sodio 0,1M; SDS 0,1%.

1.1.5 Soluciones sistema Luminex

1.5x TMAC: 4,5M cloruro de tetrametilamonio, 75mM Tris–HCl, pH 8.0, 6mM EDTA, pH 8.0, 0.15% Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine sal de sodio); guardar a temperatura ambiente.

1x TMAC: 3M cloruro de tetrametilamonio, 50mM Tris–HCl, pH 8.0, 4mM EDTA, pH 8.0, 0.1% Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine sal de sodio); guardar a temperature ambiente.

MES 0,1M: 1,95gr de acido 2-(N-morfolino) etanosulfonico en 100mL de dH_20, pH 4,5.

Tween-20 0,02%: 2,45gr de Monolaurato de polioxietilen sorbitan en 100 mL de dH_20.

SDS 0,1%: 2,88gr de dodecilsulfato sódico en 100mL de dH_20.

1.1.6 Tampones generales

GE: Cloruro de Guanidina 6M; EDTA 0,2M, pH 8.0.

Siembra de ADN 6X: Glicerina 60%; Azul de Bromofenol 0,25%; Xilencianol 0,25%.

TAE (1L): Tris Base 4,84g; Acido Acético Glacial 1,034ml; EDTA (0,5M; pH 8,0) 2ml.

TBE (1L): Tris Base 10,8g; Acido Bórico 3,1g; de EDTA (0,5M; pH 8,0) 4ml.

TE: Tris-HCl 10mM; EDTA (pH 8,0) 1mM.

Tris-HCl 1M pH 8,0 (1L): Tris Base 121g; H_20 700ml; llevar a pH 8,0 con HCl 5N. Completar con H_20.

1.1.7 Medios de cultivo de *E. coli*

LB (Luria-Bertani) (1L): Triptona 10g (Difco, Detroit, MI, USA); Extracto de Levadura 5g (Difco, Detroit, MI, USA); NaCl 10g. Esterilizar en autoclave.
LB-Ampicilina: LB + 100µg/ml de Ampicilina. Agregar el antibiótico posteriormente a la esterilización (55°C aprox).
LB-Kanamicina: LB + 50µg/ml de Kanamicina. Agregar el antibiótico posteriormente a la esterilización (55°C aprox).
LB-Agar: LB + 1,5% Agar (Difco, Detroit, MI, USA). Esterilizar en autoclave.
SOB (1L): Triptona 20g; Extracto de levadura 5g; NaCl (5M) 2ml; KCl (100mM) 25ml. Autoclavar y agregar 10ml de $MgCl_2$ (1M) y 10ml de $MgSO_4$ (1M).
LB-Puromicina: para el NCI

1.1.8 Medios de cultivo de *T. cruzi*

LIT (Liver Infusion Tryptose): 5g de liver infusion, 5g de triptosa, 68ml de NaCl 1M, 5.3ml de KCl 1M, 22ml de HPO4Na2 1M y 10ml de glucosa 20%. Se autoclavó y se agregó 1ml de Hemina, se filtró y se agregó Estreptomicina/Penicilina 100x y 10% de suero fetal bovino, llevar a volumen de 1L con dH_20.

1.2 Reactivos

1.2.1 Marcadores de peso molecular de ADN

10 bp DNA ladder (Invitrogen™): pesos moleculares (pb): 10- 20- 30- 40- 50- 60- 70- 80- 90- 100- 110- 120- 130- 140- 150- 160- 170- 180- 190- 200- 210- 220- 230- 240- 250- 260- 270- 280- 290- 300- 310- 320- 330.

25 bp DNA ladder (Invitrogen™): pesos moleculares (pb): 25- 50- 75- 100- 125- 150- 175- 200- 225- 250- 275- 300- 325- 350- 375- 400- 425- 450- 500.

100 bp DNA ladder (Invitrogen™): pesos moleculares (pb): 100- 200- 300- 400- 500- 600- 700- 800- 900- 1.000- 1.100- 1.200- 1.300- 1.400- 1.500- 2.072.

1 kb plus DNA ladder (Invitrogen™): Pesos moleculares (pb): 100- 200- 300- 400- 500- 650- 850- 1.000- 1.650- 2.000- 3.000- 4.000- 5.000- 6.000- 7.000- 8.000- 9.000- 10.000- 11.000- 12.000.

1.2.2 Enzimas

Las enzimas de restricción y sus tampones de reacción correspondientes son de New England BioLabs. En todos los casos fueron utilizadas siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La enzima Taq ADN polimerasa, cada una con sus respectivos tampones, fueron adquiridas en Invitrogen, Roche y Qiagen (ver sección PCR).

1.2.3 Cepa de *E. coli*

La cepa utilizada para los clonados de ADN fue DH5α F-80dlacZM15 (lacZYA-argF) U169 recA1 end A1 hsdR17 (r_k^-, m_k^+) phoA supE44- thi-1 gyrA96 relA1.
Las células se mantuvieron en placas de Petri con el medio de cultivo correspondiente, a 4°C por cortos períodos de tiempo (30 días), y en cultivos líquidos con 50% de glicerol a -70°C por períodos más prolongados.

1.2.4 Plásmidos

pGEM-T Easy: Este plásmido contiene el gen de β-lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina a aquellas bacterias que recibieron el mismo, permitiendo una selección positiva de los clones transformados cuando son crecidos en un medio con el mencionado antibiótico. Es un plásmido abierto que tiene dos timinas (T) sobresalientes en sus extremos 3´, las cuales pueden formar puentes de hidrógeno con las adeninas (A) de los extremos 5´ de los productos de PCR amplificados por la Taq ADN polimerasa. Este protocolo se conoce como "T-A overhangs". Además, el sitio de clonado se encuentra dentro de una región que codifica para una subunidad de la β-galactosidasa. Esto permite identificar los clones recombinantes mediante selección de las colonias blancas en placas que contienen IPTG y X-Gal (Fig. 6).

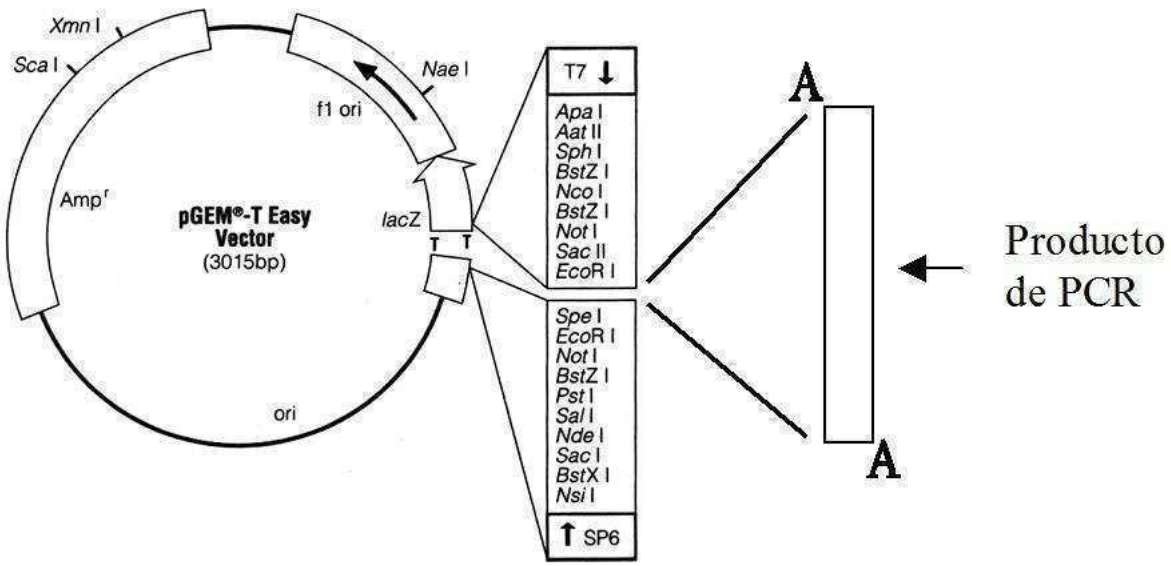

Fig. 6. Esquema del vector de clonado pGEM-T Easy. Imagen tomada Promega Corporation (Madison, Wi, USA)

pZErO-2: Este plásmido es utilizado como Control Interno (CI) de las reacciones de QPCR-SG, QPCR-MTq y sistema Luminex. Contiene clonada la secuencia que codifica la proteína Tip5;1 de *Arabidosis thaliana*, una acuaporina específica del polen que no tiene semejanza con ninguna proteína de mamíferos, insectos o tripanosomátidos (Fig. 7)(Soto y col., 2008). El plásmido fue gentilmente cedido por la Dra Gabriela Soto del grupo de Jorge Muschietti de INGEBI-CONICET.

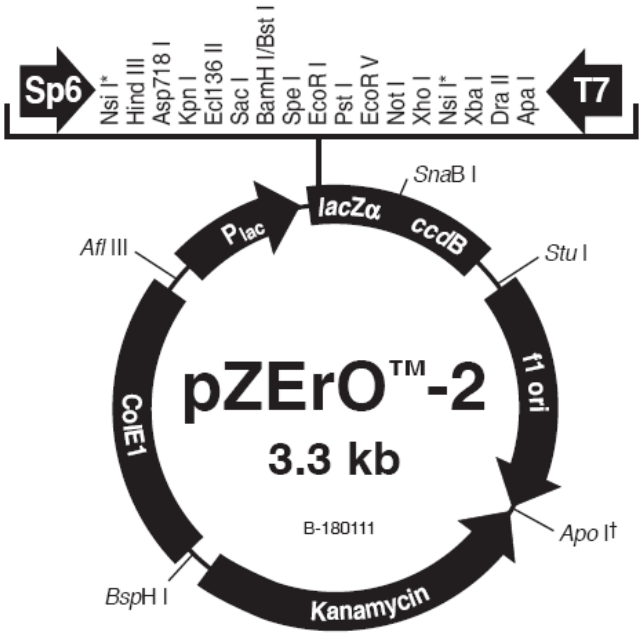

Fig. 7. Esquema del vector de clonado pZErO-2. Imagen tomada de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Para que su comportamiento durante la extracción y amplificación se asemeje al de ADN cromosómico, el plásmido es previamente linealizado con la enzima de sitio de corte único *Pst I*.

Cuando una secuencia es clonada en el sitio de clonado múltiple, se interrumpe la secuencia de la proteína de fusión LacZ-ccdB, que es bactericida, permitiendo así el crecimiento solo de aquellas que hayan incorporado una secuencia en su sitio de clonado múltiple. Además, el plásmido confiere resistencia al antibiótico kanamicina a aquellas bacterias que recibieron el mismo, permitiendo una selección positiva de los clones transformados cuando son crecidos en un medio con el mencionado antibiótico.

2. Métodos

2.1 Recolección, extracción y conservación de muestras

2.1.1 Muestras Humanas

Todos los pacientes analizados en esta tesis doctoral pertenecen a cohortes seguidas en los centros de Salud que colaboran con nuestro laboratorio, en el marco de distintos protocolos de investigación clínica, debidamente aprobados por los correspondientes Comités de ética, docencia e investigación de los diferentes centros de salud. Dichos pacientes fueron informados sobre la utilización de las muestras tomadas debiendo firmar, previo a ello, un consentimiento para tal fin. Para los pacientes menores de edad, dicha autorización debió ser estudiada y firmada por el mayor responsable.

Las muestras fueron colectadas en dichos centros de salud, por personal calificado mediante las técnicas y equipos de rutina utilizados en cada institución.

2.1.1.1. Sangre periférica

Kit comercial de columnas de sílica

Las muestras de sangre fueron extraídas e inmediatamente mezcladas con un volumen de tampón GE (formando la mezcla GEB). La solución GEB fue conservada a 4°C antes y después de su utilización, aún cuando está confirmada su gran estabilidad y conservación a T° amb.

En general, excepto aclaración, los volúmenes de extracción fueron de 10ml para pediátricos y adultos y de 1 o 2ml para los recién nacidos. La extracción se realizó mediante el kit de extracción de ADN "QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante para muestras sanguíneas y fluidos corporales con pequeñas modificaciones. Brevemente, dado que la sangre se encontraba mezclada con un volumen de tampón GE, se omitieron los 2 primeros pasos: 1) la digestión con proteinasa K, 2) el agregado del tampón "AL" (tampón caotrópico con hidrocloruro de guanidina). El resto de los pasos fueron llevados a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Fenol-Cloroformo

Se realizaron extracciones a partir de 100 µl de GEB. El protocolo se basa en una extracción de Fenol-Cloroformo, a saber:

1. Tomar 1 volumen de GEB + 1 volumen de Fenol-Cloroformo (1:1). Mezclar con Vortex por 15 seg.
2. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 min.
3. Agregar 1 volumen de agua destilada estéril. Mezclar con Vortex durante 15 seg.
4. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 min.
5. Trasvasar la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo sin arrastrar la interfase.
6. Agregar 1 volumen de Cloroformo. Mezclar con Vortex durante 15 seg.
7. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 min.
8. Trasvasar la fase acuosa (superior) a un nuevo tuvo sin arrastrar la interfase.
9. Agregar 2µl de glicógeno. Mezclar por inversión.
10. Agregar 1 volumen de isopropanol. Mezclar por inversión.
11. Precipitar a -20°C durante 2 hs.
12. Centrifugar a máxima velocidad durante 15 min.
13. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500µl de etanol 70%.

14. Centrifugar a máxima velocidad durante 15 min.
15. Descartar el sobrenadante. Secar el tubo en estufa a 37°C por 10 min.
16. Disolver el precipitado en 50µl de H20 destilada estéril.
17. Conservar a -20°C hasta su utilización.

2.1.1.2. Tejido

Dos tipos de muestras tisulares fueron procesadas. Muestras frescas y fijadas. Las muestras frescas se tomaron y conservaron en solución fisiológica estéril a 4°C. La extracción se realizó mediante el kit de extracción de ADN "QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante.
Otras muestras se fijaron en formaldehido 4% y se embebieron en parafina (según protocolo de las instituciones de origen) para la mejor conservación del material genético y se guardaron a 4°C. La extracción se realizó mediante el kit de extracción de ADN "QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.1.1.3. Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)

La muestra fue extraída según protocolo de las instituciones de origen y conservada a -20°C. La extracción se realizó mediante el kit de extracción de ADN "QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante para muestras sanguíneas y fluidos corporales.

2.1.2 Muestras murinas

2.1.2.1 Músculo esquelético y cardíaco

Las muestras fueron colectadas por la Dra. Paola Zago del Laboratorio de Patología. Experimental de la Universidad Nacional de Salta, e inmediatamente conservadas a -70°C. Fueron enviadas congeladas a nuestro laboratorio donde permanecieron a -70°C hasta su extracción mediante el kit de extracción de ADN

"QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante para muestras tisulares.

2.1.2.1 Ganglio y bazo

Las muestras fueron extraídas con DNAzol (Gibco BRL, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante por la Dra. Catalina Alba del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA. El ADN purificado fue enviado al INGEBI congelado en TE 1X y se conservó a -20°C hasta su análisis.

2.1.3 Muestras de heces de triatominos

Se extrajeron 25µl de la muestra fecal con DNAzol (Gibco BRL, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado fue conservado en TE1X a -20°C hasta su análisis.

2.1.4 Muestras de cultivos de *T. cruzi*

Se extrajeron mediante el kit de extracción de ADN "QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante para cultivos celulares.

2.1.5 ADN plasmídico partir de cultivos bacterianos

1. Crecer la colonia de interés en 3ml de medio LB con el antibiótico adecuado durante toda la noche a 37°C con agitación.
2. Cosechar las células por centrifugación durante 3 min a 5.000 rpm.
3. Resuspender las células en 300µl de solución I.
4. Agregar 300µl de solución II para lisar las células. Incubar 5 min a T° amb.
5. Agregar 300µl de solución III fría para precipitar ADN genómico y proteínas. Mezclar suavemente por inversión e incubar en hielo por 10 min.

6. Centrifugar a máxima velocidad a 4°C durante 15 min.
7. Trasvasar el sobrenadante a un tubo nuevo con 4µl de ARNasa-A (10 mg/ml). Incubar a 37°C por 1 h.
8. Extraer las proteínas con 600µl de Cloroformo-Isoamílico (24:1). Agitar suavemente y centrifugar a máxima velocidad durante 2 min.
9. Trasvasar la fase acuosa (superior) y precipitar el ADN plasmídico mediante el agregado secuencial de 60µl de AcONa 3M y 600µl de isopropanol. Incubar a -20°C al menos 30 min.
10. Centrifugar a máxima velocidad a 4°C por 15 min. Descartar el sobrenadante.
11. Lavar el precipitado de ADN plasmídico con 500µl de etanol 70%. Centrifugar a máxima velocidad a 4°C por 15 min. Descartar el sobrenadante.
12. Secar el precipitado a T° amb o en estufa a 37°C y resuspender en 50µl de agua destilada estéril.

2.2 Reacciones de amplificación por PCR

2.2.1 Termocicladores

Para las reacciones de PCR convencionales se utilizaron termocicladores MJ Research modelo PTC-100 de tapa caliente.

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizaron termocicladores MJ Research Opticon II, Corbett Rotor Gene 6000, ambas de dos canales ópticos, y Stratagene Mx3000P con cuatro canales ópticos.

2.2.2 Mezclas de reacción y programas de ciclado

Los protocolos de PCR detallados en esta Tesis se pueden clasificar en dos grupos: i) Desarrollados por terceros (Tabla 4) y ii) Desarrollados en el marco de esta Tesis.

i) Protocolos desarrollados por terceros

PCR	Secuencia Blanco	Oligonucleótido		Rxn			Programa				Amplicón (pb)	UTD	S
		Nombre	Secuencia (5´-3´)	O	N	M	D	H	E	C			
ADNk	mini-círculos del kinetoplasto	121	AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA	2,5	250	3	94	68	72	5	330	Todos	5 fg
		122	GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA				94	64	72	35			
SL ac	Región intergénica del mini-exón	UTCC	CGTACCAATATAGTACAGAAACTG	1,5	250	3	94	70	72	3	157	Tc I	1pg
							94	68	72	3	200	Tc III / IV	1pg
							94	66	72	3			
		TC ac	CTCCCCAGTGTGGCCTGGG				94	64	72	3	157	Tc II / V / VI	1pg
							94	62	72	33			
SL I	Región intergénica del mini-exón	UTCC	CGTACCAATATAGTACAGAAACTG	1,5	250	3	94	70	72	3	425	Tc II / V / VI	5pg
							94	68	72	3			
							94	66	72	3			
		TC 1	TCCGCCACCTCCTTCGGGCC				94	64	72	3			
							94	62	72	33			
SL II	Región intergénica del mini-exón	UTCC	CGTACCAATATAGTACAGAAACTG	1,5	250	3	94	62	72	3	475	Tc I	5pg
							94	60	72	3			
		TC 2	CCTGCAGGCACACGTGTGTG				94	58	72	35			
24Sα	ADNr 24sα	D76	GGTTCTCTGTTGCCCCTTTT	4	250	3	94	64	72	2	275	Tc I	
							94	62	72	2			
		D75	GCAGATCTTGGTTGGCGTAG				94	60	72	2	275-290	Tc II / III / IV / V / VI	
							94	58	72	35			
24S - αHN	Heminested 2do ciclado	D76	GGTTCTCTGTTGCCCCTTTT	5	250	2	94	60	72	3	125	Tc I	1pg
							94	57	72	3	140	Tc II	100fg
		D71	AAGGTGCGTCGACAGTGTGG								125-140	Tc V	100fg
							94	55	72	35	140	Tc VI	100fg
A 10	Fragmento A10e	pr1	CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA	0,5	250	3	94	60	72	35	690	Tc II	
		p6	GTGATCGCAGGAAACGTG								630	Tc III / IV / V / VI	
	Heminested 2do ciclado	pr1	CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA	0,5	250	3	94	60	72	35	580	Tc II	10pg
		pr3	TGCTTTATTACCCCATGCCACAG								525	Tc III / IV / V / VI	1pg
Sat	Repeticiones satélite	Tcz1	CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT	0,75	250	3	94	57	72	40		Específico de *T.cruzi*	5 fg
		Tcz2	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG										
18S	ADNr 18S	V1	CAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCA	2	250	2	94	70	72	3	165	Tc II, TcVI*	ND
		V2	TTGAGGGAAGGCATGACACATGT				94	68	72	3			
							94	65	72	33			

Tabla 4. Resumen de los protocolos de las reacciones de PCR desarrolladas por terceros utilizadas en el marco de esta tesis. Rxn: Composición de la reacción. O: oligos (µM), N: dNTPs (mM), M: $MgCl_2$ (mM), D: desnaturalización, H: hibridación, E: elongación, C: cantidad de ciclos.

PCR-ADNk: dirigida contra las regiones variables del minicírculo del cinetoplasto de *T. cruzi* (ADNk) (Tabla 4).

PCR-SLac: dirigida contra la región polimórfica intergénica del miniexón de *T. cruzi* (Tabla 4). Genera un amplicón diferencial para las UTD Tc III/IV.

PCR-SLI: amplifica la región polimórfica intergénica del miniexón de *T. cruzi* I (Tabla 4).

PCR-SL$_{II}$: amplifica la región polimórfica intergénica del miniexón de *T. cruzi* UDTs II/V/VI (Tabla 4).

PCR-24Sα: amplifica el dominio D7 del gen ribosomal 24sα de trypanosomatídeos. (Tabla 4).

PCR-24Sα-HN: segundo ciclado "hemi-nested" dirigido contra amplicones del primer ciclo (PCR-24sα) en *T. cruzi* (Tabla 4).

PCR-A10: amplifica una región del fragmento cromosómico A10e (Tabla 4).

PCR-Sat: dirigida contra la secuencia nuclear repetitiva satélite (Tabla 4). Es altamente sensible y específica para *T. cruzi*.

PCR-18S: amplifica una región del gen ribosomal 18S (Tabla 4).

ii) Protocolos desarrollados en el marco de esta Tesis

Determinación de la relación ADN satélite/P2α: Con el fin de analizar la variabilidad en los distintos UTD de *T. cruzi* en el número de copias de secuencias de ADN satélite detectadas por Q-PCR, se cuantificaron de manera comparativa utilizando como normalizador la secuencia de copia única de la proteína ribosomal P2α (GenBank XM_800089). Los ensayos para la cuantificación del gen P2α se realizaron con 1mM de los oligonucleótidos P2α-Fw (5´-ATGTCCATGAAGTACCTCGCC-3´) y P2α-Rv (5´-GCGAATTCTTACGCGCCCTCCGCCACG-3´). Todos los demás reactivos fueron idénticos a los utilizados para *T. cruzi* SG Q-PCR. Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado: 5 min de preincubación en 95°C, la amplificación por PCR se llevó a cabo en 40 ciclos (94°C durante 10 seg, 60°C por 15 seg y 72°C durante 10 seg). La placa fue leída en 72°C al final de cada ciclo.

PCR-Lg: Dado que la secuencia de las repeticiones de ADN satélite en parásitos de UTD Tc I/IV son diferentes a las que contiene los parásitos de UTD Tc II/III/V/VI, hemos desarrollado un método para distinguir entre ambos grupos de acuerdo a la temperatura de desnaturalización de los amplicones de ADN satélite. Para ello amplificamos las repeticiones satélite utilizando 0,5µM de los oligonucleótidos TcZ1 (5´-CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT-3´) y Sat-Rv (5´-

TTCAGRGTTGTTTGGTGTCCAGTG-3´) y las siguientes condiciones de ciclado: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 10 seg, 65°C durante 10 seg, y 72°C durante 10 seg, con la adquisición de fluorescencia en 81.5°C, y un paso final de amplificación de 2 min a 72°C. Una vez finalizada la reacción de PCR se realiza una curva de desnaturalización de los amplicones que consiste en una etapa inicial de desnaturalización de 5 seg a 95°C, seguida por un incremento gradual en la temperatura de 0,1°C/seg de 72-90°C. Los grupos de parásitos son distinguidos de acuerdo con las temperaturas de desnaturalización (Tm) de los amplicones. Ya que el ADN satélite se organiza en repeticiones en tándem, si más de 0,05 equivalentes genómicos de *T. cruzi* (equivalente a aproximadamente 10 p/ml) se cargan en el tubo de reacción, dímeros de las secuencias satélite se amplifican preferencialmente dando lugar a un pico de temperatura de desnaturalización, típicamente por encima de los 86°C para ambos grupos de parásitos.

Los amplicones secuenciados de las repeticiones satélite se amplificaron con los oligonucleótidos TcZ1 y TcZ2 (GenBank números de acceso EU728662-EU728667).

PCR-Inter-SIRE-1: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL y contiene 0,5 µM del oligonucleótido INS-R (Tabla 5), 3 mM MgCl2, 250 mM de cada dNTP, 0,5 U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, USA) y 20 ng de ADN. Las condiciones de ciclado son: 5 min de pre-incubación a 95°C, 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 54°C durante 30 seg y 72°C durante 1 min.

PCR-Inter-SIRE-2: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL y contiene 0,5 µM de los oligonucleótidos INS-Fw e INS-Rv (Tabla 5), 3 mM MgCl2, 250 mM de cada dNTP, 0,5 U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, USA) y 20 ng de ADN. Las condiciones de ciclado son: 5 min de pre-incubación a 95°C, 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 54°C durante 30 seg y 72°C durante 1 min.

PCR-Inter-RE: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL y contiene 0,5 µM de los oligonucleótidos INS-Fw, INS-Rv, TcIRE-Rv y NARTc-Rv (Tabla 5), 3 mM MgCl2, 250 mM de cada dNTP, 0,5 U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, USA) y 20 ng de ADN. Las condiciones de ciclado son: 5 min de pre-

incubación a 95°C, 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 54°C durante 30 seg y 72°C durante 1 min.

Oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)
TcIRE-Rv	CAAGGGGACACACACACAGAGG
NARTc-Rv	CAACGGCTGGGCATTGAACAGGA
INS-Fw	TCCATAGATWATTTCAGGATCC
INS-Rv	ATTAAGTTAGCCAGCTCTMCC

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR inter elementos repetitivos.

PCR Pr1-Pr3: Esta reacción de PCR es una modificación "hemi-nested" y en tiempo real del ensayo A-10 propuesto por Brisse y colaboradores para distinguir a los UTD Tc II y Tc VI (Brisse y col., 2000). Primera Ronda: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL y contiene 0,5 µM de los oligonucleótidos Pr1 (5´- CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA-3´) y P6 (5´- GTGATCGCAGGAAACGTG-3´), 3 mM MgCl2, 250 mM de cada dNTP, 0,5 U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, USA) y2 µL de muestra de ADN. Las condiciones de ciclado son: 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 60°C durante 30 seg y 72°C durante 45 seg. Segunda Ronda: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL y contiene 0,5 µM de los oligonucleótidos Pr1 y Pr3 (5´- TGCTTTATTACCCCATGCCACAG -3´), 3 mM MgCl2, 250 mM de cada dNTP, 0,5 U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, USA) SYBR Green (Invitrogen, Life Technologies, EE.UU.) en una concentración final de 0,5 X y 2 µL de muestra de ADN de la primera ronda. Las condiciones de ciclado son: 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 60°C durante 30 seg y 72°C durante 45 min. La fluorescencia es leída a 72°C al final de cada ciclo. Una vez finalizada la reacción de PCR se realiza una curva de desnaturalización de los amplicones que consiste en una etapa inicial de desnaturalización de 5 seg a 95°C, seguida por un incremento gradual en la temperatura de 0,1°C/seg de 72-90°C. Los grupos de parásitos son distinguidos de acuerdo con las temperaturas de desnaturalización (Tm) de los amplicones. Los amplicones también pueden ser distinguidos en una corrida de gel de agarosa 2,5%.

PCR- MTq: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µl con 5 µL de muestra de ADN y la mezcla de reacción comercial QIAGEN Multiplex PCR Kit en una concentración final 1X. Se utilizan los oligonucleótidos y sondas a las concentraciones establecidas en la Tabla 6.

Las condiciones de ciclado son: 15 min de pre-incubación a 95°C, 45 ciclos de 95°C durante 30 seg y 60°C durante 1 min. La fluorescencia es leída a 60°C al final de cada ciclo.

Oligonucleótido	Secuencia	Concentración Final (nM)
UTCC-Fw	CAGTTTCTGTACTATATTGGTACG	500
TcI-Rv	CGATCAGCGCCACAGAAAGT	500
TcII/V/VI-Rv	GGAAAACACAGGAAGAAGC	500
TcIII-Rv	CATTTTTATGAGGGGTTGTTCG	500
TcIV-Rv	CATTTTTATTAGGGGTTGTACG	500
Sonda		
TcI-Tq	Fam-CTC**C**TTC**A**T**G**TT**T**GT**G**TCG-BHQ1	100
TcII/V/VI-Tq	Hex-TATA**C**C**C**ATATA**T**ATA**T**A**G**C-BHQ1	50
TcIII-Tq	Quas670-AATCGCG**T**GTATGCACCGT-BHQ3	50
TcIV-Tq	Calrd610-GCCCCCGACGCCGTCCGTG-BHQ2	100

Tabla 6. Oligonucleótidos y sondas utilizados en el ensayo de PCR-MTq. Las bases modificadas LNA están indicadas en negrita y subrayadas. En el extremo 5´ de cada sonda se indica el fluoróforo y en el extremo 3´ se indica el "quencher".

QPCR-SG-Tc: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL y contiene 0,5 µM de los oligonucleótidos Sat-Fw (5´-GCAGTCGGCKGATCGTTTTCG-3´) y Sat-Rv (5´-TTCAGRGTTGTTTGGTGTCCAGTG-3´), 3 mM MgCl2, 250 mM de cada dNTP, 0,5 U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, USA) SYBR Green (Invitrogen, Life Technologies, EE.UU.) en una concentración final de 0,5 X y 2µL de muestra de ADN. Las condiciones de ciclado son: 5 minutos de pre-incubación a 95°C, 40 ciclos de 94°C durante 10 seg, 65°C durante 10 seg y 72°C durante 10 seg. La fluorescencia es leída a 72°C al final de cada ciclo.

QPCR-SG-CI: El CI fue cuantificado utilizando 1µM de los oligonucleótidos, CI1-Fw (5´-AACCGTCATGGAACAGCACGTAC-3´) y CI1-RV (5´-CTAGAACATTGGCTCCCGCAACA-3´). Todos los demás reactivos y condiciones de ciclado fueron idénticos a los utilizados para QPCR-SG-Tc.

QPCR-SG-TNFα: El número de células huésped en muestras de tejido murino fueron cuantificadas utilizando los oligonucleótidos TNF-5241 (5-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3) y TNF-5411 (5-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3) (Cummings y col) a una concentración final de 1 µM. Todos los demás reactivos y condiciones de ciclado fueron idénticos a los utilizados para QPCR-SG-Tc.

QPCR-SG-APOB: El número de células huésped en muestras de tejido humano fueron cuantificadas utilizando los oligonucleótidos ApoB-Fw (5´-TGGTGCTCACAAGGCGACACTAA-3´) y ApoB-Rv (5´-GGCGGCTTTCCCATCCAGACTA-3´) a una concentración final de 1 µM. Todos los demás reactivos y condiciones de ciclado fueron idénticos a los utilizados para QPCR-SG-Tc.

QPCR- MTq: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL; para la cuantificación de *T. cruzi* se utilizan 0,75 µM de los oligonucleótidos cruzi1 (5´-ASTCGGCTGATCGTTTTCGA-3´) y cruzi2 (5´-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3´) y 50 pM de la sonda cruzi3 (5´-Fam-CACACACTGGACACCAA-MGB-3´) (Piron y col., 2007); para la cuantificación del CI se utilizan 100pM de los oligonucleótidos CI-Tq-Fw (5´-ACCGTCATGGAACAGCACGTA-3´) y CI-Tq-Rv (5´-CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT-3´) y 50 pM de la sonda CI-MGB (5´-Hex-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-MGB-3´); 5 µL de muestra de ADN y la mezcla de reacción comercial FastStart PCR Master Mix de Roche en una concentración final 1X.

Las condiciones de ciclado son: 5 minutos de pre-incubación a 95°C, 45 ciclos de 94°C durante 10 seg y 54°C durante 45 seg. La fluorescencia es leída a 54°C al final de cada ciclo.

QPCR-Tq-Tc: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL con 0,75 µM de los oligonucleótidos cruzi1 (5´-ASTCGGCTGATCGTTTTCGA-3´) y cruzi2 (5´-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3´) y 50 pM de la sonda cruzi3 (5´-Fam-CACACACTGGACACCAA-MGB-3´) (Piron y col., 2007), 5 µL de muestra de ADN y la

mezcla de reacción comercial FastStart PCR Master Mix de Roche en una concentración final 1X.

Las condiciones de ciclado son: 5 min de pre-incubación a 95°C, 45 ciclos de 94°C durante 10 seg y 54°C durante 45 seg. La fluorescencia es leída a 54°C al final de cada ciclo.

QPCR-Tq-CI: La reacción se realiza en un volumen final de 20 µL con con 0,5 µM de los oligonucleótidos CI-Tq-Fw (5´-ACCGTCATGGAACAGCACGTA-3´) y CI-Tq-Rv (5´-CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT-3´) y 50 pM de la sonda CI-MGB (5´-Hex-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-MGB-3´), 5 µL de muestra de ADN y la mezcla de reacción comercial FastStart PCR Master Mix de Roche en una concentración final 1X.

Las condiciones de ciclado son: 5 min de pre-incubación a 95°C, 45 ciclos de 94°C durante 10 seg y 54°C durante 45 seg. La fluorescencia es leída a 54°C al final de cada ciclo.

2.2.3. Construcción de curvas estándar para QPCR

2.2.3.1 Para muestras de sangre periférica

Epimastigotes de la cepa Cl-Brener fueron añadidos a sangre humana no infectada a una concentración final de 10^4 p/ml y de inmediato se mezcló con un volumen de tampón de lisis GE. Con el GEB resultante se realizaron diluciones seriadas al décimo con GEB no infectada hasta cubrir un rango entre 10^4 y 0,001 equivalentes genómicos/ml. El último punto es de GEB no infectada. En total son 9 puntos. A los tres puntos de mayor concentración de *T. cruzi* se les agregó 5 unidades arbitrarias (UA) de CI (1 ng de plásmido linealizado), a los tres puntos intermedios se les agregó 1 UA de CI (200 pg de CI) y a los dos puntos con menor concentración de *T. cruzi* y a la GEB negativa se les agregó 0,1 UA de CI (20 pg de CI). La extracción se realizó mediante el kit de extracción de ADN "QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante para muestras sanguíneas y fluidos corporales con pequeñas modificaciones, al igual que para los pacientes. Brevemente, dado que la sangre se encontraba mezclada con un volumen de tampón

GE, se omitieron los 2 primeros pasos: 1) la digestión con proteinasa K, 2) el agregado del tampón "AL" (tampón caotrópico con hidrocloruro de guanidina). El resto de los pasos fueron llevados a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.3.2 Para muestras de tejido humano

A diferencia de lo utilizado para muestras de sangre periférica, en este caso no se utilizó un control interno heterólogo (CI) para normalizar los resultados entre distintas muestras, si no que se amplificó el gen humano de copia única que codifica la apolipoproteína B (APOB). Para ello construimos una curva estándar con células Jurkat. Se contabilizaron con cámara de Neubauer y se extrajeron con el kit de extracción de ADN "QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante para cultivos celulares.

2.2.3.3 Para muestras de tejido murino

Al igual que para las muestras de tejido humano, en este caso se amplificó un gen del huésped, el gen murino de copia única que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). Para ello construimos una curva estándar con células murinas NSF-60. Se contabilizaron con cámara de Neubauer y se extrajeron con el kit de extracción de ADN "QIAamp DNA Mini Kit" de QIAGEN (Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante para cultivos celulares.

2.3 Detección de amplicones por Luminex

2.3.1. Acoplamiento de las sondas a las microesferas fluorescentes

1 - Llevar una alícuota de polvo Pierce EDC desecado de -20 ° C a temperatura ambiente.

2 - Resuspender las microesferas por agitación con vórtex y sonicación durante aproximadamente 20 s.

3 - Transferir 100µL ($1x10^6$ microesferas) a un tubo de microcentrífuga de baja adhesión (USA Scientific).

4 - Centrifugar a ≥ 8.000 g durante 1-2 min.

5 - Eliminar el sobrenadante y resuspender las microesferas en 10µL MES 0,1 M, pH 4,5, por agitación con vórtex y sonicación durante aproximadamente 20 s. (MES se conserva a 4 ° C).

6 - Agregar 500 picomoles de sonda con grupo amino en el extremo 5´ a las microesferas resuspendidas y mezclar por agitación con vórtex. La secuencia de la sondas están en la tabla 7.

7 - Preparar una solución fresca de 10 mg/mL de EDC en dH_2O. Volver a colocar el polvo EDC con un desecante para su reutilización.

8 - Una por una, a cada reacción de acoplamiento, añadir 2,5 µL una solución fresca de EDC 10 mg/mL a las microesferas y mezclar por agitación con vórtex.

9 - Incubar durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, con agitación.

10 - Preparar una segunda solución fresca de 30mg/mL EDC en dH_2O.

11 - Una por una, a cada reacción de acoplamiento, añadir 2,5 µL una solución fresca de EDC 30 mg/mL a las microesferas y mezclar por agitación con vórtex .

12 - Incubar durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, con agitación.

13 - Añadir 500 µL de Tween-20 0,02% a las microesferas acopladas.

14 - Centrifugar a ≥ 8.000 g durante 1-2 min.

15 - Eliminar el sobrenadante y resuspender las microesferas acopladas en 500 µL de SDS 0,1% y mezclar por agitación con vórtex .

16 - Centrifugar a ≥ 8.000 g durante 1-2 min.

17 - Eliminar el sobrenadante y resuspender las microesferas acopladas en 20 µL de TE, pH 8,0, y mezclar por agitación con vórtex y sonicación durante aproximadamente 20 s. Es bueno dejar unos microlitros de detergente para evitar la aglutinación de las microesferas.

Sonda	Posición de Hibridización (pb)	Secuencia
TcI-Pr	25	NH2-CATAACCGCGACTCGCGGATTTGGA
TcII/V/VI-Pr	116	NH2-ATATGRCGGACAGACCCACAA
TcIII-Pr	34	NH2-CAAACATAACGCAAAAGCGGATTTG
TcIV-Pr	-	-
CI-Pr	240	NH2-TGAATCCAGCGGTTACGTTTGCGAT

Tabla 7. Secuencias y posición de las sondas utilizadas en el ensayo de Luminex.

2.3.2. Amplificación de las secuencias de mini-exón por PCR

La reacción se realiza en un volumen final de 20 µl con 5 µl de muestra de ADN y la mezcla de reacción comercial QIAGEN Multiplex PCR Kit en una concentración final 1X. Se utilizan los oligonucleótidos detallados en la Tabla 8.

Las condiciones de ciclado son: 15 min de pre-incubación a 95°C, 45 ciclos de 95°C durante 30 seg y 60°C durante 1min.

Oligonucleótido	Posición de Hibridización (pb)	Secuencia	Concentración Final (nM)
UTCC-Fw	1	Biotina-CAGTTTCTGTACTATATTGGTACG	500
TcI-Rv	425	CGATCAGCGCCACAGAAAGT	500
TcII/V/VI-Rv	335	GGAAAACACAGGAAGAAGC	500
TcIII-Rv	452	CATTTTTATGAGGGGTTGTTCG	500
TcIV-Rv	545	CATTTTTATTAGGGGTTGTACG	500
CI2-Fw	40	GAATGCGTTGAGATGTTATGTA	500
CI2-Rv	329	Biotina-AGGCAATCATCTGAGAAGTC	500

Tabla 8. Secuencias, posición y concentración final de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de mini-exón.

2.3.3. Hibridización de las sondas a los productos de PCR

1. Seleccione el set de oligonucleótido-microesferas adecuado.

2. Resuspender las microesferas por agitación con vórtex y sonicación durante aproximadamente 20 s.

3. Preparar una solución de microesferas con 3µL de cada set de microesfera-sonda por cada 1 ml de 1.5x TMAC. Para cada reacción se requieren 33µL de solución de microesferas.

4. Mezclar la solución de microesferas por agitación con vórtex y sonicación durante aproximadamente 20 s.

5. A cada pocillo muestra o blanco agregar 33µL de la solución de microesferas.

6. A cada pocillo muestra o blanco añadir 17µL de TE, pH 8,0.

7. A cada pocillo muestra añadir 10µL de la reacción de PCR adecuada y 7µL de TE.

8. Mezclar suavemente pipeteando hacia arriba y abajo varias veces con una pipeta multicanal.

9. Cubrir la placa de reacción para evitar evaporación e incubar a 95 ° C durante 5 min para desnaturalizar el ADN amplificado biotinilado.

10. Incubar la placa de reacción a 52°C (temperatura de hibridación para este ensayo) durante 15 min.

11. Centrifugar la placa de reacción a ≥ 2.250 g durante 3 minutos para que sedimenten las microesferas.

12. Durante la centrifugación preparar solución reportera fresca diluyendo estreptavidina-Rphycoerythrina a 4 µg/ml en TMAC 1x. Se requieren 75 µl de solución por pocillo.

13. Después de la centrifugación, quite cuidadosamente 45 µl del sobrenadante con una pipeta de ocho canales para extraer simultáneamente el sobrenadante de cada columna de pocillos. Tenga cuidado de resuspender las microesferas.

14. Devuelva la placa de reacción a los 52°C.

15. Agregar 75 µl de solución reportera a cada pocillo y mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo varias veces con una pipeta multicanal.

16. Incubar la placa de reacción a 52 ° C durante 5 min.

17. Analizar 50µL de cada reacción contando 100 microesferas a 52°C en el analizador Luminex según las instrucciones del fabricante.

2.3.4. Detección y análisis de los datos

Colocar en un pocillo de reacción a todos los componentes menos el producto de PCR para determinar la fluorescencia basal de cada grupo de microesferas. Los valores basales de MFI (Intensidad de Fluorescencia Media) son sustraídos de los valores de MFI de las muestras para obtener los valores de MFI netos. En este ensayo utilizamos un valor de corte de MFI neto para considerar a una muestra positiva de dos veces mayor al valor de MFI basal. También se recomienda para que la muestra sea considerada positiva, que tenga un valor de fluorescencia neta >1000 (Dunbar and Jacobson, 2007).

2.4. Estudios de electroforesis de ADN

2.4.1 Geles de agarosa

2.4.1.1 Identificación de productos de PCR

El porcentaje de agarosa usado fue variable, oscilando en el rango de 0,8- 4%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon fundiendo la agarosa en el volumen correspondiente de tampón TAE 1X. La disolución de la misma se realizó por calentamiento en horno microondas. Posteriormente, tras el enfriado parcial de la solución, se agregó 2,5 µl de BrEt cada 50 ml de gel. Previo a la siembra, las muestras de ADN fueron mezcladas con 0,2 volúmenes de tampón de siembra 6X. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 1X a voltaje constante (100-120 V) en cubas de electroforesis horizontales. Se utilizaron marcadores de peso molecular Invitrogen. El ADN se visualizó mediante transiluminador de emisión UV a 302nm (transiluminador "Baby Imager"- Appligene). Los geles fueron fotografiados o guardados digitalmente.

2.4.1.2 Southern Blot

Esta técnica fue utilizada para el análisis de la distribución de elementos repetitivos SIRE en el genoma de *T. cruzi*.

Digestión y transferencia: El ADN genómico de *T. cruzi* fue totalmente digerido con HindIII y los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y luego transferidos a membranas de nitrocelulosa HYBOND N+ (Ammersham, UK). Esta membrana está cargada positivamente y permite la adherencia de ácidos nucleicos sin necesidad reacciones químicas. La transferencia desnaturalizante se lleva a cabo en NaOH 0,4 N en un dispositivo de transferencia pasiva. En el mismo, el medio alcalino solubiliza, desnaturaliza y transfiere el ADN por capilaridad a la membrana.

Construcción y purificación de sondas: Como molde para la construcción de la sonda se amplificó una región del elemento SIRE con los oligonucleótidos SIRE-0 (TCCTCCGGGCAGCTGGCCGGATCCTGA) y SIRE-2 (GATGCTGGGAGAGCTGGCTA) a partir de cepas de referencia de las 6 UTD (Tc I: Silvio X-10 cl1, Tc II: Tu18, Tc III: M5631, Tc IV: Can III, Tc V: Mn cl2, Tc VI: Cl-Brener) y se juntaron en partes iguales. Las sondas se construyeron con el kit comercial de marcación "Megaprime DNA Labelling System" (Amersham Biosciences, UK), utilizando dCTP 32 siguiendo las indicaciones del fabricante.

La purificación de las sondas, para eliminar los nucleótidos y oligonucleótidos no incorporados, se realizó mediante las columnas de purificación "Microspin G-50 Columns" (Amersham Biosciences, UK), según las especificaciones del fabricante. La marca radiactiva presente en el eluato de las columnas (sonda) fue medida mediante un contador Geiger (Survey Meter Modelo 3). Sondas con actividades mayores a 1K CPM fueron consideradas apropiadas para ser utilizadas.

Hibridización, lavados y revelado

Pre-hibridización: la membrana se pre-hibridizó con la solución de pre-hibridización durante 2 hs en un horno de hibridación rotativo a 55°C.

Hibridización: se sumerge la membrana en la solución de hibridización durante una noche (12 hs aproximadamente) en un horno de hibridación a 55°C. Una vez retirada para comenzar con los lavados, la solución de hibridación puede guardarse a -20ºC durante 1 semana para ser reutilizada.

Lavados: se realizan 3 lavados. Los dos primeros a T^{o} amb con la solución de lavado 1 en agitación durante 20 min. El 3ro se realiza con la solución de lavado 2 a 55°C en horno de hibridización con rotación durante 1 h.

Revelado: se realizó por exposición de la membrana a una placa radiográfica en un dispositivo de sujeción oscuro a -20°C durante 24 a 48 hs, según la actividad y/o antigüedad de la sonda. La placa se reveló en cuarto oscuro con 3 lavados sucesivos de solución reveladora (Kodak), solución detenedora (ácido acético 10%) y solución fijadora (Kodak).

2.4.2 Geles de poliacrilamida

2.4.2.1 Perfiles Inter-RE

Los análisis de Inter-Sire e Inter-RE fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida. Los mismos se realizaron entre 6-8% de poliacrilamida, utilizando la solución acrilamida:bisacrilamida (29:1). La electroforesis se realizó a corriente constante de 30 mA para la mejor separación y definición de los fragmentos de ADN generados. Se utilizó el tampón TBE 1X para el armado del gel y para la electroforesis. Previo a la siembra, las muestras de ADN fueron mezcladas con 0,2 volúmenes de tampón de siembra 6X. Se utilizaron marcadores de peso molecular Invitrogen. Posteriormente a la electroforesis, los geles se tiñeron con BrEt o Sybr green (5 µl cada 50ml de tampón TBE 1X). El ADN se visualizó mediante transiluminador de emisión UV a 302 nm (para los geles teñidos con Bret) o de 498 nm (geles teñidos con Sybr Green) con el transiluminador "Baby Imager"- Appligene. Los perfiles de ADN fueron guardados digitalmente y el porcentaje de similitud genética se estimó utilizando Gelcompar 4.0 (ver 2.10. Construcción de dendogramas). Para ello se utilizo el coeficiente de correlación de Pearson que tiene en cuenta la presencia o ausencia de bandas como en el coeficiente de Jaccard, así como las diferencias de valores densitométricos de la intensidad de las bandas. Al tener en cuenta los valores densitométricos de la intensidad de las bandas, todas las bandas independientemente de su peso molecular son informativas. Este coeficiente es particularmente recomendado para patrones de bandas complejos como los del tipo huella dactilar de

ADN (DNA fingerprint) (Giraffa y col., 2000). Para la construcción del dendograma se utilizó el algoritmo UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) (Vauterin, 1992).

2.4.2.2 Perfiles de Microsatélites

Amplificación por PCR: Se realizó en la modalidad de PCR anidada. Los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la Tabla 9. La reacción de PCR de la primera ronda se realizó en un volumen final de 15 µL y contiene 2,5 mM de MgCl2, 1U Taq ADN polimerasa (Promega), 250 mm de cada dNTP, 0,3 mM de cada oligonucleótido y 3 µL de ADN. Los ciclos de amplificación por PCR se realizaron según el protocolo "touchdown". El primer ciclo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 ° C durante 5 min, un paso de hibridización a 58°C durante 30 segundos y un paso de extensión a 72°C durante 1 minuto. Luego, cada cinco ciclos la temperatura de hibridación se redujo 2°C, y en todos los ciclos la desnaturalización se realizó a 94°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Cuando la temperatura de hibridización alcanzó los 48°C, el número de ciclos se amplió a 15, y el paso final de extensión se realizó a 72°C durante 10 minutos. La segunda ronda de PCR contenía la misma mezcla de reactivos, pero esta vez utilizamos oligonucleótidos internos marcados con fluoresceína y como DNA molde se utilizó 1,5 µL del producto de la 1ra ronda de reacción. Para la visualización de los productos de la segunda reacción, se corrieron 5 µL en un gel de agarosa 2%.

Determinación del tamaño de los alelos: Una alícuota de 1 a 3 µL del producto de PCR de la segunda vuelta donde se utilizaron los oligonucleótidos fluorescentes, se desnaturalizó a 90°C durante 3 minutos y luego se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% desnaturalizante (8M urea) en el secuenciador de ADN automatizado (ALF - Pharmacia). Los cromatogramas se editaron con el programa Allelinks y los fragmentos amplificados se detectan en forma de picos. Los valores de los alelos se obtuvieron de la alineación de la corrida con patrones de peso molecular conocido.

Oligonucleótido	Secuencia
TcAAT8-fwd	5'-Fam-ACCTCATCGGTGTGCATGTC-3'
TcAAT8-rv	5'-TATTGTCGCCGTGCAATTTC-3'
TcAAT8ex-fwd	5'-AGAGGCGCACAGTTGTATGC-3'
TcAAT8ex-rv	5'-GACGCTTTATGTTGAATTCA-3'
TcATT14-fwd	5'-Fam-TTATGGATGGGGTGGGTTTG-3'
TcATT14-rv	5'-AGCAATAATCGTATTACGGC-3'
TcATT14ex-fwd	5'-TTTGCAAATGGGACAGTTAC-3'
TcATT14ex-rv	5'-ACCTATTTTGCTCCTTGGTG-3'
TcCAA10-fwd	5´-Fam-GCACAGGGAGTCAAACTTCA-3´
TcCAA10-rv	5´-TCAAATTTATCACCCGTCGA- 3´
TcCAA10ex-fwd	5'-GGTAAGGGCGAGTATGACTG-3'
TcCAA10ex-rv	5'-TAGCCAATAAAAGTGATGCC-3'
TcGAG10-fwd	5'-Fam-TTCTCGGCTTCTATGTGTGC-3'
TcGAG10-rv	5'-GTGCCCTCCGTTTATTCCTC-3'
TcGAG10ex-fwd	5'-TTTCTTACTGCGAGGTGAGT-3'
TcGAG10ex-rv	5'-AAGTGAAGTGAAGTGGTGCC-3'
TcTAC15-fwd	5´-Fam-GAATTTCCCCATTTCCAAGC-3'
TcTAC15-rv	5´-CGATGAGCAACAATCGCTTC-3'
TcTAC15ex-fwd	5´-GGATATTTGTTACTGCTGGC-3'
TcTAC15ex-rv	5´-CGGACATATCCCTCTAGTCG-3'
TcTAT20-fwd	5'-Fam-GATCCTTGAGCAGCCACCAA-3'
TcTAT20-rv	5'-CAAATTCCCAACGCAGCAGC-3'
TcTAT20ex-fwd	5'-AGGCTGATCCTTGAGCAGCC-3'
TcTAT20ex-rv	5'-CGGCGGTCTTCTTTTGTCTC-3'
TcAAAT6-fwd	5'-Fam-GCCGTGTCCTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6-rv	5'-GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG-3'
TcAAAT6ex-fwd	5'-ACGCACTCTCTTTGTTAACAG-3'
TcAAAT6ex-rv	5'-CACATACACATTCCAATGGTT-3'

Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los 5 loci de microsatélites analizados en el marco de tesis.

Análisis de Resultados: Para un organismo diploide como *T. cruzi*, se espera la presencia de uno o dos picos que indican homocigotos o heterocigotos para un locus microsatélite particular, respectivamente (en este caso se deduce una población monoclonal). La detección de más de dos picos pueden ser considerados como una mezcla de poblaciones monoclonales (en este caso sería una población policlonal) aunque no se descarta completamente que la cepa podría ser aneuploide para el locus en cuestión.

2.4.2.3 Haplotipo del gen citocromo oxidasa II

Amplificación por PCR: Se realizó en la modalidad de PCR anidada. La reacción de la primera ronda se realizó en un volumen final de 15 µl y contiene 3,5 mM MgCl2, 1 U Taq ADN polimerasa (Promega), 250 mm de cada dNTP, 0,3 mM de los oligonucleótidos externos TcMit40 (5'-CTRCATTGYCCATATATTGT-3') y TcMit31 (5'-TAAATAATATATATTGTACATGAG-3'), 3 µL ADN. Los ciclos de amplificación por PCR consistieron en desnaturalización por 45 segundos, seguido por 45 segundos y la extensión de 1 minuto, para un total de 40 ciclos. Para la segunda ronda de reacción se utilizaron los oligonucleótidos TcMit21 (5´-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3´), y TcMit10 (5´-CCATATATTGTTGCATTATT-3´), y como DNA molde se utilizó 1,5 µl del producto de la 1ra ronda de reacción.

Determinación del haplotipo: Los productos amplificados en la segunda ronda se resolvieron en gel de agarosa al 2% y luego fueron sometidos a digestión empleando la enzima de restricción *AluI*. La genotipificación se realiza analizando los tamaños de los fragmentos de restricción de este gen, separados y visualizados en gel de acrilamida 6%, seguido por tinción de plata.

2.5 Clonado de ácidos nucleicos

2.5.1 Purificación de fragmentos de ADN

Para la purificación de fragmentos de ADN provenientes de reacciones de amplificación se utilizo el kit de trabajo "Wizard DNA CleanUp" (Promega, WI, USA) bajo las especificaciones del fabricante. Dicha metodología elimina fragmentos muy cortos de ADN (principalmente los oligonucleótidos), los nucleótidos no incorporados y los componentes del tampón de reacción, permitiendo, de esta manera, la resuspensión de los amplicones en agua o en alguna solución acorde al tratamiento que se desee realizar posteriormente.

Para purificar los fragmentos generados en una reacción de PCR que hubiera producido amplificaciones inespecíficas, se corrió una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (1-1,5% en tampón TAE 1X) a partir de la cual los fragmentos deseados se cortaron del gel visualizándolos en un transiluminador de luz UV. Dicho

fragmento inmerso en agarosa se incubó con 100µl de agua en baño a 70°C hasta su disolución (2-5 min). Esta solución se mezcló con la resina provista en el kit y se prosiguió con las indicaciones del fabricante para la purificación de productos de PCR.

2.5.2 Ligación a vectores de clonado

El clonado de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos requiere la unión covalente de ambas moléculas mediante la acción de una enzima ADN ligasa, previamente a la introducción en células de *E. coli* para su amplificación. Las reacciones de ligación para obtener los vectores recombinantes se incubaron durante 4 hs a temperatura ambiente o a 16°C durante toda la noche en presencia de ADN ligasa del fago T4.

Para el clonado directo de los productos de PCR se utilizó el kit pGEM-T® Easy (PROMEGA®, WI, USA). El vector pGEM-T Easy posee bases T que sobresalen en los extremos 3'. Este tipo de extremos permite la ligación en forma muy eficiente de fragmentos de PCR amplificados que presentan bases deoxiadenina en sus extremos adicionadas por la enzima Taq ADN polimerasa en forma independiente del templado. En todos los casos, el producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias competentes.

2.5.3 Preparación de bacterias competentes

El siguiente protocolo fue utilizado para la obtención de bacterias que pueden ser transformadas con vectores plasmídicos con alta eficiencia:

1. Sembrar una colonia fresca y aislada de bacterias en 25 ml de medio SOB en un recipiente de 250 ml. Crecer durante 8 hs a 37ºC con agitación (250-300 rpm).
2. Usar 10, 4 y 2 ml del cultivo anterior para inocular 3 recipientes de 1L conteniendo 250ml de medio SOB fresco. Crecer los tres cultivos a 18-22ºC con agitación suave durante 18 hs.
3. Medir la DO_{600} de los tres cultivos hasta que uno de ellos alcance un valor de 0,55.
4. Transferir el cultivo a un baño de hielo e incubar 10 min.

5. Colectar las células por centrifugación a 2.000g a 4ºC por 10 min.
6. Descartar el sobrenadante.
7. Resuspender las células en 80 ml de tampón Inoue frío.
8. Colectar las células por centrifugación a 2.000g a 4ºC por 10 min.
9. Descartar el sobrenadante totalmente.
10. Resuspender las células en 20 ml de tampón Inoue frío.
11. Agregar 1,5ml de DMSO, mezclar por inversión y dejar en hielo 10 min.
12. Fraccionar en alícuotas de 50-100 µl.
13. Congelar en N_2 líquido y conservar las alícuotas a –70ºC hasta su uso.

2.5.4 Transformación de bacterias competentes

Para la transformación de las bacterias competentes obtenidas como se describió en el punto anterior se utilizó el siguiente protocolo.

1. Tomar una alícuota de bacterias competentes y agregar el ADN a transformar (hasta 25 ng cada 50 µl de bacterias) en un volumen que no exceda el 5% del volumen de las células. Si la alícuota proviene de una conservación a -80ºC, descongelarla lentamente sobre hielo.
2. Incubar en hielo 30 min.
3. Dar un golpe de calor a 42ºC durante 90 seg.
4. Incubar en hielo 5 min.
5. Agregar 800µl de SOB o LB a cada tubo. Incubar a 37ºC durante 45 min.
6. Sembrar 100-200 µl en una placa con el marcador de resistencia adecuado, si correspondiera, e incubar a 37ºC durante 18 hs.

2.5.5 Selección de colonias recombinantes

El vector pGEM-T Easy posee el sitio de clonado dentro de la secuencia que codifica para el péptido de la β-galactosidasa, por lo que un inserto clonado dentro de dicha región interrumpirá su marco abierto de lectura. Cuando el gen de la β-galactosidasa se expresa, las colonias de bacterias transformadas crecidas en el medio LB-Agar-Ampicilina, en presencia de IPTG (inductor de la enzima) y de X-Gal (sustrato cromogénico), se tornan azules. Dichos sustratos pueden incorporarse al medio de cultivo durante su preparación o agregarse por absorción a las placas ya preparadas. Por lo tanto, las colonias conteniendo pGEM-T Easy no recombinante serán azules, mientras que las que contengan el plásmido recombinante serán blancas por no expresar dicha enzima.

2.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Se mezclaron las cantidades necesarias de tampón 10X (provisto por el fabricante junto con la enzima correspondiente), ADN, enzima de restricción y agua bidestilada. En los casos en que la enzima lo requería se agregó seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración final de 100 µg/ml. La mezcla fue incubada durante 3 hs a la temperatura óptima de actividad de cada enzima.

Se tuvieron en cuenta las siguientes reglas generales:

- La masa de ADN en las digestiones fue de 2 µg.
- Se utilizaron entre 5-10U de enzima de restricción por cada 1-3 µg de ADN.

2.7. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrometría utilizando los equipos Genespec1® y NanoDrop 1000®, calculando la concentración y pureza de las muestras mediante los valores de DO a 230 nm, 260 nm y 280 nm.

2.8. Secuenciación de ADN

Las tareas de secuenciación fueron llevadas a cabo por el Lic. Sergio Valente en nuestro laboratorio utilizando un secuenciador MegaBACE 500 (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK), o por el servicio de secuenciación de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

También se utilizó el servició de secuenciación brindado por Macrogen Inc (Geumchun-gu, Seoul, Korea).

2.9. Alineamiento de secuencias de ácidos nucleicos

El alineamiento de secuencias de ADN se realizó utilizando el programa MEGA 4.0 (Tamura y col., 2007).

Las secuencias de ARN fueron alineadas con R-Coffee (Wilm y col., 2008) utilizando los parámetros originales, desde el servidor www.tcoffee.org (Notredame y col., 2000) (Moretti y col., 2008). R-Coffee es un programa especialmente diseñado para el alineamiento de secuencias de ARN no codificantes de proteínas, el cual incorpora datos sobre la estructura secundaria de las moléculas de ARN a alinear.

El Logo de secuencias satélite se realizó en http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi (Crooks y col., 2004; Schneider and Stephens, 1990).

2.10. Construcción de dendogramas

2.10.1 A partir de alineamientos de secuencias de ARNr

Los dendogramas de las secuencias de los genes de ARN ribosomal 24Sα y 18S fueron construidos con el programa MEGA 4.0 (Tamura y col., 2007), utilizando el algoritmo de Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987) con los parámetros originales. Para evaluar la confiabilidad de los nodos se utilizó el método de Bootstrap con 100 réplicas.

2.10.2 A partir de perfiles de amplicones Inter-RE

Para la construcción de dendogramas a partir de perfiles de amplicones Inter-RE se utilizó el programa Gelcompar 4.0. Se estimó el porcentaje de similitud genética utilizando el coeficiente de correlación de Pearson que tiene en cuenta la presencia o ausencia de bandas como en el coeficiente de Jaccard, así como las diferencias de valores densitométricos de la intensidad de las bandas. Al tener en cuenta los valores densitométricos de la intensidad de las bandas, todas las bandas independientemente de su peso molecular son informativas. Este coeficiente es particularmente recomendado para patrones de bandas complejos como los del tipo huella dactilar de ADN (DNA fingerprint) (Giraffa y col., 2000). Para la construcción del dendograma se utilizó el algoritmo UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) (Vauterin, 1992).

RESULTADOS

1

Desarrollo de estrategias para la genotipificación de *T. cruzi*

En el presente capítulo se incluyen los resultados obtenidos con ensayos de tipificación molecular de UTD de *T. cruzi* y de polimorfismo infra-UTD desarrollados en el marco de esta tesis.

1.1 Estrategia para la identificación molecular diferencial de tripanosomátidos

El análisis de muestras de heces de triatominos por microscopía óptica (MO) es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para estimar la prevalencia de triatominos naturalmente infectados con *T. cruzi* en estudios de vigilancia entomológica y en triatominos infectados experimentalmente en insectarios, para determinaciones de xenodiagnóstico.

Sin embargo la observación microscópica directa presenta ciertas limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad, siendo altamente dependientes de la experiencia del observador. En algunas circunstancias, no es posible distinguir si los flagelados observados por MO son *T. cruzi*, u otros flagelados como *T. rangeli* o *Blastochritidia triatomae*.

En este sentido, hemos diseñado una estrategia para la identificación de tripanosomátidos en heces de triatominos. Como primer paso, realizamos el ensayos de PCR-24sα que utiliza los oligonucleótidos D75 y D76, que se acoplan a una región conservada del gen ARNr 24Sα en los tripanosomátidos, pero amplifican una zona altamente variable, que permite una primera aproximación a la identificación del flagelado según el peso molecular del amplicón producido (Tabla 1.1). Sin embargo, sabiendo que puede hallarse un gran número de especies de tripanosomátidos planteamos la necesidad de realizar un análisis más profundo. Por lo tanto, como segundo paso analizamos la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado usando la herramienta de blastn accesible en la página http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi para buscar las secuencias con mayor similitud a la amplificada. En este caso no encontramos ninguna secuencia con alta similitud que permitiera inferir la especie del organismo presente en la muestra, por lo cual decidimos alinear la secuencia del fragmento amplificado con otras presentes en las bases de datos, con el objetivo de construir un dendograma que permita ubicar filogenéticamente al organismo dentro de los tripanosomátidos. El dendograma obtenido fue comparado con otro realizado con secuencias del gen del ARNr 18S que son más abundantes y de esta manera se pudo

deducir el grupo taxonómico al cual pertenece el tripanosomátido presente en la muestra.

Tripanosomátido	Tamaño (pb)
T. cruzi II	289
T. cruzi I	274
T. rangeli	239
C. fasciculata	225

Tabla 1.1. Tamaño del fragmento del gen ARNr 24Sα amplificado por PCR-24sα en distintos tripanosomátidos.

Esta estrategia fue utilizada para la identificación de tripanosomátidos presentes en muestras de heces de triatominos silvestres positivas por microscopía óptica, como se describe en detalle en la sección 3.3.1. Brevemente, logramos identificar como *B. triatomae* a los tripanosomátidos presentes en heces de triatominos silvestres de las especies *Triatoma guasayana* y *Triatoma garciabesi*, que por microscopía óptica en el campo habían sido identificados como *T. cruzi.* Estos resultados tienen importancia epidemiológica en la determinación precisa de las especies de triatominos que actúan como vectores de la enfermedad de Chagas en distintas regiones endémicas.

1.2 Distinción molecular entre poblaciones de *T. cruzi* portadoras de secuencias satélite de Tipo I y II

Como se ha mencionado en la Introducción, las dos UTD parentales de *T. cruzi*, Tc I y Tc II portan unidades de la secuencia repetitiva satélite que difieren en un 10% de su secuencia aproximadamente, llamadas secuencias satélite Tipo I y Tipo II respectivamente (Elias y col., 2005). Nosotros hemos extendido este análisis a las 6 UTD de *T. cruzi*, describiendo por primera vez las repeticiones de ADN satélite de las UTD Tc III, IV y V (números de acceso en GenBank: EU728662-EU728667) (Fig. 1.1 y Fig 1.2).

En este sentido, hemos desarrollado una estrategia que permite distinguir a ambos grupos según la temperatura de desnaturalización de los amplicones obtenidos una vez finalizada la reacción de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green, ya que el mismo solo produce fluorescencia cuando se encuentra acoplado a ADN doble cadena.

```
|                    111111111122222222223333333333444444444455555555556666666666677777777778888888888999999999
                   123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678
Sivio X10 cl1      GAGCTCTTGCCCACAMKGGTGCTGCASTCGGCGGATCGTTTTCGAGCGGCTGCTGCACCACACGYTGTGGTCYAAATTTTTGTTTCGAATTATGAATG
CanIII             ......C........CG.............................R.....K......T......T.......C.G.........G......R...M..
Tu18               ................G.........C.....T..................Y......T......T.....................CR...R......
M5631              ...............CG.........G.....................................C.......T.........................
MnCl2              ................CG.........C.....K.................Y......Y.............................CR...R......
Cl-Brener          ...M...........G..............K.................Y......T.............................CR...R......

                    1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
                   9000000000011111111112222222222333333333344444444445555555555666666666677777777778888888888999999999
                   9012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345
Sivio X10 cl1      GCGGGAGTCAGAGRCACTCTCTTTCAATGTATGTTTGCGTGTKCACACACTGGACRCCAAACAACCCTGAAYTATCCGCTGCTTGGAGGAATTTCGC
CanIII             .T...........G...A....G...C.AYG.......K..YT.R....Y.....A...............C....................A....
Tu18               .T....................G...M.A.C...........T............A.........................................
M5631              .T..TG.......A........G...C...C.............T............G...............C.....................G....
MnCl2              .T..K...........S.....K...M.R.C...........T.............................C.........................
Cl-Brener          .T..KR................K...M.R.M...........T.........................................................
```

Fig. 1.1. Secuencias de repeticiones satélite de cepas de referencia de las 6 UTD. Los polimorfismos son mostrados utilizando la nomeclatura IUPAC. Silvio X-10 cl1: Tc I, Can III: Tc IV, Tu18: Tc II, M5631: Tc III, Mncl2: Tc V, Cl-Brener: Tc VI.

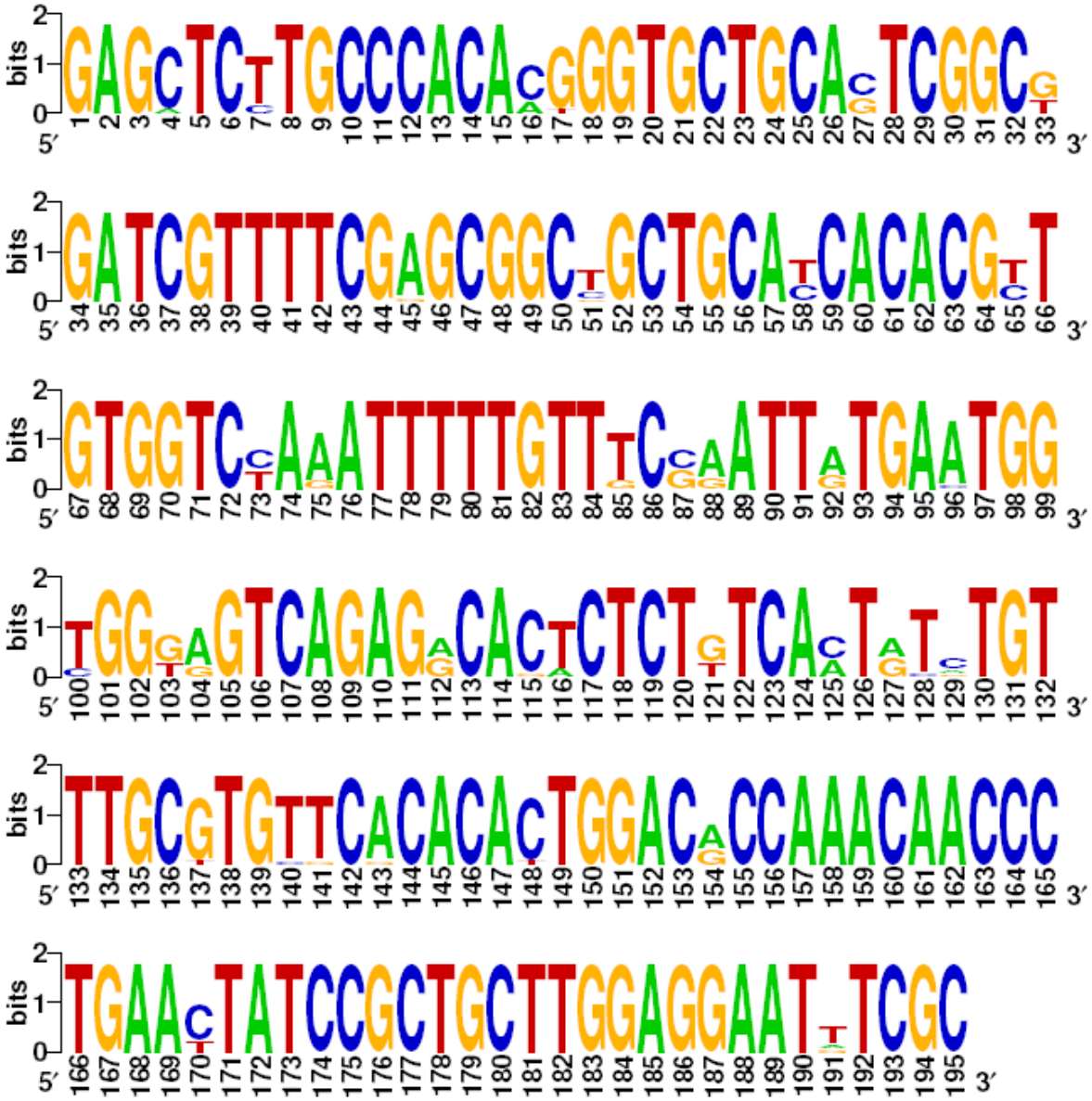

Fig.1.2. Logo de secuencias satélite representando el nivel de conservación de cada posición nucleotídica, construido con las secuencias de las cepas de referencia de las 6 UTD mostradas en la Fig. 1.1.

Las UTD de origen híbrido han heredado de manera predominante secuencias de alguno de los dos grupos, permitiendo así agruparlos junto a la UTD parental que más secuencias satélite aportó a su genoma. Las poblaciones Tc IV contienen secuencias satélite similares a Tc I, mientras el resto contiene fundamentalmente secuencias similares a Tc II. Esto permite la distinción entre dos grupos de UTD, *T. cruzi* I/IV (grupo Sat I) y *T. cruzi* II/III/V/VI (grupo Sat II).

El grupo Sat I genera amplicones que se desnaturalizan a una temperatura por encima de los 85º C, mientras que el grupo Sat II genera amplicones que se desnaturalizan a una temperatura por debajo de dicho valor (Fig. 1.3).

Esta estrategia de PCR en tiempo real, a la cual hemos denominado PCR-Lg, fue validada utilizando un panel de 25 cepas (Tabla 1.2): cinco pertenecientes a Tc I, seis a Tc II, tres a Tc III, uno a Tc IV, cinco a Tc V y los cinco restantes a Tc VI.

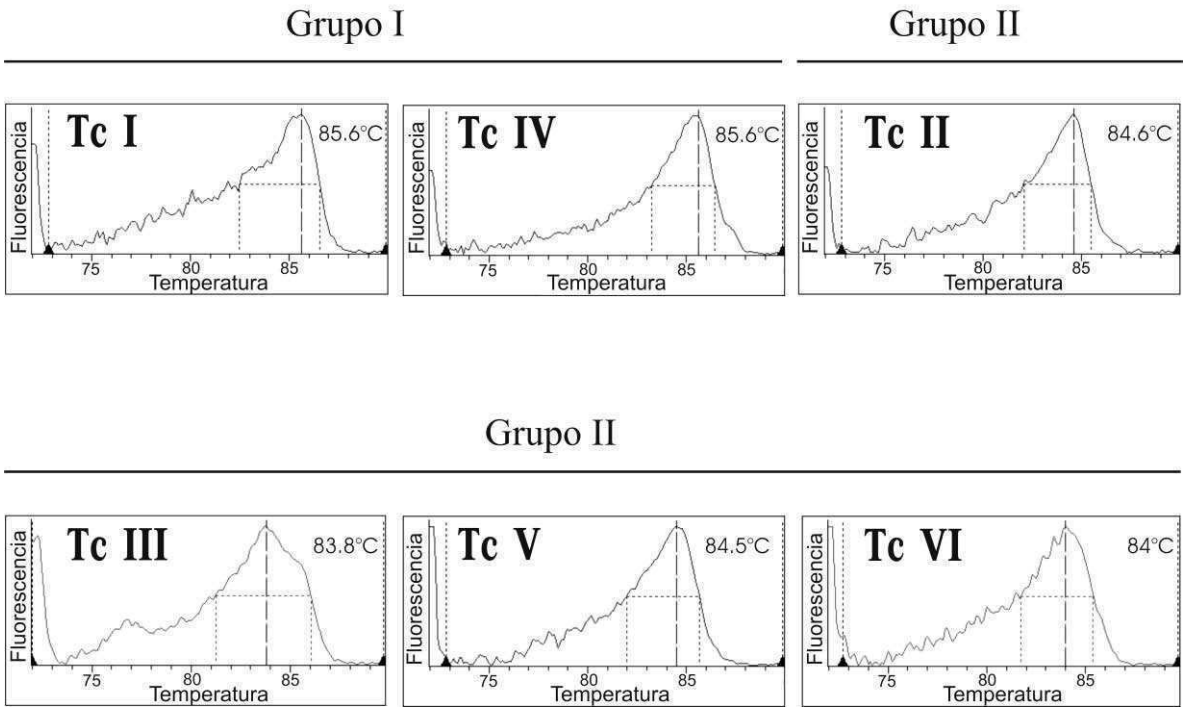

Fig. 1.3. Análisis de la curva de desnaturalización de los amplicones de ADN satélite de cepas de referencia obtenidos por PCR-Lg. Los amplicones de ADN satélite del grupo I muestran temperaturas de desnaturalización por encima de los 85°C, mientras que los productos de amplificación del grupo II tienen temperaturas de desnaturalización por debajo 85°C. Se utilizaron las siguientes cepas de referencia: Tc I: Silvio X-10 cl1, Tc II: Tu18, Tc III: M5631, Tc IV: Can III, Tc V: Mn cl2, Tc VI: Cl-Brener.

Los intervalos de confianza del 99% de las temperaturas de desnaturalización de las cepas de *T. cruzi* del grupo Sat I (media: 85,5 º C, IC 99% 85,2-85,8) y Sat II (media: 84,4 º C, IC 99% 84.2-84.7) no se solapan (Tabla 1.2).

Stock	Td (°C)	UTD	Td (°C) ± DS	Grupo Sat
Silvio X-10 cl1	85,7			
Pal v2-2	85,4			
G	85,5	I	85,34 ± 0,15	I
SN3	85,3			
HA	85,4			
Can lll	85,7	IV	85,70 ± 0,30	
Tu18	84,6			
JG	84,8			
Gilmar	84,8	II	84,60 ± 0,18	
Y	84,6			
Basileu	84,4			
Mas cl1	84,4			
M5631	83,9			
Cu-TOM-229	84,5	III	84,03 ± 0,45	
Cu-Yaya-211	83,6			
Mn cl2	84,4			
Bug 2148 cl1	84,8			II
SO3 cl5	84,7	V	84,44 ± 0,30	
PAH265	84,1			
Tev 41	84,2			
Cl Brener	84,2			
Tul77	84,7			
Tep7	84,3	VI	84,42 ± 0,33	
MC	84,0			
Tep6	84,9			

Tabla 1.2. Temperaturas de desnaturalización de los fragmentos de ADN satélite amplificados por PCR-Lg de cepas representativas de las 6 UTD.

1.3 Ensayos de genotipificación de *T. cruzi* por PCRs Inter-Elementos Repetitivos.

Con el objetivo de desarrollar estrategias de tipificación que puedan ser utilizadas para discriminar entre poblaciones parasitarias de distintas UTD, como así también entre poblaciones pertenecientes a una misma UTD, desarrollamos ensayos

basados en la amplificación de fragmentos cromosómicos flanqueados por elementos repetitivos. Al separar los amplicones generados por electroforesis, se obtiene un perfil específico que es utilizado para la construcción de dendogramas.

1.3.1 Análisis *in silico* de la conservación y representatividad de secuencias repetitivas de *T. cruzi*.

Se realizó un análisis *in silico*, para determinar las regiones conservadas cercanas a los extremos 5´ y 3´ de los elementos repetitivos SIRE, TcIRE y NARTc. En estas regiones se diseñaron oligonucleótidos para realizar ensayos de PCRs inter-elementos repetitivos y se evaluó la representatividad de cada oligonucleótido utilizando la herramienta blastn en la base de datos de contigs genómicos de *T. cruzi* en TriTrypDB http://tritrypdb.org (Tabla 1.3).

Oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)	Representatividad
TcIRE-Fw	CCCGTTGGTGCTCTCTTTTGC	2020
TcIRE-Rv	CAAGGGGACACACACACAGAGG	2001/1918
NARTc-Fw	CCCTTCCGACCCGTTTGTGCG	181
NARTc-Rv	CAACGGCTGGGCATTGAACAGGA	223
INS-Fw	TCCATAGATWATTTCAGGATCC	166/135
INS-Rv	ATTAAGTTAGCCAGCTCTMCC	155/207

Tabla 1.3. La representatividad de cada oligonucleótido en el genoma de Cl-Brener está indicada con el número de resultados positivos en la búsqueda por Blast. Para los oligonucleótidos que tienen sitios degenerados, se realizó la búsqueda con ambos sitios polimórficos de manera individual y se muestran ambos resultados.

1.3.2 Análisis de la distribución y estabilidad de SIRE

Para que SIRE pueda ser utilizado como marcador molecular para diferenciar poblaciones parasitarias, es necesario que su distribución sea diferencial entre cepas de distinta UTD, pero que a su vez, se mantenga constante en tiempos evolutivos cortos. Con este fin realizamos ensayos de "Southern blot" con ADN de cepas de referencia de las 6 UTD, completamente digerido con Hind III. También analizamos muestras de ADN tomadas a distintos tiempos de dos cepas de distinta UTD, Tulahuen (VI) y TCC (I), mantenidas y propagadas por más de 20 años en el Laboratorio de Patología

Experimental de la Universidad Nacional de Salta a cargo del Dr. Miguel A. Basombrío, con pasajes en cultivo y ratón.

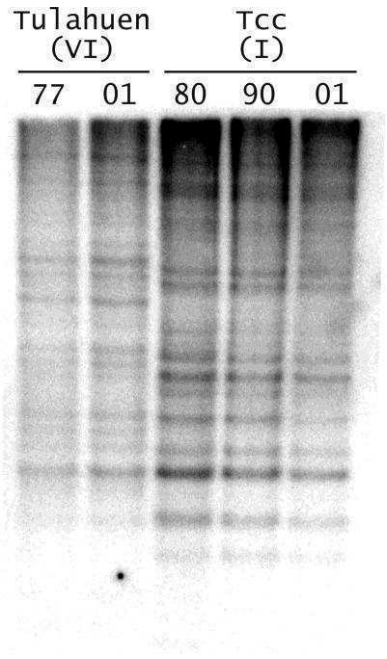

Fig. 1.4. Estabilidad de SIRE en cepas Tc I y Tc VI mantenidas en cultivo y pasaje por ratón, por más de 20 años. Sobre las calles se indica el año en el que se tomó la muestra.

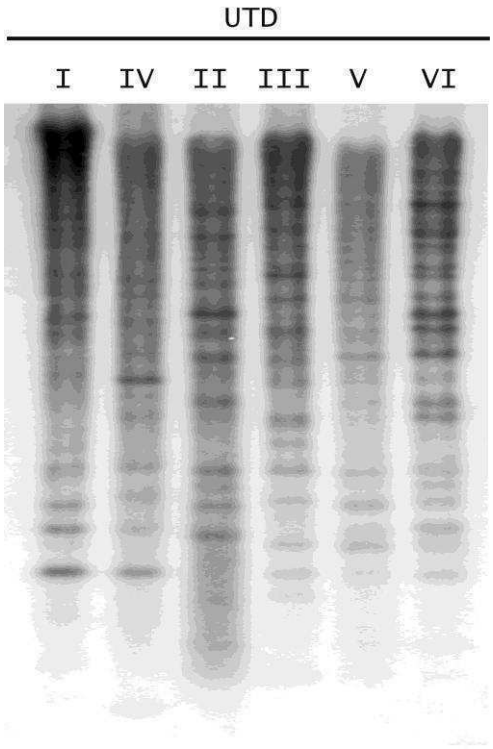

Fig. 1.5. Southern-Blot de ADN genómico de *T. cruzi* digerido con HindIII mostrando la distribución diferencial de SIRE en cepas representativas de las 6 UTD de *T. cruzi.*

Interesantemente, los perfiles obtenidos para los cultivos de una misma cepa resultaron idénticos a todos los tiempos evaluados (Fig. 1.4), mientras que los perfiles entre las distintas cepas resultaron diferentes (Fig. 1.5).

1.3.3 Validación en cepas de laboratorio de distintas UTD

Se ensayaron distintas estrategias de amplificación utilizando distintas combinaciones de oligonucleótidos complementarios a los extremos de elementos repetitivos de *T. cruzi* con el fin de desarrollar un ensayo para la tipificación de *T. cruzi* (Tabla 1.4).

Oligonucleótido	Cepa	UTD	N° de Bandas Informativas
TcIRE-Fw TcIRE-Rv	Cual	VI	2
NARTc-Fw NARTc-Rv	Cual	VI	1
INS-Fw INS-Rv	Cual	VI	6
TcIRE-Fw TcIRE-Rv NARTc-Fw NARTc-Rv INS-Fw INS-Rv	Cual	VI	3
TcIRE-Fw	Silvio x-10	I	2
	TCC 01	I	1
	Tull 01	VI	3
TcIRE-Rv	Silvio x-10	I	1
	TCC 01	I	1
	Tull 01	VI	5
NARTc-Fw	Silvio x-10	I	1
	TCC 01	I	1
NARTc-Rv	Tull 01	VI	4
TcIRE-Fw	Silvio x-10	I	2
	TCC 01	I	4
NARTc-Rv	Tull 01	VI	2
NARTc-Fw	Silvio x-10	I	2
	TCC 01	I	5
TcIRE-Fw	Tull 01	VI	4

Tabla 1.4. Número de bandas informativas obtenidas al utilizar distintas combinaciones de oligonucleótidos complementarios a diferentes elementos repetitivos.

Oligonucleótido	Cepa	UTD	N° de Bandas Informativas
TcIRE-Rv	Silvio x-10	I	4
	TCC 01	I	4
	Tull 01	VI	4
INS-Fw	Tull 01	VI	5
	Tep7	VI	5
	Cl-Brener	VI	5
	TCC 01	I	7
	Pav00 cl7	I	2
	Silvio x-10	I	7
	Cl-Brener	VI	4
INS-Rv TcIRE-Fw	Tu18	II	6
	Mncl2	V	6
	Cl-Brener	VI	6
INS-Rv TcIRE-Fw	Tu18	II	6
	Mncl2	V	6
	Cl-Brener	VI	7
INS-Rv TcIRE-Fw	Tu18	II	2
	Mncl2	V	3
	Cl-Brener	VI	3
TcIRE-Rv NARTc-Rv INS-Fw INS-Rv	Silvio X-10	I	14
	Y	II	10
	M5631	III	11
	CanIII	IV	8
	MNcl2	V	10
	Cl-Brener	VI	9
TcIRE-Fw NARTc-Rv INS-Fw INS-Rv	Silvio X-10	I	8
	Y	II	9
	M5631	III	9
	CanIII	IV	5
	MNcl2	V	9
	Cl-Brener	VI	10

Tabla 1.4 (cont.). Número de bandas informativas obtenidas al utilizar distintas combinaciones de oligonucleótidos complementarios a diferentes elementos repetitivos.

La mayor resolución para discriminar entre cepas de distintas UTD se obtuvo al utilizar el oligonucleótido INS-R que se acopla al elemento SIRE, por lo que llamamos

denominamos la reacción PCR-Inter-SIRE-1. Se obtuvieron entre 8 y 11 bandas informativas, entre 250 y 2500 pb (Fig. 1.6), que fueron utilizadas para la construcción de un dendograma (Fig. 1.7).

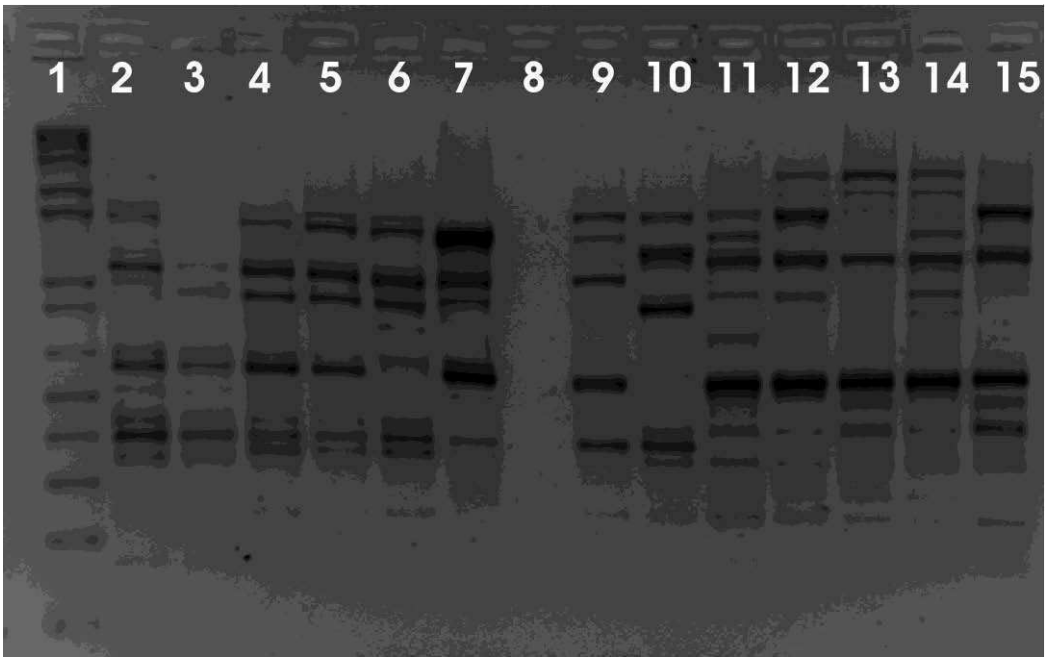

Fig. 1.6. PCR-Inter-SIRE-1. Gel de agarosa representativo mostrando el patrón de bandas obtenido al amplificar regiones genómicas flanqueadas por elementos SIRE contiguos y opuestos. Se analizaron 13 cepas de *T. cruzi*, representativas de las 6 UTD; calle 1: Tep7, 2: Tep6, 3: Tev41, 4: PAH179, 5: PAH265, 6: Tu18, 7: No amplifico, 8: Can III, 9: M5631, 10: TCC, 11: SN6, 12: Mg10, 13: Cas16, 14: Silvio X-10 cl1.

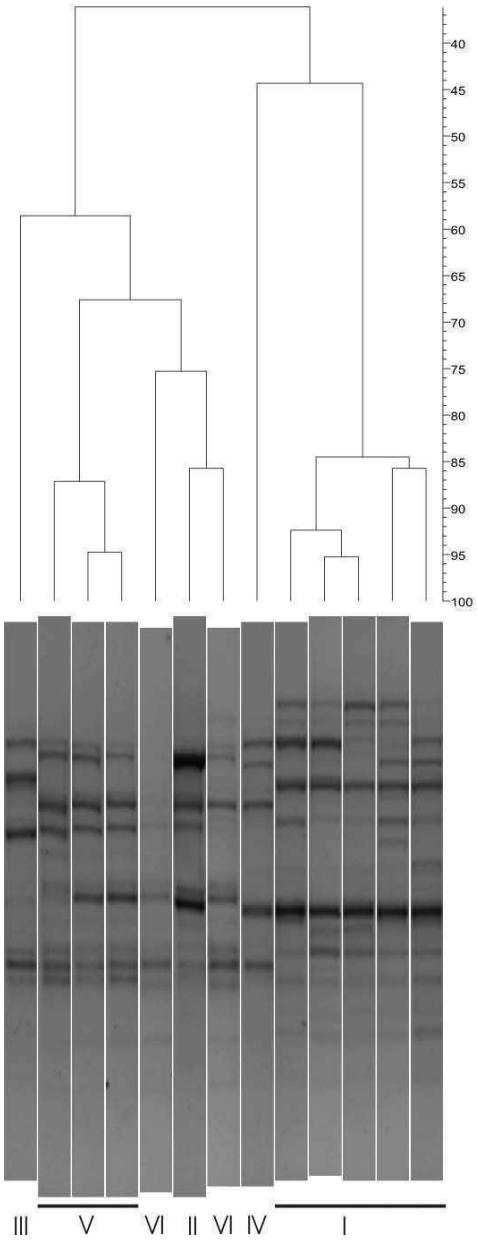

Fig. 1.7. Dendograma construido utilizando el coeficiente de similitud de Pearson, representando el porcentaje de similitud genética entre 13 aislados de *T. cruzi* representativos de las 6 UTD, calle 1: M5631, 2: PAH265, 3: PAH179, 4: Tev41, 5: Tep6, 6: Tu18, 7: Tep7, 8: Can III, 9: SN6, 10: Silvio X-10 cl1, 11: Mg10, 12: Cas16, 13: TCC. La UTD de los aislados se encuentra debajo de cada calle en números romanos.

1.3.4 Discriminación entre cepas parasitarias de UTD Tc II y Tc VI por PCR Inter-SIRE-2

Dada la imposibilidad de distinguir adecuadamente poblaciones parasitarias Tc II de Tc VI por ensayos de PCR tradicionales, procedimos a desarrollar un ensayo aprovechando la distribución diferencial de elementos repetitivos en sus genomas.

Al utilizar los oligonucleótidos INS-R e INS-F, se obtuvieron patrones diferenciales y altamente conservados para cada UTD. El número de bandas informativas es bajo, pero esto se ve compensado por el alto grado de conservación que muestran los patrones entre cepas del mismo UTD (Fig. 1.8).

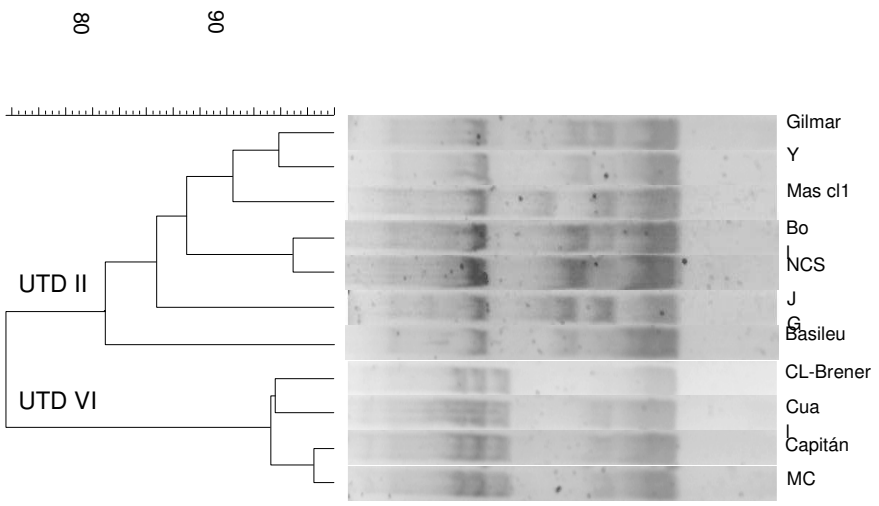

Fig. 1.8. Dendograma representando porcentaje de similitud genética entre aislados de *T. cruzi* pertenecientes a las UTD Tc II y Tc VI. Se utilizó el coeficiente de similitud de Pearson para el cálculo de las distancias genéticas y el algoritmo UPGMA para la construcción del dendograma.

1.4 Pr1-Pr3: una estrategia altamente sensible para la discriminación entre aislados parasitarios Tc II y Tc VI.

Con el objetivo de diferenciar entre poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes a los UTD Tc II y Tc VI, indistinguibles mediante las PCRs tradicionales dirigidas a las secuencias espaciadoras de genes del mini-exón y secuencias de ADN ribosomales 18S y 24sα, decidimos desarrollar un ensayo de PCR basado en el elemento A-10.

Los oligonucleótidos P3-P6, originalmente propuestos por Brisse y colaboradores (Brisse y col, 2000) dan lugar a un amplicón del 625 pb en las cepas Tc II y no producen amplicones en el resto de las UTD. Sin embargo, usar este tipo de estrategia en muestras biológicas, donde un resultado PCR negativo puede no deberse a la ausencia

de Tc II, sino a un fenómeno de inhibición o de carga parasitaria insuficiente, no es recomendable.

Por lo tanto, el diseño de este nuevo ensayo se basó en la obtención de productos de PCR de tamaño diferencial para ambas UTD mencionadas. Asimismo este ensayo permitiría distinguir infecciones mixtas con UTD Tc II. Con este objetivo, amplificamos y secuenciamos el fragmento A-10 obtenido a partir de las cepas Tu18, Af-1, Mncl2, PAH265, Tev6, Tep7 y Tev41 (números de acceso: EF382357, EF394300- EF394305) y diseñamos nuevos oligonucleótidos sentido y anti-sentido dentro de dicho fragmento. Se evaluaron distintas combinaciones de los nuevos oligonucleótidos a fin de encontrar una dupla que genere amplicones en ambas UTD, pero de distinto peso molecular. La combinación de los nuevos oligonucleótidos Pr1 y Pr3 dieron lugar a un amplicón de aproximadamente 580pb para aislados de UTD Tc II, mientras que en aislados de UTD VI el amplicón resultó de 525pb (Fig. 1.9). A esta reacción la denominamos Pr1-Pr3. Este método fue validado con un panel de muestras de ADN de 23 cepas de las UTD Tc II y Tc VI. También se incluyeron cepas de las 4 UTD restantes (tabla 1.5).

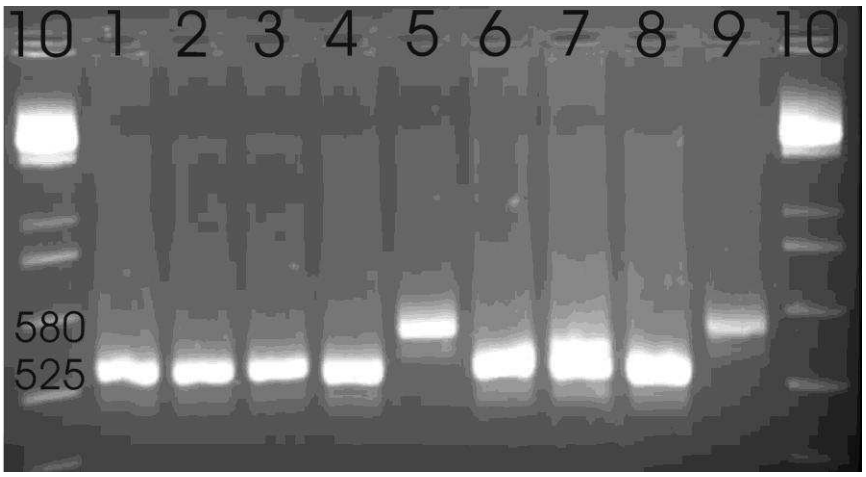

Fig. 1.9. PCR Pr1-Pr3. Las calles 1-4 y 6-8 son aislados Tc II, mientras las calles 5 y 9 corresponden a aislados Tc VI. Los tamaños de los amplicones están indicados en pb. Las calles 10 son el marcador de peso molecular de 100 pb.

Cepa	Origen	UTD	Tamaño (pb)
Tu 18	Chile	Tc II	580
Af-1	Colombia	Tc II	580
Basileu	Brasil	Tc II	580
Bol	Bolivia	Tc II	580
Gilmar	Brasil	Tc II	580
JG	Brasil	Tc II	580
Mas	Brasil	Tc II	580
Ncs	Brasil	Tc II	580
Y	Brasil	Tc II	580
Cl-Brener	Brasil	Tc VI	525
Lamber	Argentina	Tc VI	525
MC	Brasil	Tc VI	525
Moña	Argentina	Tc VI	525
Bati	Argentina	Tc VI	525
Capitan	Argentina	Tc VI	525
Cual	Argentina	Tc VI	525
La-3-1	Argentina	Tc VI	525
Nico	Argentina	Tc VI	525
Tep6	Argentina	Tc VI	525
Tep 7	Argentina	Tc VI	525
Tol Ac	Argentina	Tc VI	525
Tul 2001	Argentina	Tc VI	525
Tul 77	Argentina	Tc VI	525
Pal Da 1	Argentina	Tc I	525
TCC 9/01	Argentina	Tc I	525
Silvio X-10 cl1	Brasil	Tc I	525
Bajo diluca	Argentina	Tc I	525
Can III	Brasil	Tc IV	525
M5631	Brasil	Tc III	525
PAH265	Argentina	Tc V	525
Tev41	Argentina	Tc V	525
Mn cl2	Chile	Tc V	525

Tabla 1.5. Tamaño aproximado del fragmento A10 amplificado por PCR Pr1-Pr3 en cepas de las 6 UTD.

Para aumentar la sensibilidad del ensayo y poder analizar una mayor proporción de muestras biológicas, se modificó para realizarlo en la modalidad de PCR "hemi-nested", o semi-anidada. En la primera ronda de amplificación se utiliza el oligonucleótido Pr1 junto al P6 diseñado por Brisse y col, mientras que en la segunda ronda se utilizan los oligonucleótidos Pr1 y Pr3. También adaptamos el ensayo para ser utilizado en PCR en tiempo real, donde los productos de amplificación de ambas UTD

son diferenciados claramente por sus temperaturas de desnaturalización (Fig. 1.10, Tabla 1.6). Los amplicones de cepas Tc II tienen una temperatura de desnaturalización de por debajo de los 84°C, mientras que los amplicones de cepas Tc VI se desnaturalizan por encima de ese valor.

Cepa	Td (°C)	UTD	Media	Ds	N	Int. Conf. 99%
Af-1	83,4	II				
Gilmar	83,8	II				
JG	83,6	II				
Y	83,8	II	83,48	0,24	7	± 0,23
Mas cl1	83,2	II				
Bol	83,4	II				
NCS	83,2	II				
Tu18	83,4	II				
Cl Brener	84,6	VI				
Tul II	84,8	VI				
Tep7	84,2	VI	84,64	0,38	5	± 0,44
Tol Ac	84,4	VI				
MC	85,2	VI				

Tabla 1.6. Distribución de los valores de las temperaturas de desnaturalización del fragmento A10 amplificado por PCR Pr1-Pr3 en cepas de las UTD Tc II y Tc VI.

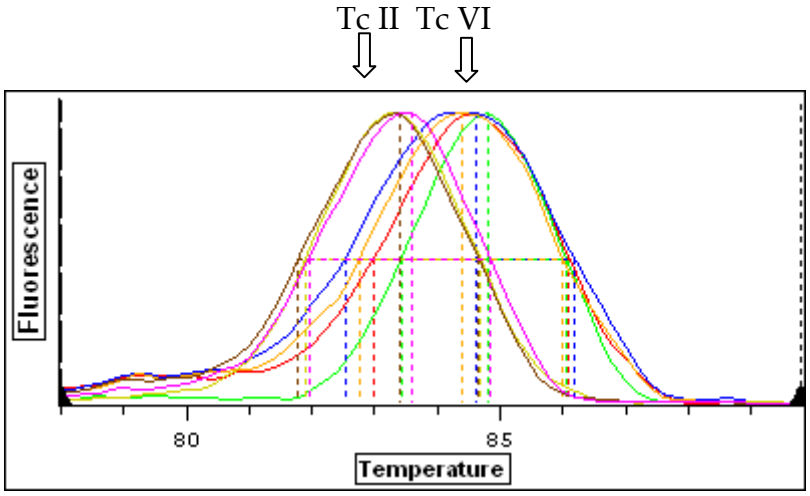

Fig. 1.10. Curvas de desnaturalización de los fragmentos amplifícados con los oligonucleotidos Pr1-Pr3. Las curvas por debajo de 84°C corresponden a cepas Tc II, mientras las curvas por encima de ese valor corresponden a cepas Tc VI.

1.5 Ensayos con sondas para la distinción entre grupos de *T. cruzi* según la secuencia intergénica del mini-exón

Estas reacciones tienen como blanco la región inter-génica espaciadora del mini-exón y logran discriminar entre 4 grupos de *T. cruzi*: Tc I, Tc III, Tc VI y Tc II/V/VI. Estos ensayos se realizaron durante una pasantía en el laboratorio de la División de Enfermedades Parasitarias del CDC, Atlanta, Georgia, EEUU, a cargo del Dr. Alexandre da Silva.

1.5.1 Ensayo de PCR en tiempo real Taqman multiplex

Se diseñó una PCR multiplex con sondas Taqman para amplificar y detectar los 4 grupos de secuencias, a la que denominamos MTq-PCR. Utilizamos un oligonucleótido sentido común y oligonucleótidos anti-sentido específicos para cada grupo, que producen amplicones distinguibles en geles de agarosa (Tabla 1.7 y Fig. 1.11).

Oligonucleótido	Posición de Hibridización (pb)	Secuencia
UTCC-Fw	1	CAGTTTCTGTACTATATTGGTACG
TcI-Rv	425	CGATCAGCGCCACAGAAAGT
TcII/V/VI-Rv	335	GGAAAACACAGGAAGAAGC
TcIII-Rv	452	CATTTTTATGAGGGGTTGTTCG
TcIV-Rv	545	CATTTTTATTAGGGGTTGTACG
Sonda		
TcI-Tq	203	Fam-CTC**C**TTC**A**T**G**TT**T**GT**G**TCG-BHQ1
TcII/V/VI-Tq	151	Hex-TATA**C**C**C**ATATA**T**ATA**T**A**G**C-BHQ1
TcIII-Tq	292	Quas670-AATCGCG**T**GTATGCACCGT-BHQ3
TcIV-Tq	433	Calrd610-GCCCCCGACGCCGTCCGTG-BHQ2

Tabla 1.7. Oligonucleótidos y sondas utilizados en el ensayo de PCR-MTq. La posición de hibridización está indicada para las siguientes cepas de referencia: Tc I: Cutia, TcII/V/VI: Tu18, Tc III: M5631, Tc IV: Can III. Las bases modificadas LNA en las sondas están indicadas en negrita y subrayadas. En el extremo 5´de cada sonda se indica el fluoróforo acoplado y en el extremo 3´se indica el "quencher" acoplado.

Para su utilización en modalidad de tiempo real, en las regiones diferenciales entre los 4 grupos de secuencias, pero conservadas dentro de los mismos, se diseñaron sondas con bases modificadas LNA para la detección específica de cada amplicón. En total, se

diseñaron y evaluaron 10 sondas Taqman, de las cuales elegimos las 4 de mayor especificidad (Tabla 1.7).

Los nucleótidos con modificaciones LNA presentan una mayor fuerza de unión, lo que permite diseñar sondas con mayor afinidad por el amplicón. En este ensayo no se incluyó una sonda complementaria a un control interno debido al limitante de 4 canales de detección que presenta el equipo de PCR.

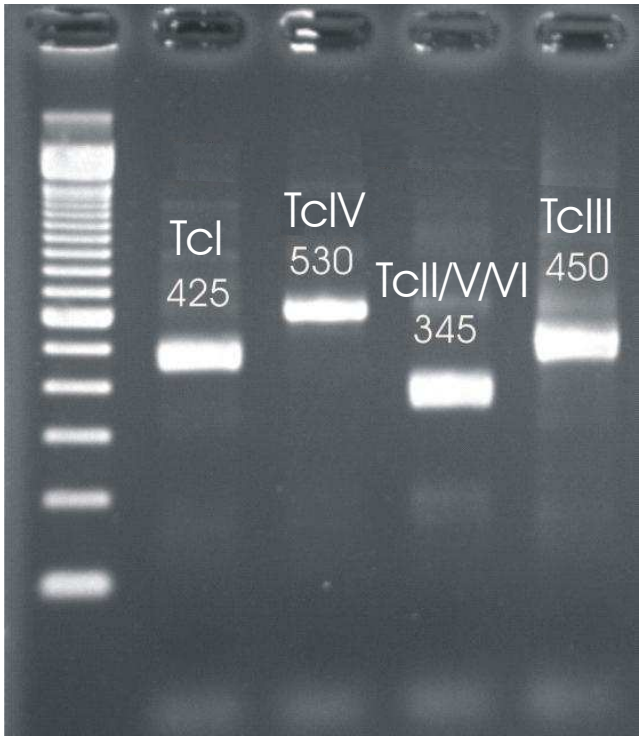

Fig. 1.11. PCR multiplex que genera amplicones diferenciales para 4 grupos de *T. cruzi*. Los pesos moleculares de los amplicones están indicados en pares de bases y son aproximados.

Para determinar la sensibilidad del método en muestras de sangre periférica humana, se analizaron muestras de sangre humana contaminadas artificialmente con cantidades conocidas de epimastigotes de *T. cruzi* I. Se obtuvo una sensibilidad de 5 parásitos/ ml (datos no mostrados). También se comparó la sensibilidad de la reacción según la UTD con ADN purificado de cepas de referencia. Los resultados de las reacciones de PCR en este caso fueron analizados por gel de agarosa. Se observó una sensibilidad de 0,1 pg de ADN/well para las UTD Tc II, Tc IV y Tc V, y una sensibilidad igual o menor que 0,01pg de ADN/well para las UTD Tc I, Tc III y Tc IV (Fig. 1.12).

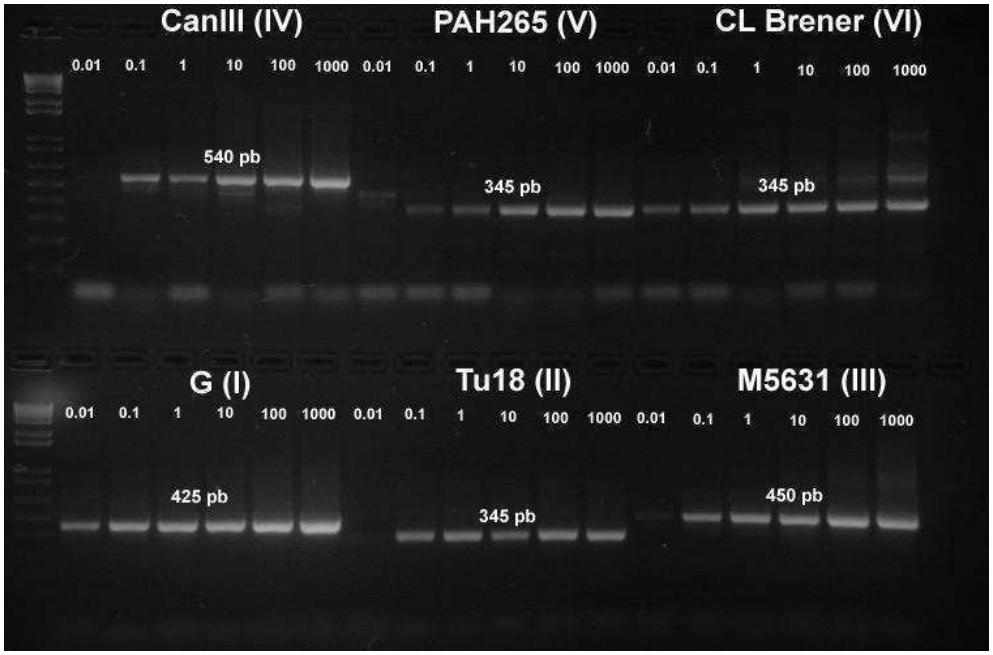

Fig. 1.12. Comparación de la sensibilidad de la PCR dirigida al espaciador intergénico del mini-exón con ADN purificado de cepas de referencia de las 6 UTD.

Cepa	Origen	UTD	Sonda			
			I	II/V/VI	III	IV
Triatoma	EEUU	Tc I	29,41	No Ct	No Ct	No Ct
Duran	Méjico	Tc I	27,38	No Ct	No Ct	No Ct
Gamma	EEUU	Tc I	24,92	No Ct	No Ct	No Ct
D11	Brasil	Tc I	17,88	No Ct	No Ct	No Ct
SN3	Colombia	Tc I	26,79	No Ct	No Ct	No Ct
G	Brasil	Tc I	20,31	No Ct	No Ct	No Ct
Silvio X-10	Brasil	Tc I	22,86	No Ct	No Ct	No Ct
Cl 72	Argentina	Tc I	35,15	No Ct	No Ct	No Ct
Cl 78	Argentina	Tc I	33,79	No Ct	No Ct	No Ct
Tu 18	Chile	Tc II	No Ct	26,27	No Ct	No Ct
Basileu	Brasil	Tc II	No Ct	32,23	No Ct	No Ct
Gilmar	Brasil	Tc II	No Ct	39,62	No Ct	No Ct
JG	Brasil	Tc II	No Ct	41,66	No Ct	No Ct
M5631	Brasil	Tc III	No Ct	No Ct	30,27	No Ct
Can III	Brasil	Tc IV	No Ct	No Ct	No Ct	25,32
Griffen	EEUU	Tc IV	No Ct	No Ct	No Ct	22,36
MnCL2	Chile	Tc V	No Ct	29,76	No Ct	No Ct
Pah179	Argentina	Tc V	No Ct	17,17	No Ct	No Ct
Tev41	Argentina	Tc V	No Ct	14,81	No Ct	No Ct
Pah 265	Argentina	Tc V	No Ct	18,72	No Ct	No Ct
SO3	Brasil	Tc V	No Ct	33,61	No Ct	No Ct
Mas	Brasil	Tc V	No Ct	28.71	No Ct	No Ct
Cl-Br	Brasil	Tc VI	No Ct	27,86	No Ct	No Ct
Capitan	Argentina	Tc VI	No Ct	23,45	No Ct	No Ct
Cual	Argentina	Tc VI	No Ct	26,17	No Ct	No Ct
Tep7	Argentina	Tc VI	No Ct	17,09	No Ct	No Ct

Tabla 1.8. Tipificación por PCR-MTq de 26 aislados, representativos de las 6 UTD, previamente tipificados por PCR convencionales (Burgos y col, 2007).

Para validar la técnica se analizaron 26 cepas de *T. cruzi* previamente tipificadas por PCR convencionales. En todos los casos la tipificación por PCR en tiempo real fue concordante con los resultados obtenidos previamente (Tabla 1.8).

1.5.2 Ensayo con tecnología Luminex

Para este ensayo se utilizaron oligonucleótidos con las mismas secuencias que los diseñados para la PCR en tiempo real multiplex con sondas Taqman, más un par de oligonucleótidos que amplifican un control interno (CI) de la reacción. Sin embargo para realizar los ensayos Luminex es necesario que un oligonucleótido por amplicón se encuentre biotinilado. Por lo tanto, el oligonucleótido común a los 4 grupos de mini-exón se encuentra biotinilado, al igual que el oligonucleótido anti-sentido del control interno. Para la detección de los 5 amplicones se diseñaron y evaluaron un total de 27 sondas.

Las sondas que mayor afinidad presentaban por sus amplicones, que a su vez presentaban baja reacción cruzada con amplicones no específicos, fueron evaluadas en diferentes condiciones de reacción. Se ensayaron fundamentalmente variantes en la cantidad de producto de PCR incubado junto a las sondas y la temperatura de acople entre las sondas y los amplicones.

Las condiciones inicialmente evaluadas fueron las sugeridas por el fabricante. Se utilizaron 2µl de producto de PCR y se incubó a 45°C. Bajo estas condiciones se evaluó el ensayo con 24 muestras de ADN de cepas de *T. cruzi* (Tabla 1.9). Las sondas para Tc I, Tc II/V/VI, Tc III y CI produjeron valores de fluorescencia específicos >1000. Sin embargo los valores de los blancos fueron elevados. Ninguna de las sondas diseñadas para Tc IV dió señal de fluorescencia específica (Tabla 1.9).

Cepa	Muestra	Sonda				
		Tc I	Tc II/V/VI	Tc III	Tc IV	CI
TE 1x		491	654	326	304	295
TE 1x	Blanco	683	906	447	431	447
TE 1x		739	947	515	486	521
D11		1549	155	146	120	131
SN3		1353	250	215	193	213
G		1449	266	259	188	227
Triatoma	Tc I	1167	471	354	326	341
Duran		1885	348	282	296	306
Gamma		1827	377	344	317	340
Silvio X-10		1507	292	258	197	253
Tu18		222	1955	195	178	210
Basileu	Tc II	204	1147	209	172	229
Gilmar		190	869	173	182	211
M5631	Tc III	245	335	2478	199	228
Can III	Tc IV	125	158	117	114	125
Griffen		261	334	290	292	291
Mn cl2		330	1809	305	269	325
Pah 179	Tc V	190	1475	136	160	165
Tev 41		192	1974	180	155	160

Cepa	Muestra	Sonda				
		Tc I	Tc II/V/VI	Tc III	Tc IV	CI
Pah 265		248	1610	191	201	211
SO3	Tc V	190	1563	163	158	223
MAS cl1		232	1427	223	208	253
Cl-Brener		275	1401	233	236	264
Capitan		183	1167	192	179	196
Cual	Tc VI	146	1596	153	124	170
Tep7		247	1403	200	207	242
Tep6		217	1796	174	180	185
S(-) + CI	CI	162	222	191	164	4493
TE 1x	Blanco	652	903	365	314	359
Triatoma		1512	200	173	149	174
Triatoma	Tc I	1780	149	180	128	142
Triatoma		1867	295	238	227	262
Cl-Brener		176	1406	178	125	150
Cl-Brener	Tc VI	250	1502	252	216	199
Cl-Brener		202	1504	201	202	199
TE 1x		654	809	411	383	402
TE 1x	Blanco	817	1058	553	481	555
TE 1x		658	847	414	386	450

Tabla 1.9. Ensayo de Luminex realizado a 45°C con 2µL de producto de PCR. Las sondas para Tc I, Tc II/V/VI, Tc III y CI produjeron valores de fluorescencia específicos >1000. Sin embargo los valores de los blancos fueron elevados. Ninguna de las sondas diseñadas para Tc IV dió señal de fluorescencia específica.

Con el objetivo de disminuir los valores de fluorescencia inespecífica se aumentó la temperatura del ensayo a 52°C. A su vez, para contrarrestar la disminución producida también en los valores de fluorescencia específica por el aumento de la temperatura, se aumentó a 10µl la cantidad de producto de PCR incubado con las sondas. Las sondas para Tc I, Tc II/V/VI, Tc III y CI, bajo estas nuevas condiciones sí produjeron valores de fluorescencia específicos >1000 y más de dos veces el valor del blanco (tabla 1.10). Sin embargo, ninguna de las sondas diseñadas para Tc IV dió señal de fluorescencia específica (datos no mostrados).

Muestra	Cepa	Sonda			
		Tc I	Tc II/V/VI	Tc III	CI
Tc I	Silvio X-10	2163	83	172	82
Tc II	Tu18	60	1555	72	84
Tc III	M5631	80	129	3880	101
CI	S(-) + CI	113	172	147	3623
PCR (-)	Blanco	62	243	87	84
TE 1x	Blanco	189	381	216	220

Tabla 1.10. Ensayo de Luminex realizado a 52°C con 10 µL de producto de PCR. Las sondas para Tc I, Tc II/V/VI, Tc III y CI, produjeron valores de fluorescencia específicos >1000 y más de dos veces el valor del blanco.

1.6 Análisis de la variabilidad genética de Tc I por PCR Inter-RE.

Se evaluaron distintas combinaciones de oligonucleótidos complementarios a los extremos de elementos repetitivos de *T. cruzi* con el fin de desarrollar un ensayo que permita analizar la variabilidad genética dentro de Tc I.

Los patrones con mayor resolución y reproducibilidad se obtuvieron al utilizar una combinación de los oligonucleótidos INS-F, INS-R, L1Tc-R, TcIRE-R (Tabla 1.4). A este ensayo lo denominamos PCR Inter-RE.

Se analizaron 12 cepas Tc I provenientes de Argentina, Brasil y Colombia, más una cepa Tc VI para enraizar el dendograma (Tabla 1.11, Fig. 1.13, Fig. 1.14). El dendograma, en general, mostró una asociación entre el porcentaje de similitud genética y el origen geográfico de las cepas. Esto se observa en las cepas recolectadas en la localidad de El Palmar, Chaco, Argentina, que tienen alto porcentaje de similitud genética, pero son distintas a las colectadas en las localidades de Tres Estacas y Pampa Avila, Chaco, Argentina. También se observa un alto porcentaje de similitud genética entre los aislados provenientes de Colombia. Sin embargo, el clon D11, que se obtuvo a partir de la cepa G, aparentemente no tienen un alto porcentaje de similitud genética con la población mayoritaria presente en el cultivo de la cepa G, demostrando la variabilidad que puede existir entre clones en una misma población.

Cepa	Calle	Origen	UTD
Cl-Brener	1	Brasil	VI
Silvio X-10	2	Brasil	I
SN3	3	Colombia (Sierra Nevada)	I
HA	4	Colombia (Casanare)	I
Gal-61-6	5	Colombia (Galeras)	I
Tev 91 cl5	7	Argentina (Loc. Tres Estacas)	I
Pav00 cl7	8	Argentina (Loc. Pampa Avila)	I
Pal V1 cl1	9	Argentina (Loc. El Palmar)	I
Pal V2-2 cl5	10	Argentina (Loc. El Palmar)	I
Pal V2-2 cl4	11	Argentina (Loc. El Palmar)	I
TCC cl1	12	Chile	I
D11	13	Brasil	I
G	14	Brasil	I

Tabla 1.11. Nombre, posición, origen y UTD de las cepas analizadas por PCR Inter-RE en la Fig. 1.12.

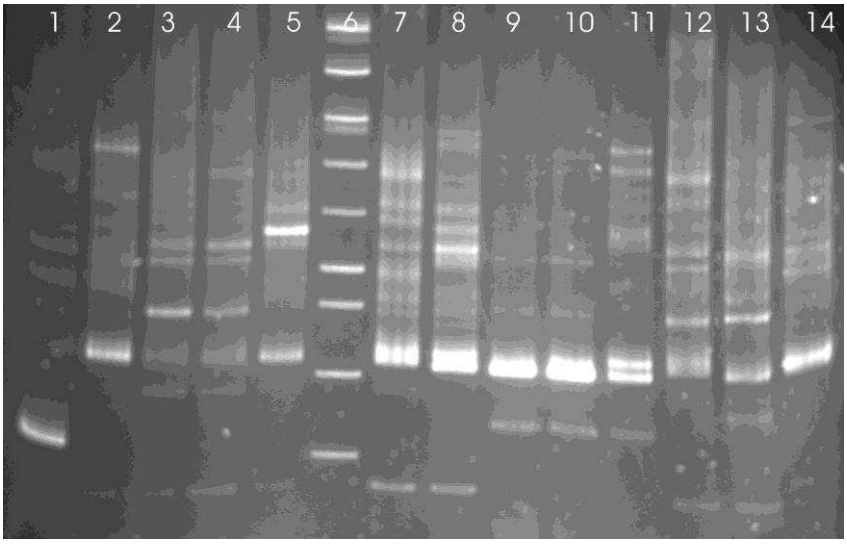

Fig. 1.13. Corrida electroforética mostrando los perfiles obtenidos por PCR Inter-RE. La procedencia y nombre de cada cepa se encuentra en la Tabla 1.11.

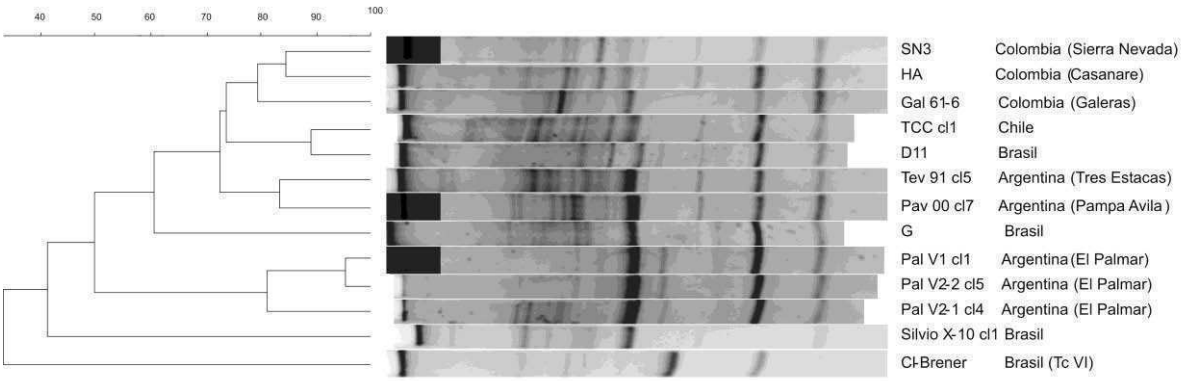

Fig. 1.14. Dendograma representando porcentaje de similitud genética entre aislados de *T. cruzi* analizados por PCR Inter-RE. Los países de origen las cepas utilizadas se encuentran a la derecha del nombre de las mismas. Para la construcción del dendograma se utilizó el coeficiente de similitud de Pearson.

1.7 Análisis del perfil genético de poblaciones de *T. cruzi* con microsatélites polimórficos.

Con el objetivo de analizar el grado de clonalidad de poblaciones parasitarias, en colaboración con el grupo de la Dra. Andrea Macedo (UFMG, Brasil), estudiamos hasta 5 loci de microsatélites polimórficos a 23 muestras biológicas y cultivos provenientes de pacientes argentinos que presentaban distintas formas de la patología de la enfermedad

de Chagas. Para algunas de las muestras, como análisis complementarios, se realizaron estudios de polimorfismo del gen ARNr 24Sα y el mitocondrial COII. (Tabla 1.12).

Los tres loci que permitieron identificar poblaciones policlonales fueron TAC15, TAT y AAAT, mientras que los loci ATT14 y AAT siempre resultaron tener uno o dos alelos, inclusive en poblaciones aparentemente policlonales.

Además, se observó para el locus TAC 15, que todas las muestras conteniendo poblaciones de Tc I portaron en homocigosis el alelo de 96 pb, ausente en las poblaciones pertenecientes a las otras UTD.

Los resultados biológicos obtenidos serán profundizados más adelante en el Capítulo 3.

Muestras Biológicas	Loci de Microsatélites					rDNA24Sα	COII
	TAC15	TAT	ATT14	AAT	AAAT		
801	99/132/135	184/220	265/274	250/250	259/271/279	110/125	B
802	99/132/135	184/220	265/274	250/250	259/271/279	110/125	B
814	99/132/135	n.a	n.a	n.a	n.a	110/125	n.a
AS	99/132/135	184/220	253/265	250/250	255/255	110/125	B + A
AL	96/96	184/184	253/262	n.a	255/255	110/125	A
HE	99/132/135	184/220	265/265	250/250	259/259	110/125	B
HT	132/135	n.a	n.a	n.a	n.a.	110/125	n.a
FA	99/99	220/223	265/265	n.a	263/263	110	n.a
Tx3.1-Sang-Per	n.a	181/181	n.a	n.e.	n.e.	n.a	n.e.
Tx3.2-Sang-Per	n.a	181/181	n.a	n.e.	n.e.	n.a	n.e.
Tx4.1-Sang-Per	99/135	184/220	265/274	n.e.	n.e.	n.a	n.e.
Tx4.2-Sang-Per	99/135	184/220	265/274	n.e.	n.e.	110/125	n.e.
Tx4.3-Sang-Per	n.a	184/184	274/274	n.e.	n.e.	n.a	n.e.
Tx5.Biop-Mioc	129/129	181/181	262/262	n.e.	n.e.	125	n.e.
Tx5.Sang-Per	129/129	181/181	262/262	n.e.	n.e.	125	n.e.
Tx5.Exp-Car	129/129	181/181	262/262	n.e.	n.e.	n.a	n.e.
Tx6.1-Sang-Per	96/96	n.a	253/253	n.e.	n.e.	110	n.e.
Tx6.2-Sang-Per	96/96	n.a	253/253	n.e.	n.e.	n.a	n.e.
Tx7.Chag-Piel	99/99	181/181	265/265	n.e.	n.e.	125	n.e.
Emb1-Sang-Per	n.a	184/220	265/265	n.e.	n.e.	110/125	n.e.
Emb2-Sang-Per	n.a	129/129	n.a	n.e.	n.e.	n.a	n.e.
Emb3-Sang-Per	99/99	n.a	n.a	n.e.	n.e.	110	n.e.
Emb4-Placenta	99/135	187/190/220	265/265	n.e.	n.e.	110/125	n.e.
Controles							
RA (Tc VI)	129/129	181/223	247/247	265/271	263/263	125	B
K98 (Tc I)	96/96	178/178	n.a	253/253	255/255	110	A
ARG (Tc V)	132/135	184/184	n.a	265/265	259/259	110	n.a
CL Brener (Tc VI)	129/141	181/223	247/292	265/271	263/263	125	B
JG (Tc II)	99/99	190/217	262/262	265/265	271/275	125	C
Col1.7G2 (Tc I)	96/96	181/181	229/229	253/253	255/255	110	A

Tabla 1.12. Perfil genético de *T. cruzi* utilizando un panel de 5 loci de microsatélites polimórficos, el gen ARNr 24Sα y el gen mitocondrial COII. n.a= no amplificó. n.e= no estudiado.

2

Desarrollo de métodos para la cuantificación de *T. cruzi*

En el presente capitulo se describe el desarrollo y aplicación de estrategias para la cuantificación de carga de *T. cruzi* por PCR en tiempo real (Q-PCR).

2.1 QPCR-SG

Esta primera estrategia desarrollada implica tres reacciones de PCR independientes que se realizan en tubos separados, utilizando SYBR Green para la detección de la formación de amplicones. Una reacción es utilizada para estimar la carga parasitaria de *T. cruzi* (QPCR-SG-Tc), la segunda reacción amplifica un control interno, que varía según el tipo de muestra analizada (QPCR-SG-CI, QPCR-SG-TNFα o QPCR-SG-APOB), mientras la tercer reacción (PCR-Lg) tipifica a la población parasitaria presente en la muestra según el número relativo de secuencias repetitivas por genoma.

2.1.1 Determinación de la sensibilidad y reproducibilidad de la QPCR-SG-Tc utilizando ADN purificado y muestras de sangre contaminada.

La sensibilidad analítica de la QPCR-SG-Tc se determinó utilizando diluciones seriadas de ADN purificado de cepas de referencia de *T. cruzi.* Se utilizaron las cepas Silvio X10 CL1 (Tc I) y CL-Brener (Tc VI).

Los límites de detección obtenidos fueron de 2 y 0,2 fg de ADN por tubo de reacción, con un rango dinámico de 10^7 y 10^8 para Silvio X10 CL1 y CL-Brener, respectivamente (datos no mostrados). Estos límites de detección corresponden a 0,01 y 0,001 equivalentes genómicos, teniendo en cuenta que una célula de *T. cruzi* contiene aproximadamente 200 fg de ADN.

También evaluamos estos parámetros operativos de la QPCR-SG-Tc utilizando muestras de sangre humana no infectada contaminadas con cantidades conocidas de epimastigotes cultivados de las cepas de referencia Silvio X10 cl1 y CL-Brener. El rango dinámico de la QPCR-SG-Tc utilizando muestras de sangre contaminada con la cepa Silvio X-10 fue de 0.1-10^5 p/ml y utilizando la cepa CL-Brener fue de 0.01-10^5 p/ml (Fig. 2.1).

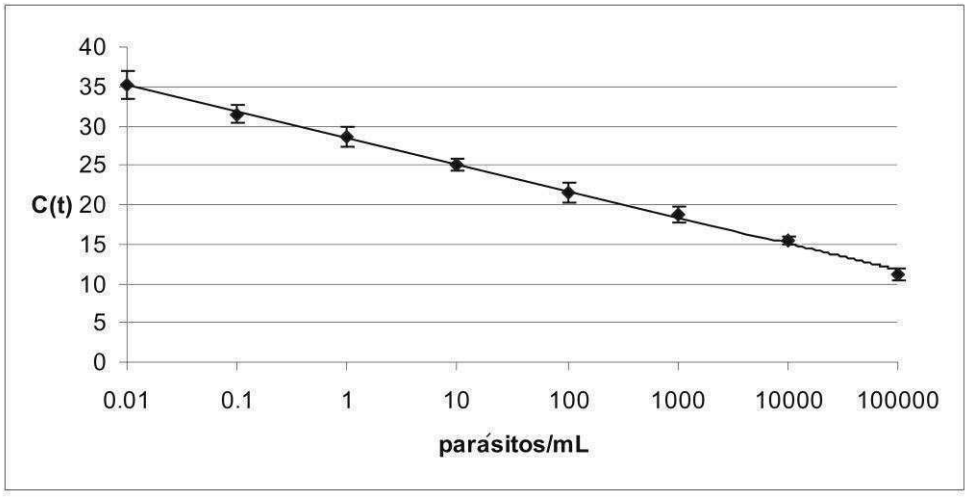

Fig. 2.1. Rango dinámico de la QPCR-SG-Tc para Cl-Brener. Los resultados están expresados como el número de parásitos por mililitro de sangre, y representan la media de 5 experimentos independientes. Pendiente = -3,35; Eficiencia = 99%; Rango Dinámico = 0,01 - 10^5 p/ml; R^2 = 0,998; C(t): ciclo umbral.

La repetitividad de la QPCR-SG-Tc fue estimada repitiendo 15 veces la misma muestra en la misma corrida, utilizando sangre contaminada con 100 p/ml y 1p/ml. Los coeficientes de variación de los valores de Ct obtenidos fueron 1,27% y 2,30%, respectivamente, para CL-Brener y 1,60% y 5,42%, respectivamente, para Silvio X10 CL1.

Además, se caracterizó la reproducibilidad del ensayo a partir del paso de extracción de ADN. Alícuotas de la misma preparación de sangre contaminada con 10 p/ml de la cepa CL-Brener fueron procesadas en veinte experimentos de purificación de ADN independientes. Para cada uno de dichos extractos de ADN, se cuantificaron los p/ml por triplicado y se calculó un valor promedio. El coeficiente de variación de las cargas parasitarias entre los 20 valores promedio fue de 1,69%, indicando una alta reproducibilidad del ensayo para el valor de carga parasitaria ensayado.

2.1.2 Estimación del número relativo de copias de ADN satélite por genoma en las seis UTD de *T. cruzi*.

A fin de evaluar si las diferencias en los límites de detección de la QPCR-SG-Tc obtenidos a partir de muestras de CL-Brener y Silvio X10 cl1, estuvieron relacionadas con un número diferencial de repeticiones de ADN satélite en sus respectivos genomas,

se cuantificó el número de secuencias satélite en relación al gen de copia única que codifica para la proteína ribosomal P2α. Se estimó esta relación para cepas de parásitos pertenecientes a las 6 UTD (Tabla 2.1). Las cepas pertenecientes a las UTD Tc II/V/VI mostraron cantidades similares de repeticiones de ADN satélite (Tabla 2.2.A), la cepa M5631 (Tc III) contiene la mitad de las repeticiones que las cepas antes mencionadas (Tabla 2.2.A), mientras una cepa Tc IV (CanIII) y seis cepas pertenecientes a Tc I de Argentina, Colombia y Brasil, albergan 10 veces menos repeticiones de ADN satélite (Tabla 2.2.A y 2.2.B) que las cepas de los UTD Tc II/V/VI. Esto está de acuerdo con la sensibilidad analítica obtenida con el ADN purificado y las muestras de sangre contaminada con los stocks de referencia.

A. Cepas de *T. cruzi* representativas de los 6 UTDs

UTD	Cepa de Referencia	Sat/P2α
Tc I	Silvio X-10 cl1	0,08
Tc II	Tu18	0,95
Tc III	M5631	0,47
Tc IV	Can III	0,08
Tc V	Mn cl2	1,10
Tc VI	Cl Brener	1,00

B. Cepas Tc I de diferentes paises endémicos

Cepas Tc I	País de Origen	Sat/P2α
Silvio X-10 cl1	Brasil	0,08
G	Brasil	0,13
HA	Colombia	0,11
SN3	Colombia	0,13
Pav 00	Argentina	0,09
Pal V2-2	Argentina	0,12

Los resultados están expresados unidades arbitrarias en función de la relación en el número de copias ADN satélite/P2α que contiene la cepa Cl-Brener

Tabla 2.2. Variación del número relativo de copias de ADN satélite por genoma.

Para poder cuantificar de manera más precisa la carga parasitaria en muestras clínicas es necesario poder estimar el número relativo de copias de ADN satélite que contiene la población de *T. cruzi* infectante. Para ello utilizamos la técnica de PCR-Lg descripta en Resultados ítem 1.2. Brevemente, este método distingue según la temperatura de

desnaturalización de los amplicones de ADN satélite a las poblaciones Tc I/IV, que contienen aproximadamente 10 veces menos repeticiones de ADN satélite, de las poblaciones Tc II/III/V/VI.

2.1.3 Selección de métodos de extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas.

Se extrajeron 55 muestras de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Chagas, utilizando una adaptación del protocolo del ADN QIAmp Mini Kit de Qiagen y un método de extracción no comercial basado en Fenol-Cloroformo (F-Cl).

La utilidad de ambos métodos fue evaluada mediante la detección de inhibidores de la QPCR-SG-CI en el ADN extraído. La presencia de inhibidores fue evaluada por 1) el bajo rendimiento de la amplificación del control interno (CI), dando lugar a menos de 0,1 Unidades Arbitrarias (UA) y 2) la mejora del rendimiento de la amplificación del CI, dando lugar a más de 0,001 UA cuando el producto de extracción se diluyó 1/100 previo a la realización de la QPCR-SG-CI. Utilizando el método basado en F-Cl, se detectaron rastros de inhibidores de la QPCR-SG-CI en 16 (29%) muestras, mientras que para el protocolo comercial no se detectaron inhibidores en ninguna de las muestras.

De las 16 muestras que presentaron rastros de los inhibidores de la QPCR-SG-CI cuando se extrajeron con el método basado en F-Cl, 4 fueron negativas para *T. cruzi* por ambos métodos de extracción, 3 presentaron cargas parasitarias similares por ambos métodos, 8 presentaron mayor carga parasitaria cuando se extrajeron con el kit comercial, y una sola resultó positiva solo cuando se extrajo con el kit comercial. En las 39 muestras extraídas por F-Cl que no se detectaron inhibidores de la Q-PCR, se obtuvieron resultados similares de cuantificación parasitaria a los obtenidos con el kit comercial. En base a estos datos, el protocolo de extracción de ADN QIAmp Mini Kit fue seleccionado para el análisis de las muestras clínicas.

2.1.4 Cuantificación de la carga parasitaria por QPCR-SG en muestras clínicas de sangre periférica.

Un panel de muestras de sangre periférica humana se analizó mediante la estrategia de QPCR-SG. La Tabla 2.3 describe los pasos necesarios para el cálculo de las cargas parasitarias, teniendo en cuenta el factor de linaje (FdL) deducido por PCR-Lg de ADN satélite (Resultados 1.2), las UA del CI calculado por QPCR-SG-CI, la valor inicial de carga parasitaria por QPCR-SG-Tc y el volumen de muestra de ADN utilizado por reacción. Por ejemplo, en el caso Tx1c, la QPCR-SG-Tc por si sola cuantificó 0,39 p/ml, pero se amplificaron 0,43 UA del CI, y el FdL fue de 10 (*T. cruzi* I), obteniéndose un resultado final de 9,07 p/ml. Este valor resulta ser 23 veces mayor que el obtenido por QPCR-SG-Tc solamente. En el caso Pd6, un paciente pediátrico con muy baja parasitemia, el FdL no pudo ser determinado por PCR-Lg, ya que la baja concentración de amplicones dio lugar a picos de temperatura de desnaturalización poco confiables, y por lo tanto la carga parasitaria sólo puede expresarse como un rango de valores. En los casos Tx1a y Tx2c, también con bajos niveles de parasitemia, el FdL se presume de los datos anteriores obtenidos a partir de muestras de los mismos pacientes, porque anteriormente se ha demostrado que las UTD de *T. cruzi* han sido persistentes durante el recrudecimiento que conduce a la reactivación clínica en estos pacientes (Diez y col., 2007).

Los casos Pd2a y Tx2b presentan altas cargas parasitarias, 512 y 468 p/ml, respectivamente. En ambos casos, cuando se realizó la PCR-Lg se amplificaron dímeros de las repeticiones en tándem del ADN satélite de manera preferencial sobre los monómeros, dando lugar a amplicones de mayor tamaño con temperaturas de desnaturalización superiores a 86°C (Tabla 2.3).

Para evitar la amplificación preferencial de los dímeros de copias de ADN satélite, y favorecer la amplificación de los monómeros, cuando los resultados de la QPCR-SG-Tc son superiores a 10 p/ml, el ADN debe ser diluido a aproximadamente 1 p/ml antes de realizar la reacción de PCR-Lg.

Caso	Edad/Género	Diagnóstico Clínico	Muestra	QPCR-SG-Tc ($N_{p/reacción}$ / V)	QPCR-SG-CI (UA)	PCR-Lg (Td °C)	Grupo Sat	FdL	Carga Parasitaria Np/mL = (Np/reacción x FdL / UA) / V
Pd 1a	7 años / M	Congénito	Pre-tmt	7,2	0,87	84,6	2	1	8,28
1b			7 daís de tmt	0,1	0,97	84,6	2	1	0,1
1c			30 días de tmt	0,76	1,21	84,4	2	1	0,63
1d			60 días de tmt	0,95	0,82	84,6	2	1	1,16
Pd 2a	3 meses / M	Congénito	Pre-tmt	527	1,03	84,5‡	2	1	512
2b			30 días de tmt	0,29	0,67	84,8	2	1	0,43
2c			60 días de tmt	1,01	1,34	84,4	2	1	0,75
Pd 3	1 año / F	Congénito	Pre-tmt	14.69	1,27	84,4	2	1	11,57
Pd 4	2 años / M	Congénito	Pre-tmt	0,34	0,49	84,6	2	1	0,69
Pd 5	3 años / F	Congénito	Pre-tmt	0,54	1,18	84,6	2	1	0,46
Pd 6	10 años / F	Indeterminado	Pre-tmt	0,04	0,74	ND	ND#	ND#	0,05-0,5
Tx 1a	46 años / M	Cardiomiopatía Crónica con Trasplante Cardíaco	5 días pre-Tx	0,03	1,26	ND	1*	10*	0,22
1b			29 días post-Tx	0,59	1,53	85,2	1	10	3,85
1c			reactivación 78 días post-Tx	0,39	0,43	85,3	1	10	9,07
Tx 2a	61 años / F	Cardiomiopatía Crónica con Trasplante Cardíaco	7 días post-Tx	2,23	0,84	84,5	2	1	2,66
2b			reactivación 92 días post-Tx	342	0,73	84,6‡	2	1	468
2c			12 días post-tmt	0,13	1,84	ND	2*	1*	0,07

Tabla 2.3. Ejemplos del cálculo de la carga parasitaria en pacientes con enfermedad de Chagas pediátricos y trasplantados cardíacos con la estrategia QPCR-SG. En las muestras de los pacientes trasplantados (Tx) donde se pudo determinar el FdL de la población parasitaria, se dedujo que era el mismo que el detectado en otras muestras del mismo paciente, asumiendo una población parasitaria persistente durante el evento de reactivación (Diez y col 2007). En el caso Pd6 no se pudo presumir el FdL del la población parasitaria. ND: No determinado. ‡ Muestras diluidas previo a PCR-Lg.

2.2 QPCR- MTq

Esta segunda estrategia consiste en un ensayo de PCR en tiempo real utilizando sondas Taqman para la cuantificación de *T. cruzi* y un Control Interno (CI) en una misma reacción multiplex. Para la cuantificación de *T. cruzi* utilizamos los oligonucleótidos y la sonda diseñadas por Pirón y colaboradores (Piron y col., 2007), mientras que como CI utilizamos el mismo plásmido que para la reacción QPCR-SG-CI, pero diseñamos oligonucleótidos y sonda nuevas para su detección en este ensayo.

Estas modificaciones permiten simplificar el ensayo, ya que se realizan menos reacciones de amplificación, así como aumentar su robustez, al estar asociadas la cuantificación del CI y *T. cruzi*.

Al igual que para la estrategia de QPCR-SG, también es necesario realizar el ensayo de PCR-Lg para estimar el número relativo de copias de ADN satélite que contiene la población infectante en relación a la cepa utilizada para la construcción de la curva estándar.

Para poner a punto algunos parámetros iniciales se realizaron las reacciones de amplificación para *T. cruzi* y CI por separado. A estas reacciones las denominamos QPCR-Tq-Tc y QPCR-Tq-CI.

Los siguientes parámetros de reacción fueron optimizados en los laboratorios de LaBMECh-INGEBI, Buenos Aires, Argentina y IIBISMED-CUMETROP, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

1- Evaluación de la concentración óptima de sonda Taqman: Se evaluaron concentración de 400, 200, 100 y 50 nM de sonda para las reacciones QPCR-Tq-Tc y QPCR-Tq-CI. Para ambas reacciones la concentración con la que se observó una mayor eficiencia de amplificación fue con 50 nM de sonda (datos no mostrados).

2- Evaluación de Master Mix comerciales: Se evaluaron las Master Mix comerciales de Invitrogen (TaqMan Fast Advanced Master Mix), Roche (FastStart PCR Master Mix), Applied Biosystems (TaqMan Universal PCR Master Mix) y Qiagen (Multiplex PCR Kit) con QPCR-Tq-Tc. Primero se realizó una prueba preliminar con las Master Mix de Invitrogen, Roche y Qiagen, que son las que disponíamos en LaBMECh-INGEBI, y evaluamos su rendimiento al amplificar una curva estándar de *T. cruzi* + sangre humana. Se observó que con la Master Mix de Invitrogen la sensibilidad de la reacción era 2 órdenes inferior a la obtenida con las Master Mix de Roche y Qiagen, por lo que fue descartada (datos no mostrados). En IIBISMED-CUMETROP, Cochabamba, se evaluaron las Master Mix de Roche, Applied Biosystems y Qiagen con un panel de muestras de 21 pacientes crónicos (Tabla 2.4).

3- Optimización de la QPCR-MTq: Una vez determinada la Master Mix comercial y las condiciones de reacción que brindaban la mayor positividad en muestras clínicas para QPCR-Tq-Tc procedimos a optimizar la concentración de oligonucleótidos de la reacción de amplificación del CI y la cantidad de CI a agregar previo a la extracción de la muestra para realizar el ensayo en modalidad multiplex (QPCR-MTq). Para asegurase la correcta amplificación de ambos blancos moleculares en el mismo tubo de reacción agregamos una cantidad de CI suficientemente alta como para que su Ct sea siempre mayor al de *T. cruzi*, pero a su vez, cantidad limitante de oligonucleótidos que

Paciente	Master Mix					
	Applied Biosystems		Roche		Qiagen	
	C(t)	Resultado	C(t)	Resultado	C(t)	Resultado
220	No Ct	negativo	No Ct	negativo	NE	NE
221	39,06	positivo	33,34	positivo	33,28	positivo
222	No Ct	negativo	No Ct	negativo	NE	NE
223	No Ct	negativo	No Ct	negativo	No Ct	negativo
224	38,24	positivo	No Ct	negativo	No Ct	negativo
225	38,35	positivo	39,7	positivo	35,38	positivo
226	43,68	positivo	30,66	positivo	No Ct	negativo
227	No Ct	negativo	No Ct	negativo	No Ct	negativo
228	No Ct	negativo	No Ct	negativo	40,77	positivo
229	No Ct	negativo	38,15	positivo	No Ct	negativo
230	No Ct	negativo	No Ct	negativo	No Ct	negativo
231	No Ct	negativo	41,49	positivo	39,51	positivo
232	No Ct	negativo	42,11	positivo	37,00	positivo
234	No Ct	negativo	37,11	positivo	39,68	positivo
235	NE	NE	35,52	positivo	41,06	positivo
236	No Ct	negativo	38,48	positivo	No Ct	negativo
237	No Ct	negativo	No Ct	negativo	No Ct	negativo
238	No Ct	negativo	No Ct	negativo	No Ct	negativo
240	41,50	positivo	32,00	positivo	40,58	positivo
243	37,50	positivo	34,08	positivo	33,22	positivo
244	No Ct	negativo	31,17	positivo	37,19	positivo
Positividad	35/		57/		48/	

Tabla 2.4. Positividad en un lote de sangre periférica de 21 pacientes crónicos utilizando tres Master Mix comerciales distintas, todo el resto de los reactivos fueron idénticos. NE: no evaluado.

amplifican el CI para que no consuman demasiados reactivos, permitiendo una posterior amplificación eficiente y por lo tanto una detección sensible del ADN blanco de *T. cruzi* en el mismo tubo de reacción. Se evaluaron distintas concentraciones de CI y de oligonucleótidos para CI, y su influencia en la sensibilidad y la eficiencia de amplificación de ambos blancos moleculares por QPCR-MTq. Para ello se utilizó una curva estándar de *T. cruzi* y CI en sangre humana.

Elegimos agregar 200 pg de plásmido CI previo a la extracción de las muestras de sangre ya que esta cantidad produce un Ct cercano al ciclo 20 (Tabla 2.5). Para que una muestra de sangre periférica tenga un Ct mayor a 20, el pacientes debería tener >5000 p/ml, lo cual es muy poco probable entre los pacientes crónicos inmunocompetentes que serán evaluados con esta técnica (ver Discusión). Con dicha cantidad de CI y una concentración de oligonucleótidos de 100 nM, al realizar la reacción de QPCR-MTq la

sensibilidad y la eficiencia de amplificación de *T. cruzi* no variaba con respecto a la reacción QPCR-Tq-Tc, y a su vez se lograba una eficiencia de amplificación del CI mayor a 90% (datos no mostrados). Corroboramos esto en muestras clínicas al comparar la positividad de la QPCR-MTq y de la QPCR-Tq-Tc en un panel de 14 pacientes crónicos, donde para ambas reacciones se obtuvo una positividad del 71.4% (Tabla 2.5).

Paciente	Reacción					
	QPCR-MTq			QPCR-Tq-Tc		
	Blanco Molecular	CT	Resultado	Blanco Molecular	CT	Resultado
274	Tc	No Ct	negativo	Tc	No Ct	negativo
	CI	19,26	positivo			
275	Tc	34,36	positivo	Tc	34,36	positivo
	CI	19,27	positivo			
276	Tc	33,00	positivo	Tc	33,00	positivo
	CI	19,15	positivo			
277	Tc	28,25	positivo	Tc	28,56	positivo
	CI	19,28	positivo			
278	Tc	43,05	positivo	Tc	No Ct	negativo
	CI	19,36	positivo			
S(-)	Tc	No Ct	negativo	Tc	No Ct	negativo
	CI	19,33	positivo			
279	Tc	32,83	positivo	Tc	32,00	positivo
	CI	21,67	positivo			
280	Tc	38,59	positivo	Tc	38,10	negativo
	CI	24,65	positivo			
281	Tc	34,01	positivo	Tc	39,44	negativo
	CI	20,78	positivo			
282	Tc	34,50	positivo	Tc	No Ct	negativo
	CI	19,43	positivo			
283	Tc	No Ct	negativo	Tc	33,35	positivo
	CI	19,00	positivo			
S(-)	Tc	No Ct	negativo	Tc	No Ct	negativo
	CI	19,44	positivo			
284	Tc	40,00	positivo	Tc	No Ct	negativo
	CI	19,11	positivo			
285	Tc	No Ct	negativo	Tc	35,44	positivo
	CI	19,19	positivo			
286	Tc	30,61	positivo	Tc	32,00	positivo
	CI	19,31	positivo			
287	Tc	No Ct	negativo	Tc	41,12	positivo
	CI	19,08	positivo			
S(-)	Tc	No Ct	negativo	Tc	No Ct	negativo
	CI	20,71	positivo			
H20 Bl. Extracción	Tc	No Ct	negativo	Tc	No Ct	negativo
	CI	19,87	positivo			
C (+) 75 p/mL	Tc	26,54	positivo	Tc	26,72	positivo
	CI	20,35	positivo			
H20 Bl. PCR	Tc	No Ct	negativo	Tc	No Ct	negativo
	CI	No Ct	negativo			
Positividad	71,40%			71,40%		

Tabla 2.5. Muestras de sangre periférica de pacientes crónicos analizadas por QPCR-MTq y QPCR-Tq-Tc. Ambas reacciones muestran la misma positividad.

3

Aplicación de métodos de tipificación molecular y determinación de carga parasitaria a casos clínicos y estudios eco-epidemiológicos

En el presente capítulo se describe la aplicación de los métodos moleculares desarrollados en este trabajo de Tesis a distintos escenarios clínicos y eco-epidemiológicos de la infección por *T. cruzi*. En la mayoría de los casos, estos estudios se complementaron integrando métodos moleculares ya disponibles en el laboratorio o a través de colaboraciones nacionales e internacionales en las cuales participé durante

el desarrollo de esta tesis, con el objeto de arribar a un análisis lo más completo posible de los mismos.

3.1 Estudios Clínicos

3.1.1 Perfil genético de *T. cruzi* en la transmisión connatal

Analizamos la complejidad clonal de las poblaciones parasitarias utilizando microsatélites, en dos mellizas que nacieron infectadas con Chagas connatal y en su madre seropositiva. Se analizaron muestras de ADN obtenidas directamente a partir de la sangre periférica de los tres pacientes, así como luego de haber sido inoculadas en ratón para su propagación por el equipo de la Dra. S. M. González Cappa (Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA).

Para las muestras de sangre periférica de los tres pacientes, los mismos alelos detectados en la madre (muestra 814 de la Tabla 1.12), se observaron en ambas mellizas (muestras 801 y 802 de la Tabla 1.12). En particular, se observaron tres picos alélicos para los loci TcTAC15 y TcAAAT6 (Fig. 3.1. 99, 132 y 135 pb, y 259, 271 y 279 pb, respectivamente), sugiriendo policlonalidad.

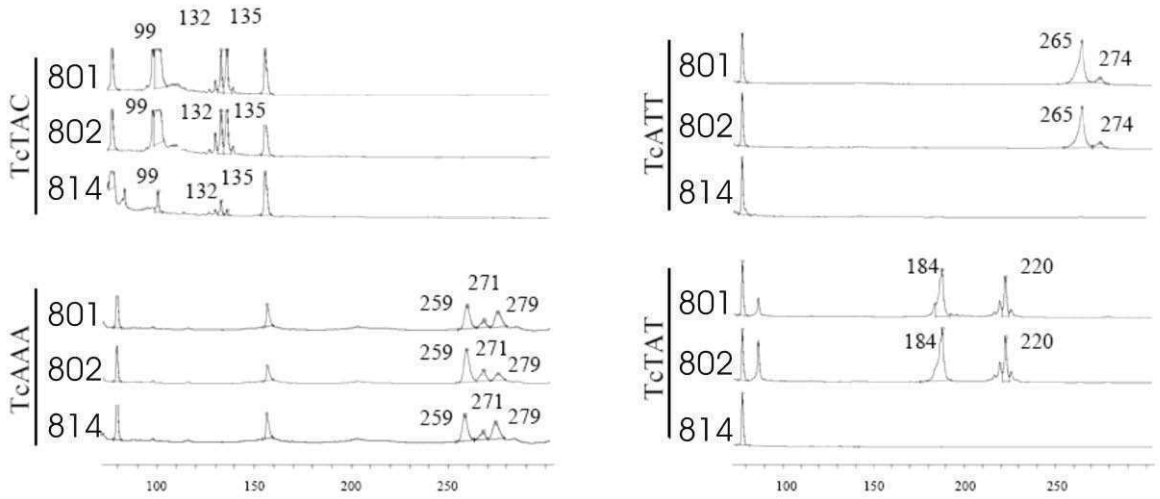

Fig. 3.1. Complejidad clonal de muestras de sangre de dos mellizos (801 y 802) infectados connatalmente y su madre (814). Se observa el mismo perfil policlonal tanto en la madre como en ambos mellizos para los loci de microsatélites TcAAAT6 y TcTAC15.

Al analizar los perfiles de microsatélites para los mismos dos loci, de las poblaciones parasitarias recuperadas después de su pasaje por ratón (muestras HE y HT de la Tabla 1.12), se observó que el alelo de 99pb del locus TcTAC15 estaba ausente en una de las muestras (muestra HE de la Tabla 1.12). Esto claramente demuestra la selección clonal de una parte de la población parasitaria original durante el proceso de aislamiento parasitario (Fig. 3.2)

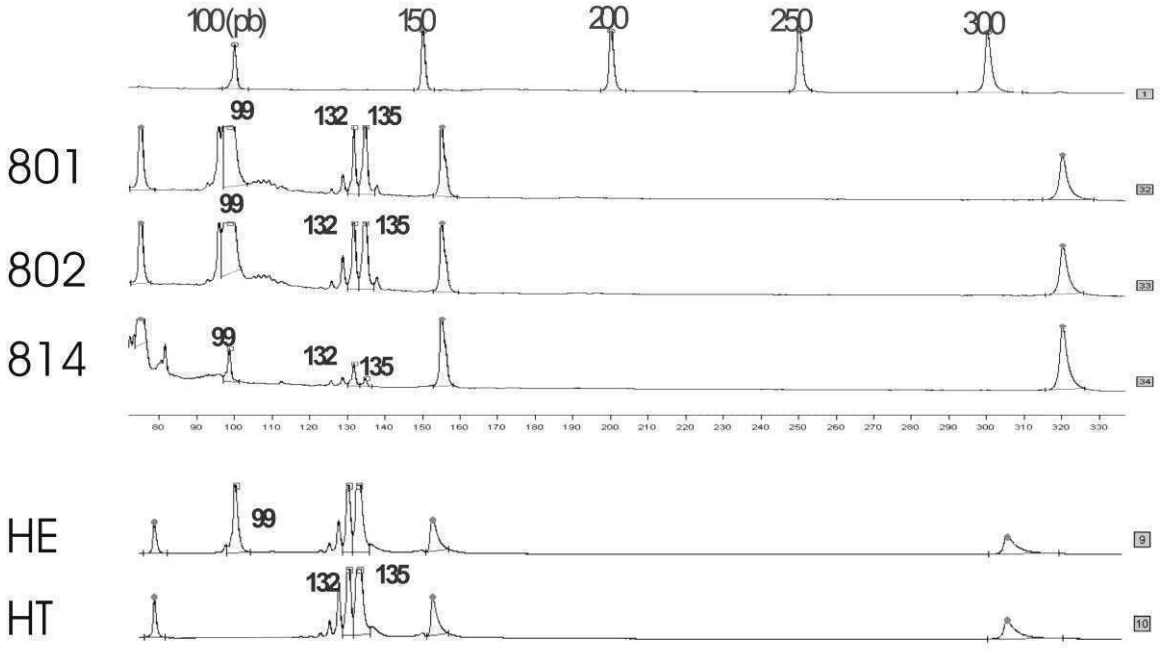

Fig. 3.2. Muestras de sangre de cada uno de los mellizos fueron inoculadas y propagadas en ratón y luego analizadas para observar la posible selección de ciertas poblaciones: Se puede observar que el alelo de 99pb presente en las muestras de los pacientes no está presente luego de uno de los pasajes por ratón (muestra HT), indicando una selección de las poblaciones originales en el modelo murino. Las poblaciones luego del pasaje por ratón también fueron analizadas utilizando las reacciones PCR-SL I y II, PCR-24Sα-HN y PCR Pr1-Pr3 y son de UTD Tc V/VI al igual que lo previamente observado en la sangre de los mellizos.

3.1.2 Perfil genético y carga parasitaria de *T. cruzi* en muestras de placenta de madres con enfermedad de Chagas.

Adaptamos la estrategia QPCR-SG desarrollada originalmente para sangre periférica, para determinar la carga parasitaria en muestras de tejido humano. En este caso, los valores de carga parasitaria son expresados en función al número de células

humanas, en lugar de utilizar un plásmido como control interno. El número de células humanas es cuantificado mediante una reacción de PCR en tiempo real, denominada QPCR-SG-APOB, utilizando oligonucleótidos complementarios al gen de copia única de la apolipoproteína B (Materiales y Metodos).

Con esta estrategia determinamos la carga parasitaria en 6 muestras de placenta de madres con enfermedad de Chagas, que ya habían dado resultados positivos al ser analizadas por PCR-ADNk (Tabla 3.1).

Muestra	Parásitos / 10^7 células humanas
P1	<0,01
P2	<0,01
P3	0,08
P4	<0,01
P5.1	116
P5.2	104

Tabla 3.1. Número de parásitos por cada 10^7 células humanas. Las muestras P5.1 y P5.2 corresponden a diferentes secciones de la misma placenta. El resto de las muestras provienen de placentas y madres distintas.

Se eligió la muestra P5.1 para realizar un análisis de microsatélites y determinar la UTD infectante, debido a que su carga parasitaria se encuentra en el rango de sensibilidad de los métodos de tipificación. La población resultó policlonal y perteneciente a la UTD Tc V (Ver Tabla 1.12. muestra Emb4-Placenta en el Capítulo 1.7).

3.1.3 Seguimiento de la respuesta parasitológica al tratamiento etiológico en pacientes pediátricos con enfermedad de Chagas.

Las cargas parasitarias pre-tratamiento fueron evaluadas en 43 niños con la enfermedad de Chagas connatal o vectorial. Las cargas parasitarias basales variaron desde 640 hasta 0,01 p/ml, y se correlacionaron con la edad de los pacientes en el momento del diagnóstico (coeficiente de Spearman: -0,5832, P <0,05) (Fig. 3.3).

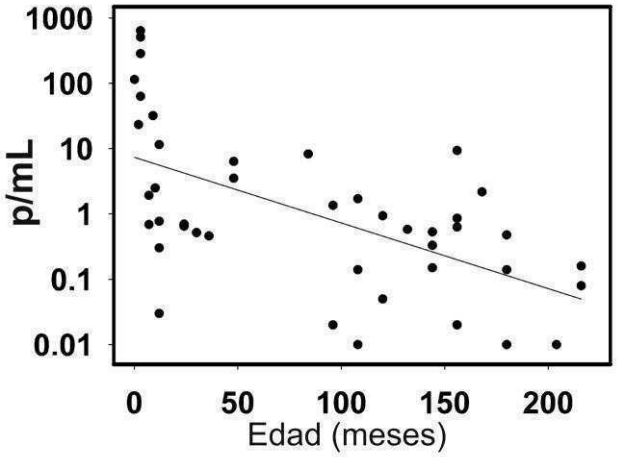

Fig. 3.3. Asociación entre parasitemia previa al tratamiento y la edad en 43 casos de pacientes pediátricos. Coeficiente de correlación de Spearman: -0.5832; P<0.05.

Treinta y ocho de estos pacientes fueron seguidos por QPCR-SG durante los 60 días de tratamiento etiológico con benznidazol. Las cargas parasitarias fueron determinadas en el momento del diagnóstico (t1) en 38 casos, a los 7 (T2), 30 (T3) y 60 (T4) días de tratamiento en 31 casos.

La Fig. 3.4 y la Tabla 2.3 (Sección 2.1.4) muestran la respuesta parasitológica de estos pacientes durante el tratamiento. Los resultados para *T. cruzi* de QPCR-SG en t2 fueron negativos en 24 de los 31 pacientes (77%), en T3 en 27 de los 31 pacientes (87%) y en T4 en 29 de los 31 pacientes (94%).

Uno de los pacientes positivos en T4 era un niño de 7 años de edad, cuya carga de parásitos disminuyó de 8,28 p/ml en t1 (Pd1a), a 0,1 p/ml en t2 (Pd1b), luego elevándose a 0,63 p/ml en la T3 (Pd1c) y a 1,16 p/ml en T4 (Pd1d) (Fig. 3.4, Tabla 2.3). El otro paciente positivo en t4 fue un bebé de 3 meses, que muestra cargas parasitarias cuantificables en las tres muestras analizadas, 512 p/ml a t1 (Pd2a), 0,43 p/ml en T3 (Pd2b) y 0,75 p/ml en T4 (Pd2c) (Fig. 3.4, Tabla 2.3). Ambos pacientes fueron seguidos por PCR-ADNk con resultados persistentemente positivos a los 6, 12 y 18 meses post-tratamiento, lo que sugiere el fracaso del tratamiento (datos no mostrados).

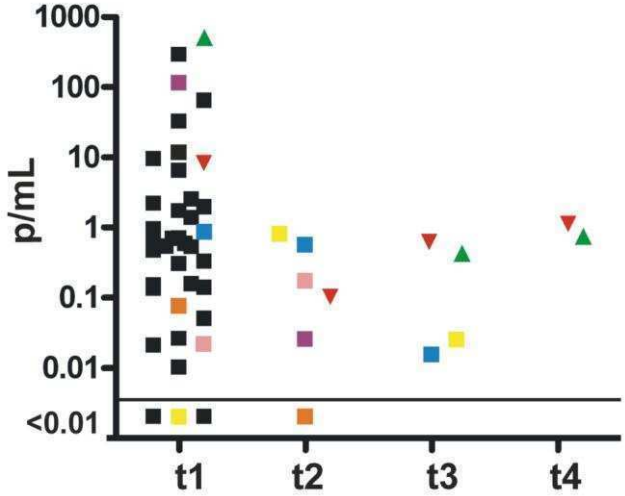

Fig. 3.4. Seguimiento de la respuesta parasitológica al tratamiento con benznidazol en 38 pacientes pediátricos. Solo se muestra la evolución de la carga parasitaria de los pacientes con más de una muestra positiva. Las muestras fueron tomadas al momento del diagnóstico (t1), a los 7 días (t2) y a los 30 días de tratamiento (t3), así como a su finalización a los 60 días (t4). Solo se muestran los resultados positivos para *T. cruzi*. La línea horizontal representa el límite inferior del rango dinámico de la QPCR-SG-Tc.

3.1.4 Perfil genético de las poblaciones involucradas en la reactivación chagásica en coinfección por VIH.

CASO 1

Introducción: Parte de los métodos desarrollados en el transcurso de este trabajo fueron aplicados a resolver el caso de un paciente de 29 años de edad, VIH-positivo, argentino, nacido en Buenos Aires hospitalizado en febrero de 2003 con hemiparesia izquierda y dolor de cabeza prolongado de 1 mes de evolución. La resonancia magnética mostró múltiples masas en el hemisferio izquierdo del cerebro y el serodiagnóstico para IgG anti-toxoplasma fue débilmente positiva, cercana a la línea de corte (6 UI / ml).

En consecuencia, ante la presunción de toxoplasmosis cerebral se llevó a cabo tratamiento específico con respuesta refractaria. Esto llevó a realizar una biopsia intracraneal guiada por CT-scan para determinar la etiología de la encefalitis. El análisis histológico mostró edema y un alto recuento de linfocitos pero no se observaron protozoarios.

Por lo tanto, aplicamos procedimientos de PCR dirigidos a la secuencia B1 de *T. gondii* y a las secuencias de minicírculo y satélite de *T. cruzi* a partir de extractos de ADN de tejido del cerebro. La muestra sólo reveló la presencia de ADN de *T. cruzi*, lo que indicó enfermedad de Chagas cerebral. En muestras de ADN de sangre periférica también se pudo detectar la presencia de *T. cruzi* por PCR-ADNk. Para confirmar la infección por *T. cruzi*, se le realizó un serodiagnóstico por ELISA, que resultó positivo. Por lo tanto, sobre la base de los resultados la amplificación de ADN y la reactividad serológica, el paciente recibió un diagnóstico final de encefalitis chagásica. En consecuencia, se inició el tratamiento con benznidazol (5 mg kg-día.).

Resultados: Para identificar las UTD presentes en las poblaciones parasitarias de sangre periférica y del chagoma cerebral, se realizaron los ensayos PCR-SL y PCR-24Sα-HN.

Los resultados fueron compatibles con una infección por poblaciones parasitarias *T. cruzi* V en sangre, mientras que la biopsia cerebral podía estar infectada por Tc II y/o VI. Para poder distinguir si se encontraban poblaciones parasitarias de una de las dos UTD o de ambas, se realizó la PCR Pr1-Pr3 dirigida al fragmento A10 en su modalidad hemi-nested por PCR en Tiempo Real. La presencia de un único pico de desnaturalización por debajo de los 84°C sugiere la presencia exclusiva, o al menos altamente mayoritaria, de una población Tc II. Para determinar si la población Tc II estaba compuesta por un clon de parásitos o por una población policlonal se realizó durante una estadía en el laboratorio de la Dra. Andrea Macedo el análisis de loci polimórficos de microsatélites. El análisis del locus TAC15 reveló la presencia de 3 alelos, lo que indicaría una población policlonal (Fig. 3.5).

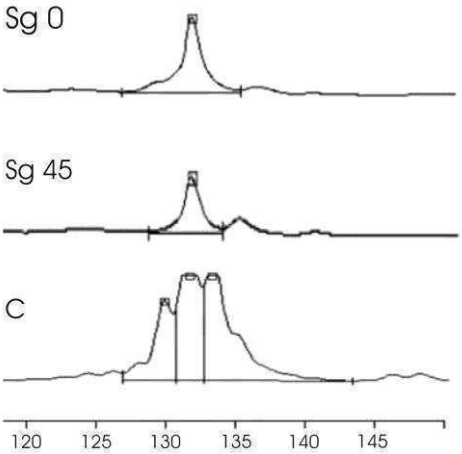

Fig. 3.5. Perfil del locus de microsatélite TAC15 en muestras de Sg0: sangre previo al tratamiento con benznidazol, Sg45: sangre 45 días post tratamiento y C: biopsia de cerebro. La escala para el tamaño de los amplicones está indicada en pares de bases.

CASO II

Introducción: El paciente tenía 41 años de edad, era de nacionalidad boliviana pero vivía en Argentina, e ingresó al Hospital Pirovano de Buenos Aires en Febrero del 2005 con fiebre, parálisis de las extremidades inferiores, iscuria, y un diagnóstico presuntivo de mielitis transversa. Tuvo resultados serológicos positivos para V.I.H., Virus Herpes zoster, citomegalovirus, toxoplasmosis, y *T. cruzi*. Se le administró ganciclovir, azitromicina, benznidazol y HAART, pero el paciente evolucionó a sepsis y murió 2 días después del diagnóstico.

Resultados: Para la genotipificación de las poblaciones infectantes de *T. cruzi* se tomaron muestras de sangre periférica y de líquido cefalorraquídeo, se extrajo el ADN, se realizaron ensayos de PCR para determinar las UTD presentes y se caracterizaron 4 loci polimórficos de microsatélites de *T. cruzi*.

Análisis de microsatélites: En la muestra de LCR se amplificó un solo alelo para los loci TcTAT20, TcTAC15, y TcAAAT6 y 2 alelos para TcATT14 (Tabla 3.2), sugiriendo la presencia de una población parasitaria monoclonal. A partir de la muestra de sangre periférica también se amplificaron uno o dos alelos para los loci TcTAT20, TcAAAT6 y TcATT14, pero tres alelos para TcTAC15, sugiriendo la presencia de una población policlonal de *T. cruzi*.

Ensayo	Muestra	
	Sangre Periférica	LCR
PCR		
PCR-SL I	475	475
PCR-SL II	425	NA
PCR-24Sα-HN	125 + 140	125
PCR Pr1-Pr3	525	525
RFLP		
Haplotipo COII	A + B	A
Microsatélites		
TAT15	99/132/135	96/96
TAT20	184/220	184/184
ATT14	253/265	253/262
AAAT	255/255	255/255

Tabla 3.2. Perfil genético de las poblaciones de *T. cruzi* en muestras de sangre periférica y LCR de un paciente con coinfección V.I.H.-Chagas. NA: no amplificó. Los números representan el tamaño de los amplicones en pares de bases.

Determinación de las UTD infectantes: Para ambas muestras además se realizaron los ensayos de PCR-SL I y II, PCR-24Sα-HN, Haplotipo COII y PCR Pr1-Pr3 en modalidad hemi-nested. Según estos ensayos la población monoclonal presente en el LCR es Tc I, mientras que la población policlonal en la sangre periférica está compuesta por parásitos de las UTD Tc I y Tc V (Tabla 3.2).

3.1.5 Seguimiento por QPCR-SG de la reactivación parasitológica y la respuesta al tratamiento en pacientes inmunosuprimidos por trasplante cardíaco

Muestras almacenadas de sangre periférica de tres pacientes con cardiopatía chagasica crónica severa, trasplantados de corazón, infectados con poblaciones parasitarias de diferentes UTD, y que presentaron distintos patrones clínicos de reactivación, fueron analizadas retrospectivamente utilizando la estrategia de QPCR-SG (Fig. 3.6).

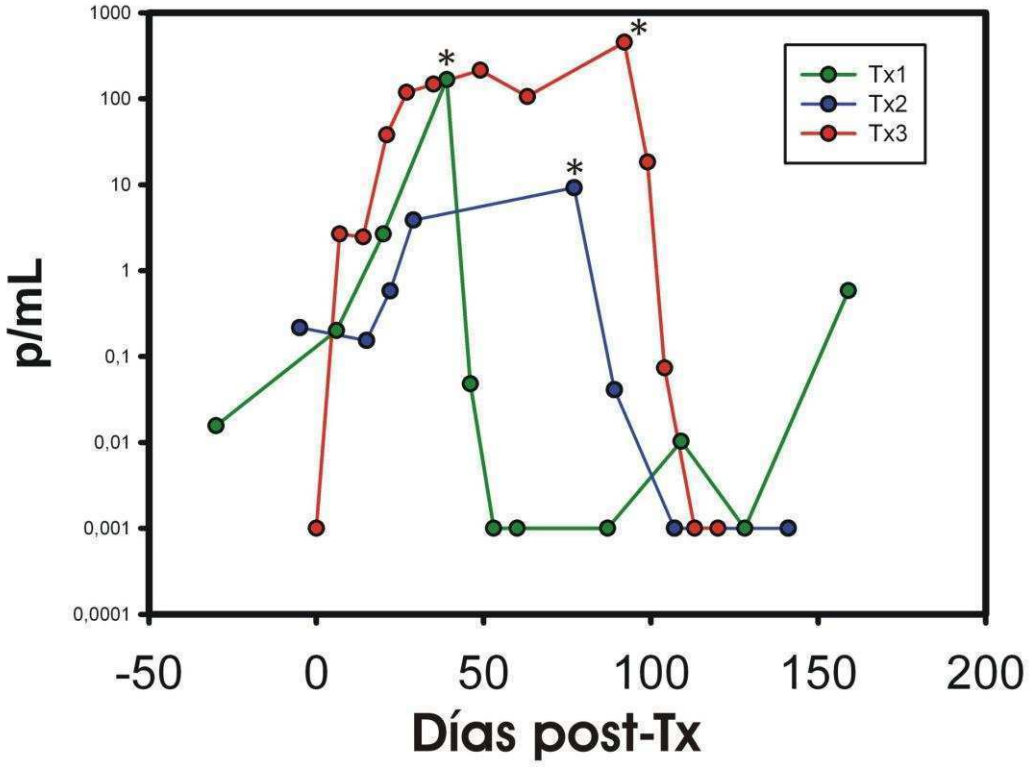

Fig. 3.6. Carga parasitaria en sangre periférica de pacientes con cardiopatía chagásica crónica severa con reactivación parasitológica debido a la inmunosupresión post-trasplante. * Momento de detección de la reactivación clínica y comienzo del tratamiento etiológico.

El caso Tx1 (sexo masculino, edad 46 años, nacido en Chaco, Argentina) presentó resultados de positivos para *T. cruzi* (0,22 p/ml) previo al trasplante de corazón. La reactivación clínica se diagnosticó el día 78 post-transplante por una biopsia de un chagoma de piel y un resultado de Strout positivo. La población de parásitos fue caracterizada como Grupo Sat I por PCR-Lg.

El caso Tx2 (sexo femenino, edad 61 años, nacida en La Pampa, Argentina) no presentó resultados de QPCR-SG positivos para *T. cruzi* previo al trasplante de corazón, pero la parasitemia se positivizó a los 7 días post-transplante (2,66 p/ml). La reactivación clínica fue diagnosticada a los 92 días post-transplante, con resultados de Strout positivos. Al suministrar tratamiento etiológico la carga parasitaria disminuyó, alcanzando niveles no detectables en el día 21 post-tratamiento (Tabla 2.3). La población de *T. cruzi* fue identificada como Grupo Sat II por PCR-Lg.

El caso Tx3 (sexo masculino, edad 42 años, nacido en La Pampa, Argentina) presentó una carga parasitaria de 0,02 p/ml 30 días antes del transplante, mostrando un aumento de un orden (0,2 p/ml) 7 días después del transplante. La carga parasitaria siguió aumentando hasta que la reactivación clínica se le diagnosticó 38 días después del transplante en base a resultados de Strout positivos. En consecuencia, el paciente fue tratado con benznidazol y la carga parasitaria disminuyó rápidamente. Los resultados de QPCR-SG para *T. cruzi* fueron negativos a partir de los 14 días post-tratamineto y continuaron negativos por 53 días. Sin embargo, 70 días después de iniciado el tratamiento, el seguimiento por QPCR-SG reveló cargas detectables (0,01 p/ml) (Fig. 3.6). La población de *T. cruzi* fue identificada como UTD VI por PCR-SL I y II, PCR-24Sα-HN y PCR Pr1-Pr3, y se trataría de una cepa monoclonal ya que su perfil de loci para microsatélites fue idéntico en muestras de tejido de su corazón explantado (muestra Tx5.Exp-Car Tabla 1.12), sangre periférica durante el primer evento de reactivación (muestra Tx5.Sang-Per Tabla 1.12) y biopsia endomiocárdica tomada en el segundo evento de reactivación (muestra Tx5. Biop-Mioc Tabla 1.12).

3. 2 Estudios en Modelo Experimental

Las determinaciones de la carga parasitaria en muestras de tejido murino se desarrollaron en el marco de dos colaboraciones. La primera de ellas, con la Dra. Paola Zago y el Dr. Miguel Ángel Basombrio del Laboratorio de Patología Experimental de la Universidad Nacional de Salta, donde se analizó el rol del gen *LYT1* en la infectividad de *T. cruzi*. La segunda colaboración se realizó con la Dra. Catalina Alba y la Dra. Stella Maris González Cappa del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA, donde se comparó la dinámica de infección producida por cepas de distinta UTD.

3.2.1 Análisis de la infectividad de la cepa L16 de *T. cruzi*, una mutante nula para el gen LYT1.

Se analizaron muestras de musculo esquelético y cardíaco de ratones infectados con la cepa L16, clon mutante nulo para el gen *LYT1* de Cl-Brener, así como para la

cepa salvaje (WT). Se cuantificó la carga parasitaria en la etapa aguda (28 días post-infección) y en la etapa crónica de la infección (7 meses post-infección) (Fig. 3.7, 3.8, 3.9, 3.10).

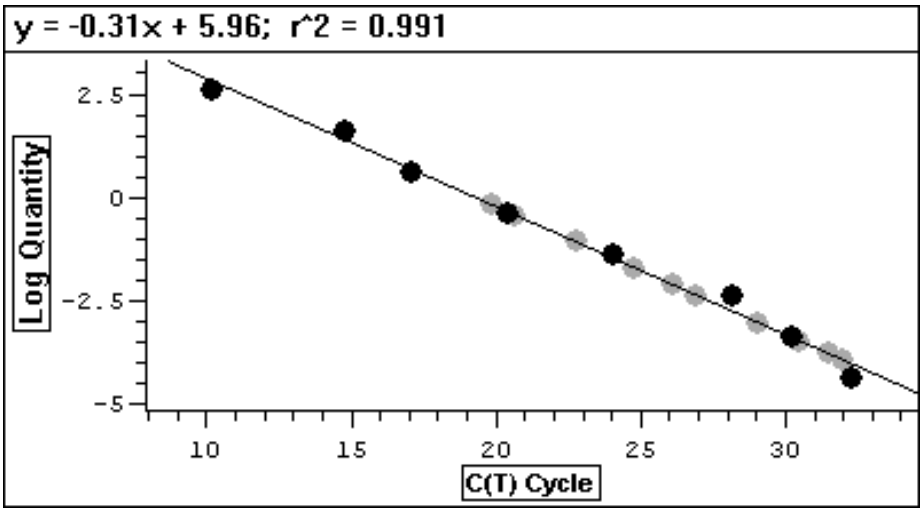

Fig. 3.7. Ensayo representativo de la cuantificación de la carga parasitaria en muestras en tejido cardíaco durante la etapa aguda de la infección. Puntos negros representan las muestras de la curva estándar (diluciones 1:10 de 400 – $4e^{-005}$ parásitos/tubo de reacción) y los puntos grises representan las muestras de tejido cardíaco.

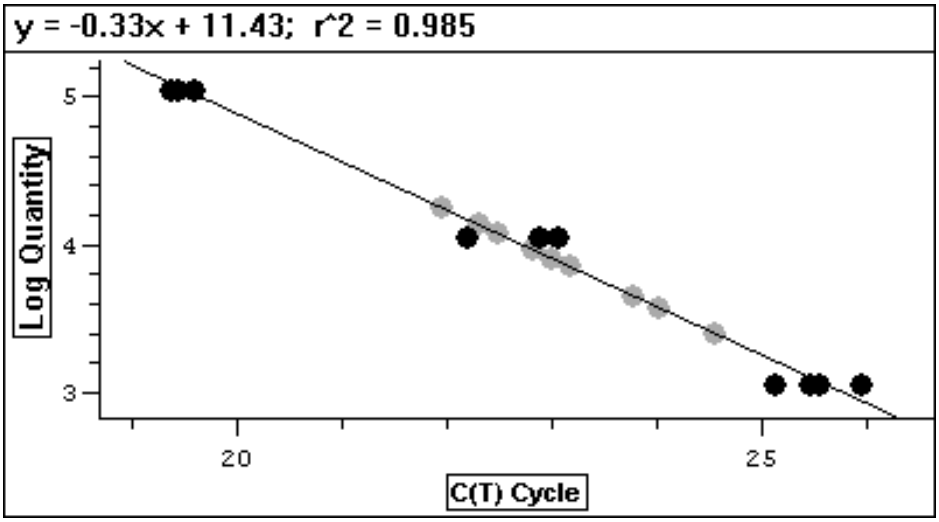

Fig. 3.8. Ensayo representativo de la cuantificación del número de células murinas extraídas de muestras de tejido cardíaco. Los puntos negros representan la curva estándar (110000, 11000 y 1100 células murinas NSF-60/ tubo de reacción), los puntos grises representan las muestras de tejido cardíaco.

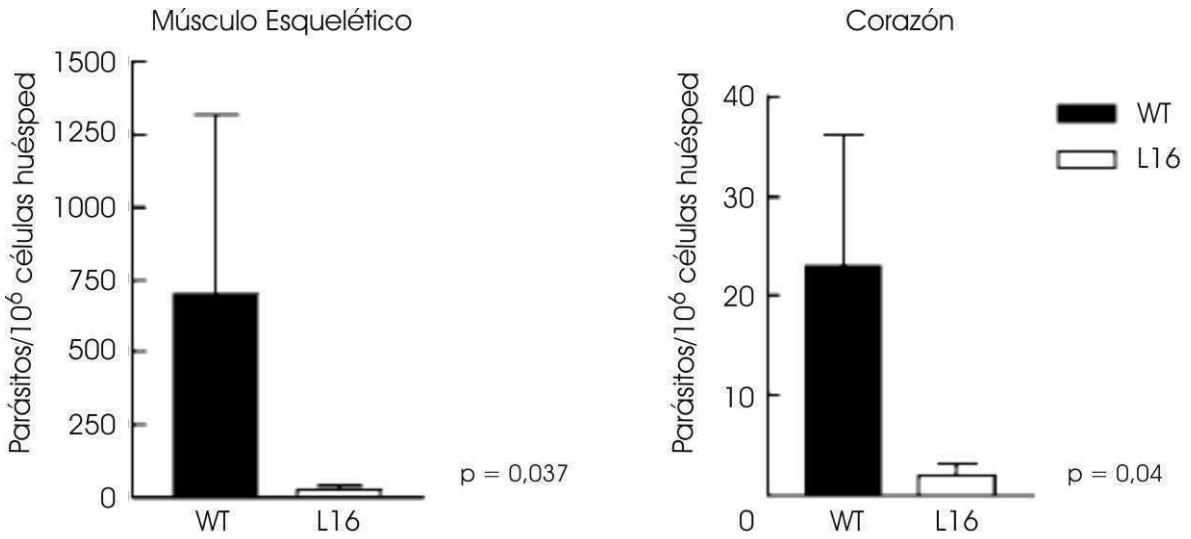

Fig. 3.9. Carga parasitaria en músculo cardíaco y esquelético del clon mutante atenuado L16 y el WT durante la etapa aguda de la infección. Ratones adultos Swiss (2 meses de edad) fueron inoculados con 10^3 parásitos resistentes a complemento de la cepa CL Brener (WT) o con el clon L16. Las cargas parasitarias en los músculos esquelético y cardíaco fueron cuantificadas a los 28 días post-infección. Los datos se expresan como el número de parásitos por cada 10^6 células de ratón. Los valores se expresan como la media y las barras de error indican errores estándar de la media.

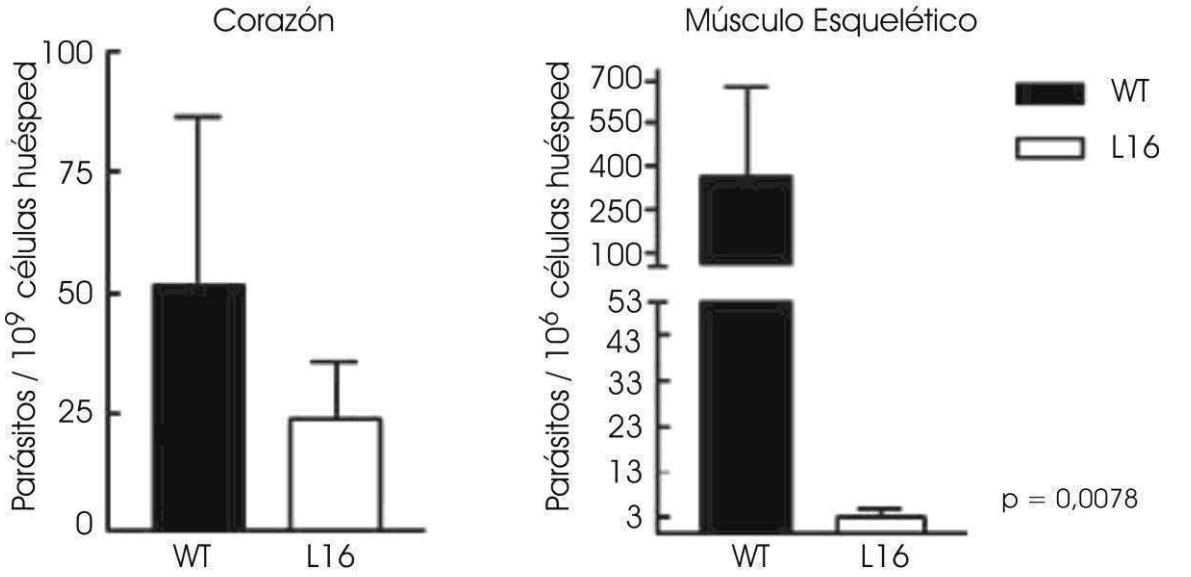

Fig. 3.10. Carga parasitaria en músculo cardíaco y esquelético de la cepa mutante atenuada L16 y la WT durante la etapa crónica de la infección. Ratones adultos Swiss (2 meses de edad) fueron inoculados con 10^3 parásitos resistentes a complemento de la cepa CL Brener WT o con el clon L16. Las cargas parasitarias en los músculos esquelético y cardíaco fueron cuantificadas a los 7 meses post-infección. Los datos se expresan como el número de parásitos por cada 10^9 o 10^6 células de ratón. Los valores se expresan como la media y las barras de error indican errores estándar de la media.

A diferencia de lo utilizado para muestras de sangre periférica, en este caso no se utilizó un control interno heterólogo (CI) para normalizar los resultados entre distintas muestras (QPCR-SG-CI), si no que se amplificó el gen murino de copia única que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), reacción a la que denominamos QPCR-SG-TNFα. Los resultados se expresaron como número de parásitos por cada 10^9 o 10^6 células murinas. La amplificación del gen murino también sirve para confirmar la ausencia de inhibidores de la QPCR-SG en las muestras extraídas.

3.2.2 Estudios de histotropismo y virulencia de cepas de *T. cruzi* de distinta UTD

Con el objetivo de analizar las dinámicas de infección producidas por distintas poblaciones parasitarias, se analizaron muestras de ganglio linfático satélite y bazo, de ratones infectados con la cepa RA (Tc VI) o la cepa K98 (Tc I), a 2, 15, 28 y 90 dias post-infección (dpi) (Fig. 3.11).

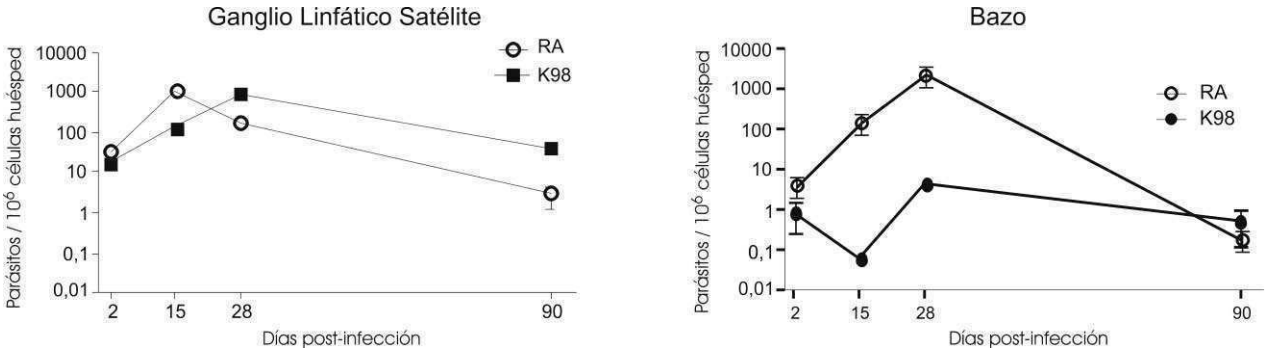

Fig. 3.11. Dinámica de la infección en muestras de ganglio linfático satélite y bazo, de ratones infectados con la cepa RA (Tc VI) o la cepa K98 (Tc I), a 2, 15, 28 y 90 días post -infección (dpi).

Para la cuantificación de *T. cruzi*, se utilizó una curva estándar construida con la cepa Cl-Brener (Tc VI) y se incluyó la corrección por el factor de linaje (FdL) al analizar las muestras infectadas con K98 (Tc I), ya que los parásitos de UTD TcI contienen aproximadamente 10 veces menos copias de repeticiones satélites. Para corroborar la validez de dicha corrección se compararon resultados obtenidos al utilizar una curva construida con parásitos Silvio X-10 (Tc I) y otra con parásitos Cl-Brener (Tc VI)

aplicando el factor de corrección de linaje y no se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

Al igual que para el análisis de las muestras de músculo esquelético y cardíaco anteriormente descripto, se utilizó la reacción QPCR-SG-TNFα para cuantificar las células huésped y normalizar los resultados de carga parasitaria.

3.3 Estudios Eco-epidemiológicos

3.3.1 Distinción entre *T. cruzi* y otros tripanosomátidos presentes en heces de triatominos silvestres.

Como parte de un amplio proyecto eco-epidemiológico realizado en una zona rural del noroeste de Argentina (Marcet y col., 2006), se estudió la distribución de la infección por *T. cruzi* en distintas especies de triatominos silvestres. En consecuencia, 124 especimenes de *T. guasayana* y 317 de *T. garciabesi* fueron capturados en zona domiciliares y peridomiciliares, y en sitios silvestres en octubre de 2002 por el grupo de eco-epidemiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, dirigido por el Dr. Ricardo Gürtler. Para el análisis de la infección por *T. cruzi*, gotas de diluciones fecales obtenidas por compresión abdominal, fueron examinadas detenidamente en busca de tripanosomas activos con un microscopio en × 220-400. Flagelados indistinguibles de *T. cruzi* fueron observados al microscopio en dos especímenes de *T. guasayana* y en dos *T. garciabesi*.

Para confirmar la infección por *T. cruzi*, con la ampolla rectal de cada insecto positivo por MO, la Dra. Marta Lauricella del Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén, Buenos Aires, Argentina, preparó homogeneizados para: (1) cultivo bi-fásico, (2) inoculación intraperitoneal en ratones lactantes Balb-C. Un ratón de cada grupo fue estudiado por xenodiagnóstico y se tomó una muestra de sangre. Una parte de la muestra de sangre se colectó y otra fue re-inoculada en ratones. El resto de los ratones de cada grupo fueron analizados por hemocultivo y el análisis histopatológico.

Todos los intentos de cultivo y aislamiento de *T. cruzi*, así como la detección de evidencia histológica de infección chagásica fueron negativas.

Las heces de los especímenes de *T. guasayana* y *T. garciabesi* positivas por MO fueron procesadas para su análisis molecular por PCR-ADNk, PCR-Sat, y PCR-SL I y II , todas con resultados negativos.

Estos resultados sugirieron que otras especies de tripanosomátidos podrían ser responsables de los resultados MO-positivos en las muestras fecales analizadas. En consecuencia, realizamos la PCR-24Sα, usando como controles ADN de *T. cruzi* UTD I y II, así como *T. rangeli*. Obtuvimos amplicones de 250 pb a partir de las muestras de heces de un ejemplar de *T. guasayana* y de uno de *T. garciabesi*, así como de su cultivo correspondiente. De las otras dos muestras de heces MO positivas, no se obtuvieron amplicones, pero se detectaron inhibidores de la PCR por lo que esos resultados no fueron válidos.

El tamaño de los amplicones obtenidos no correspondían a ningún otro fragmento conocido de ADNr 24Sα de tripanosomátidos (Tabla 1.1). Por lo tanto, para identificar a la población de tripanosomátidos presente en las heces, secuenciamos dichos amplicones (números de acceso: AY820895.1, AY820896.1, AY820897.1). Ambas muestras revelaron tener una identidad del 100% entre sí, pero no mostraron alta homología con ninguna secuencia conocida. La secuencia de este amplicón de 250pb se utilizó para la construcción de un dendograma junto con secuencias de la región homóloga de los tripanosomátidos americanos *L. major, L. amazonensis, T. grosi, T. otospermophili, T.kuseli, C. fasciculata* y *T. cruzi*, obtenidas de Genbank. Este dendograma se comparó con otro realizado con secuencias del gen de ADNr 18S presentes en Genebank, con los mismos taxa que para el gen ADNr 24Sα e incluyendo además a *B. triatomae*. Ambos dendogramas resultaron concordantes, colocando a la muestra CD-13-3 en la misma posición filogenética que a *B. triatomae* (Fig. 3.12).

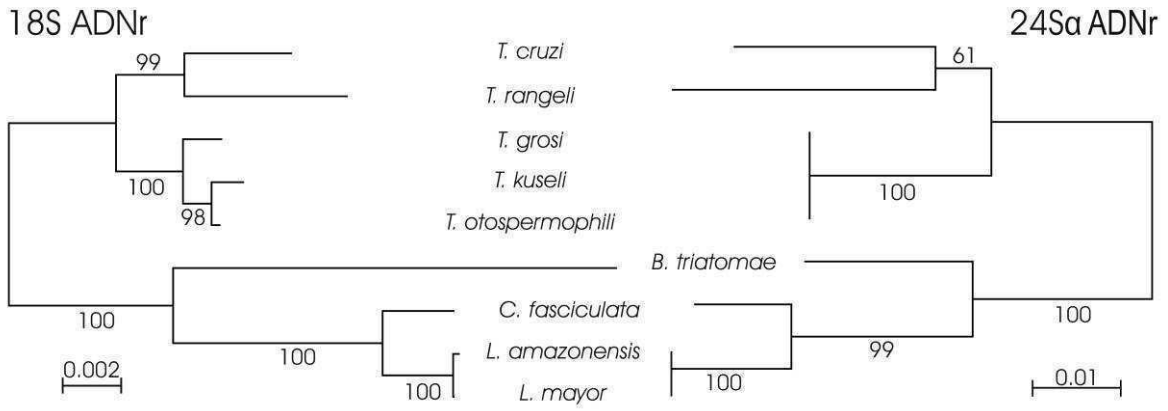

Fig. 3.12. Dendogramas construidos por el método de Neighbour-Joining, utilizando fragmentos de las secuencias del gen ribosomal 18S en el dendograma de la izquierda y fragmentos de las secuencias del gen ribosomal 24sα en el dendograma de la derecha, provenientes de tripanosomátidos americanos. Los valores numéricos en los nodos indican el valor de bootstrap con 100 réplicas. La tasa de sustituciones por sitio está indicada debajo de cada dendograma.

Este sistema de PCR también ayudó a resolver situaciones de contaminación de cultivos de *T. cruzi* en medio LIT en el laboratorio, permitiendo detectar contaminaciones con *Crithidia sp.*, a partir de obtener fragmentos de ADNr 24sα de 225 pb (datos no mostrados) y observaciones morfológicas.

3.3.2 Determinación de las UTD de *T. cruzi* presentes en heces de triatominos de región endémica del noroeste Argentino

En un estudio eco-epidemiológico desarrollado en colaboración con el grupo de eco-epidemiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, dirigido por el Dr. Ricardo Gürtler., se colectaron 2238 triatominos de hábitats doméstico, peri-doméstico y selvático. Las UTD parasitarias se identificaron a partir de muestras de heces y / o cultivo de cepas obtenidas de heces, en un total de 28 muestras positivas por PCR-ADNk.

Utilizando la PCR-SL I y II, se determinó que poblaciones parasitarias pertenecientes a Tc II/V/VI son predominantes, ya que Tc I se detectó en sólo el 2 vinchucas adultas (7,1%) procedentes de dos localidades distintas (Tabla 3.3). La presencia de las UTD Tc III y IV se descartó usando el ensayo PCR-SLac también dirigido a la región

espaciadora del mini-exón, el cual produce un amplicón de 200pb para las UTD Tc III y IV, en lugar de 150 y 157pb para Tc II/V/VI y Tc I respectivamente.

En 8 muestras, se identificaron las UTD de las poblaciones parasitarias tanto a partir de muestras fecales como de cultivo. La concordancia entre ambos tipos de muestras analizadas fue del 87,5%, ya que en una muestra el cultivo albergaba sólo parásitos Tc II/V/VI, mientras que la muestra fecal reveló una infección mixta compuesta por parásitos Tc I + Tc II/V/VI. En 4 muestras, sólo se tipificaron las heces y todos fueron Tc II/V/VI, mientras que en 16 muestras se pudo caracterizar sólo los cultivos, de los cuales 14 fueron Tc II/V/VI y 2 resultaron Tc I (Tabla 3.3).

Muestra	N	UTD				
		I	III o IV	VI o II+VI	V	I+II
Heces	12	0	0	11	0	1
Cultivo	24	2	0	21	1	0

Tabla 3.3. UTD identificadas en heces y/o cultivos de heces de 28 triatominos silvestres colectados en una zona rural del noroeste de Argentina.

La tipificación realizada mediante PCR-24Sα permite distinguir a la UTD Tc V de las Tc II/VI. Con este ensayo se puedo identificar una población Tc V en un cultivo aislado a partir de una muestra fecal de *T. infestans* domiciliaria, pero lamentablemente no se pudieron analizar las heces directamente por falta de material. Las muestras restantes resultaron pertenecer al grupo Tc II/VI, ya que solo se obtuvo el amplicón de 140 pb en la reacción PCR-24Sα-HN. Para distinguir entre las poblaciones Tc II y Tc VI, se realizaron los ensayos PCR-18S y PCR-A10. Sorprendentemente, en el 85.7% de los casos, ambas PCRs resultaron positivas. Sin embargo, se ha descrito que una proporción de las cepas Tc VI puede dar a lugar al amplicón de 165 pb en el ensayo de PCR-18S (Brisse y col., 2001). De hecho, Tulahuen II y CL-Brener, dos cepas de referencia Tc VI, amplifican ambos marcadores, mientras que Tep7 amplifica solo el fragmento A-10. En este contexto, no se puede dilucidar si las muestras estaban infectadas con poblaciones parasitarias Tc VI que amplifican un fragmento de 165 pb en la PCR-18s, o con infecciones mixtas Tc II/VI. Las muestras que no amplificaron el fragmento A-10, también fueron negativas en la primera ronda de PCR-24Sα-HN indicando la presencia de un bajo número de parásitos o inhibición parcial de la PCR,

por lo que se consideró estos resultados como no informativos. Vale la pena recordar que en este estudio se realizó el ensayo original propuesto por Brisse y colaboradores para el fragmento A10 (PCR-A10) que solo resulta positivo para poblaciones Tc II y tiene baja sensibilidad (25 equivalente genómicos por tubo de reacción) (Marcet y col., 2006).

3.3.3 Determinación de las UTD de *T. cruzi* presentes en heces de triatominos silvestres y en cultivos de reservorios silvestres del sur de Estados Unidos de América.

En el marco de una colaboración con las Dra. Paula Marcet y Dra. Ellen Dotson del Division of Parasitic Diseases, Entomology Branch, CDC, Atlanta, Estados Unidos, analizamos por PCR- MTq 4 muestras de cultivo y 35 muestras de heces de triatominos silvestres, las cuales habían sido positivas por PCR-ADNk. Todas las muestras fueron colectadas en el sur de Estados Unidos. De las 35 muestras de triatominos, 27 pudieron ser tipificadas, siendo 15 Tc I, 8 Tc IV y 4 infecciones mixtas Tc I/IV. De las 27 que pudieron ser tipificadas con el ensayo PCR- MTq, se tomaron 13 y se tipificaron usando los ensayos tradicionales de SL-PCR I y II y PCR-24Sα-HN. Las 3 infecciones mixtas detectadas por el ensayo de PCR en tiempo real fueron verificadas con las PCR tradicionales, pero al utilizar estos últimos se detectaron 2 infecciones mixtas que habían sido tipificadas como infecciones simples de Tc I por PCR- MTq. En las muestras restantes con infecciones simples, los resultados de tipificación fueron 100% concordantes (Tabla 3.4).

Los 3 cultivos obtenidos a partir de sangre periférica de comadreja fueron tipificados como Tc I, mientras el proveniente de sangre periférica de Mapache resultó Tc IV (Tabla 3.4).

Muestra	Hospedador	Origen	Ensayo	
			PCR Tiempo Real	ME-PCR y 24s ADNr
SN3	cultivo	Colombia	Tc I	Tc I
Triatoma	cultivo	USA	Tc I	Tc I
M5631	cultivo	Brasil	Tc III	Tc III
Griffin	cultivo	USA	Tc IV	Tc IV
CL-Brener	cultivo	Brasil	Tc II/V/VI	Tc II/VI
FLO15	Comadreja	USA-FL	Tc I	Tc I
FLO2	Comadreja	USA-FL	Tc I	Tc I
BG08011	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I+ IV	Tc I+ IV
Tx001	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	Tc I
Tx008	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	Tc I
TX028	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	Tc I+ IV
TX038	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I+ IV	Tc I+ IV
TX053	*Triatoma protacta*	USA-Tx	Tc I	Tc I
TX057	*Triatoma protacta*	USA-Tx	Tc I	Tc I
Tx062	*Triatoma protacta*	USA-Tx	Tc I	Tc I
TX104	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	Tc I
TX108	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	Tc I
TX111	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	Tc I+ IV
TX112	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	Tc I
TX115	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I+ IV	Tc I+ IV
TX313	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	NA
TX314	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	NA
TX315	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	NA
TX316	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I+ IV	NA
TX317	*Triatoma indictiva*	USA-Tx	Tc IV	NA
TX318	*Triatoma sanguisuga*	USA-Tx	Tc IV	NA
Tx319	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	NA
Tx320	*Triatoma sanguisuga*	USA-Tx	Tc IV	NA
TX321	*Triatoma indictiva*	USA-Tx	Tc IV	NA
Tx322	*Triatoma sanguisuga*	USA-Tx	Tc IV	NA
TX324	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc IV	NA
TX327	*Triatoma indictiva*	USA-Tx	Tc IV	NA
RAC38	Mapache	USA-FL	Tc IV	NA
BG09012	*Triatoma lecticularia*	USA-KY	Tc IV	NA
BG09013	*Triatoma gerstaeckeri*	USA-Tx	Tc I	NA

Tabla 3.4. Genotipificación de las poblaciones de *T. cruzi* presentes en heces de triatominos y cultivos a partir de sangre de mamíferos infectados, por PCR- MTq y por los ensayos tradicionales de SL-PCR I y II y PCR-24Sα-HN.

DISCUSIÓN

1. Métodos de tipificación de *T. cruzi*

1.1. Tipificación en estudios eco-epidemiológicos

1.1.1 PCRs convencionales

Tradicionalmente la genotipificación de poblaciones de *T. cruzi* en sus respectivas UTD ha exigido el aislamiento de los parásitos y su expansión en cultivo, en algunos casos a expensas de la selección de ciertas cepas (de Luca D'oro G y col., 1993; Montamat y col., 1987; Montamat y col., 1991; Diosque y col., 2003). En nuestros estudios, el análisis de una de las muestras fecales de *T. infestans* puso en evidencia una infección mixta por Tc I y Tc VI, pero luego mostró sólo Tc VI en el cultivo correspondiente (Tabla 3.3). Este ejemplo pone de manifiesto la selección poblacional producida durante la expansión por cultivo, y por lo tanto las ventajas de la identificación de las UTD parasitarias directamente a partir de muestras biológicas.

Otro grupo había propuesto dos marcadores moleculares para diferenciar las poblaciones parasitarias Tc II de las Tc VI: informaron que la reacción PCR-18S produce un amplicón en las poblaciones Tc II y no en las Tc VI, mientras que la reacción PCR-A10 produce un amplicón en las Tc VI y no en las Tc II (Brisse y col., 2001). Sin embargo, nuestro estudio mostró que 85,7% de las muestras analizadas estaban infectadas con poblaciones que amplifican ambas secuencias. Es preciso recalcar que el ensayo PCR-A10 cuenta con una sensibilidad menor al resto de los sistemas de genotipificación que utilizan secuencias con un mayor número de repeticiones en el genoma. De hecho, todas las muestras que resultaron negativas para la PCR-A10, también resultaron negativas para la PCR-24Sα, indicando una baja carga parasitaria en esa muestra, invalidando el resultado negativo de la PCR-A10. En este contexto, los resultados obtenidos a partir de las heces que amplificaron ambos marcadores podrían ser interpretados como infecciones mixtas Tc II/VI o como poblaciones o cepas Tc VI que llevan tanto secuencias amplificables por PCR-A10 como por PCR-18S. Esta segunda hipótesis surge a partir de que las cepas de referencia Tulahuen y CL Brener II

(ambas Tc VI) amplifican ambos marcadores genómicos, al igual que cultivos aislados de reservorios mamíferos domésticos de la misma zona endémica, así como también cepas de la región del Chaco Paraguayo (Yeo y col., 2005).

En este sentido, parecería que en nuestra área de estudio las cepas Tc VI que amplifican el fragmento de 165 pb de la secuencia 18S ADNr prevalecen, a diferencia de las cepas Tc VI de otras regiones endémicas (Brisse y col., 2001). Sin embargo, como ninguno de estos aislamientos ha sido clonado, no puede descartarse que se trate de poblaciones mixtas Tc II + Tc VI. Por lo tanto, la mejora de las estrategias basadas en la PCR y el desarrollo de nuevos marcadores siguen siendo necesarios para la discriminación precisa entre estos UTD.

La mayoría de los vectores domésticos de la zona rural de estudio parecería estar infectada por cepas Tc VI, que también amplifican el fragmento de ADNr 18S (85,7%), mientras que la mayoría de las muestras de sangre tomadas de pacientes con enfermedad de Chagas crónica de diferentes regiones endémicas de la Argentina parece estar infectada con cepas Tc V (Burgos y col., 2007; Corrales y col., 2005). Una posible explicación para esta discordancia sería que los ejemplares de *T. infestans* colectados en este estudio tenían más probabilidades de infectarse con cepas de parásitos de los reservorios animales domésticos, donde si se ha demostrado una preponderancia de infecciones producidas por cepas Tc VI (Cardinal y col., 2008), que de personas con enfermedad de Chagas. La caracterización futura de las UTD que infectan a los pacientes y a los animales de las casas donde los insectos fueron recolectados podría aclarar esta cuestión.

En este trabajo hemos aplicado procedimientos de laboratorio para la detección e identificación molecular de las UTD de *T. cruzi* directamente de las heces colectadas de triatominos. Sin embargo, algunas de las principales limitaciones han sido la incapacidad de contar con marcadores moleculares sensibles para distinguir adecuadamente entre poblaciones Tc II y Tc VI provenientes de zonas endémicas de nuestro país, así como la alta cantidad de reacciones de PCR necesarias para la tipificación de las muestras.

1.1.2. Tipificación por PCR Inter-RE

La utilización de distintas combinaciones de oligonucleótidos complementarios a elementos repetitivos de *T. cruzi* permite el diseño de estrategias de tipificación con distintos niveles de resolución. Esto potencialmente le permite al investigador diseñar ensayos de tipificación a medida, para responder preguntas específicas. En este sentido, nosotros hemos desarrollado técnicas de tipificación para analizar la variabilidad genética dentro de la UTD Tc I (PCR Inter-RE), así como para discriminar entre distintas UTD (PCR-Inter-SIRE-1 y PCR-Inter-SIRE-2).

Al analizar la variabilidad dentro de Tc I por PCR-Inter-RE, observamos una asociación entre el origen geográfico y la ubicación en el dendograma de las cepas de *T. cruzi* analizadas (Fig. 1.11). Por ejemplo, las tres cepas colectadas en la localidad de El Palmar, Chaco, Argentina (Pal-V1 cl1, Pal-V2-2 cl5, Pal-V2-1cl4) se encuentran agrupadas, al igual que las tres cepas colectadas en Colombia (SN3, HA y Gal 61-6). Por otro lado, las cepas Pav00 cl7 y Tev91 cl5, colectadas en las localidades de Pampa Ávila y Tres Estacas provincia del Chaco, Argentina, respectivamente, se encuentran agrupadas, pero separadas de las provenientes de la localidad de El Palmar. Las localidades de Pampa Ávila y Tres Estacas se encuentran a 5 km de distancia, mientras que El Palmar se encuentra a aproximadamente 30km de ambas. Estos resultados estarían indicando la presencia de dos poblaciones distintas de Tc I circulando en cada región, demostrando el potencial de la técnica para generar asociaciones eco-epidemiológicas relevantes. Sin embargo, las cepas provenientes de Brasil no se agruparon juntas. Esto podría deberse en alguno de los casos a que fueron colectadas en regiones geográficas distantes, pero no contamos con esa información. Por otro lado, en el caso de la cepa G y el clon D11, derivado de ella (María Isabel Cano, Escola Paulista de Medicina, San Pablo, Brasil, comunicación personal), las diferencias en los perfiles podrían estar indicando el aporte en la cepa G del polimorfismo de secuencias inter-RE de los distintos clones que la componen. Por otro lado, es necesario considerar que en este tipo de ensayos, la integridad del ADN genómico es fundamental y afecta principalmente la producción de amplicones de alto PM, por lo tanto no es posible descartar este factor para explicar estas diferencias.

La estrategia de tipificación por PCR-Inter-SIRE-2 fue puesta a punto para la discriminación entre UTD específicas. La discriminación entre las UTD Tc II y Tc VI ha sido particularmente problemática, y con excepción del ensayo PCR Pr1-Pr3 descripto en esta tesis, no se cuenta con un marcador molecular en particular que permita su tipificación precisa. Sin embargo, utilizando una estrategia de tipificación basada en la estructura genómica general y no en una secuencia en particular, hemos diseñado una estrategia capaz de diferenciar a ambas UTD (Fig. 1.6).

A pesar de haber utilizado estas estrategias solo con cepas de cultivo, dado que se amplifican secuencias específicas de *T. cruzi,* a diferencia de lo que ocurre mediante técnicas como los RAPDs, este ensayo podría adaptarse para tipificar poblaciones parasitarias en muestras biológicas, donde suele haber competencia con el ADN del organismo hospedero.

1.1.3. Identificación molecular de tripanosomátidos

Estudios previos donde se han analizado heces de *T. guasayana* por MO han informado la presencia de "tripanosoma similares a *T. cruzi*" (Wisnivesky-Colli y col., 1993), "flagelados" (Noireau y col., 1999) y "*T. cruzi* según lo determinado por morfología" (Gajate y col., 1996; Cecere y col., 1999). La aplicación de una técnica altamente específica como la PCR confirmó la frecuente presencia de *T. cruzi* en heces de *T. guasayana* en el Chaco boliviano (Noireau y col., 1999), pero no en el paraguayo (Yeo y col., 2005), ni en el Chaco argentino (Marcet y col., 2006). Nosotros hemos corroborado la ausencia de *T. cruzi* en las heces de ejemplares de *T. guasayana* y *T. garciabesi*, que habían sido calificadas como positivas por MO, con resultados negativos de PCR dirigidas al cinetoplasto y a la secuencia nuclear repetitiva satélite. Sin embargo, la amplificación positiva y secuenciación de un fragmento del gen codificante para el ARNr 24Sα, reveló una infección por *B. triatomae*. Esto sugiere que se debe tener precaución cuando se realiza el diagnóstico de infección por *T. cruzi* únicamente mediante observación microscópica de preparaciones frescas, sin teñir, de heces de triatominos. Los "falsos positivos" pueden conducir a la incriminación errónea de una especie como vector y/o distorsionar las relaciones existentes entre los ciclos silvestres

y domésticos de la enfermedad de Chagas. De hecho, ambas muestras de heces de triatominos infectados con *B. triatomae* fueron colectadas en localidades donde se detectó *T. cruzi* en muestras de ejemplares de *T. infestans* peridomésticos y domésticos (Marcet y col., 2006).

Hasta donde sabemos, este es el primer informe basado en PCR mostrando la identificación diferencial de *B. triatomae* y las infecciones por *T. cruzi* en heces de triatominos capturados en el campo. Esta estrategia también puede proporcionar una herramienta rápida y sensible para la vigilancia de triatominos criados en el laboratorio utilizados para el xenodiagnóstico, así como para la identificación diferencial de las infecciones por *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores de la enfermedad de Chagas donde se superpongan las zonas endémicas de ambos tripanosomátidos (Chiurillo y col., 2003).

1.1.4 PCR- MTq

En el marco de este estudio desarrollamos, validamos y aplicamos la estrategia de tipificación por PCR en tiempo real con sondas Taqman (PCR- MTq) que permite distinguir entre 4 grupos de *T. cruzi*: Tc I, Tc III, Tc VI y Tc II/V/VI, de manera altamente específica en una sola reacción de PCR.

Las estrategias de tipificación previamente descriptas presentan las siguientes limitaciones: 1) han exigido el aislamiento de los parásitos y su expansión en cultivo, en algunos casos a expensas de la selección de ciertas cepas como ya ha sido demostrado en esta tesis y en otros trabajos (de Luca D'oro G y col., 1993; Diosque y col., 2003; Montamat y col., 1987; Montamat y col., 1991), 2) requieren de varias reacciones de PCR convencional o pasos de hibridización post-PCR haciendo a estos métodos lentos, más susceptibles a la contaminación y con resultados más difíciles de interpretar (Burgos y col., 2007; Marcet y col., 2006; Roellig y col., 2008; Virreira y col., 2006).

La técnica fue validada con 27 cepas tipificadas por los métodos tradicionales y se obtuvo un 100% de concordancia, demostrando su alta especificidad (Tabla 3.4). También fue aplicada a muestras biológicas, donde se pudo tipificar 27 muestras de heces de triatominos silvestres positivas por PCR-ADNk colectadas en el sur de

Estados Unidos. También se incluyó en el análisis a 4 muestras de cultivos obtenidos a partir de sangre periférica de reservorios silvestres. En concordancia con resultados obtenidos por otros grupos, solo se detectaron poblaciones parasitarias de las UTD Tc I y Tc IV. En particular, se ha descripto que las poblaciones Tc I se encuentran asociadas con ciclo silvestre arbóreo, mientras que las poblaciones Tc IV se encuentran asociadas al ciclo silvestre terrestre (Roellig y col., 2008). En este sentido, los 3 cultivos provenientes de sangre periférica de comadrejas fueron tipificados con Tc I, mientras el cultivo proveniente de Mapache se tipificó como Tc IV.

De las 27 muestras de heces de triatominos silvestres infectados con *T. cruzi*, se tomaron 13 para ser tipificadas utilizando PCRs convencionales dirigidas al mini-exon y 24Sα ADNr (PCR-SL I, PCR-SL II, PCR-24Sα y PCR-24Sα-HN), donde cada región polimórfica es amplificada de manera individual, a diferencia de la modalidad multiplex aplicada en la reacción de PCR en tiempo real. Con la técnica PCR- MTq se detectaron 3 infecciones mixtas Tc I + Tc IV, mientras que al realizar las PCRs convencionales individualmente se detectaron 2 infecciones mixtas adicionales. Dado que la técnica PCR- MTq amplifica las secuencias polimórficas en modalidad multiplex, las secuencias representadas en menor cantidad pueden resultar no amplificadas debido a la competencia exponencial que existe por los reactivos dentro del tubo de reacción. Sin embargo, la tipificación se lleva a cabo realizando una sola reacción de PCR, en comparación con un total de 4 reacciones (PCR-SL I, PCR-SL II, PCR-24Sα y PCR-24Sα-HN) realizadas con el algoritmo de tipificación tradicional con PCRs convencionales, lo que representa una disminución en el tiempo y en el costo de tipificar cada muestra. Otra ventaja de la tipificación por PCR- MTq es la especificidad, ya que cualquier amplificación inespecífica difícilmente sea reconocida por la sonda y por lo tanto no se emitirá señal de fluorescencia. Además, como ya se mencionó anteriormente, existe un menor riesgo de contaminación ya que no es necesario abrir los tubos de reacción después de la reacción de PCR para la visualización de los resultados. Finalmente, al tratarse de una metodología en tiempo real, esta técnica podría ser optimizada para la cuantificación diferencial de las distintas poblaciones que

detecta, lo que puede significar un aporte a estudios de histotropismo diferencial y de susceptibilidad de UTDs a nuevas drogas en modelos experimentales.

1.2. Tipificación de muestras clínicas

1.2.1 Microsatélites

Con el objetivo de poder establecer una clara correlación entre los aspectos genéticos del parásito y clínicos de la enfermedad es necesario desarrollar y aplicar técnicas que permitan identificar directamente a las poblaciones de *T. cruzi* presentes en muestras biológicas. Sin embargo, los métodos hasta ahora descritos, o bien no eran lo suficientemente sensibles para analizar las poblaciones parasitarias directamente a partir de los tejidos infectados, no tenían suficiente resolución como para discriminar poblaciones parasitarias individuales, o generaban patrones muy complejos de difícil interpretación. En este sentido, el análisis del perfil genético de polimorfismos de microsatélites, debido a la estructura genómica diploide de *T. cruzi,* tiene la ventaja de permitir inferir la complejidad clonal de las poblaciones parasitarias presentes en las muestras biológicas. Sobre la base de una estrategia de PCR anidada diseñada para amplificar loci de microsatélites, hemos sido capaces de detectar y evaluar la diversidad genética de *T. cruzi* directamente en 28 muestras biológicas y cultivos provenientes de pacientes argentinos que presentaban distintas formas de la patología chagásica (Tabla 1.12).

El análisis de muestras provenientes de dos mellizas que nacieron infectadas con Chagas connatal y de su madre seropositiva resultó particularmente interesante, donde los mismos alelos detectados en la sangre materna, se observaron en sangre periférica de ambas mellizas. En particular, se observaron tres picos alélicos para los loci TcTAC15 y TcAAAT6 (Fig. 3.1. 99, 132 y 135 pb, y 259, 271 y 279 pb, respectivamente). Estos datos sugieren que ambas mellizas fueron infectadas por la misma población policlonal de la madre y no solo por una fracción de la misma. También cabe mencionar que solo detectó la presencia de parásitos pertenecientes a la UTD TcV, sugiriendo la presencia de varios clones pertenecientes a un mismo linaje.

En un análisis complementario, se inocularon muestras de sangre periférica de las dos mellizas y su madre en ratones para su propagación. Luego, las muestras de sangre periférica de los ratones inoculados fueron analizadas utilizando los mismos marcadores. En uno de ellos se observó la ausencia de uno de los alelos de la población original, indicando la selección clonal durante la propagación en el modelo murino. Al igual a lo observado con la propagación en cultivo de poblaciones parasitarias presentes en heces de triatominos, donde se detectaron poblaciones de linajes TcI y TcVI en las heces, pero solo TcVI en el cultivo correspondiente, estos resultados resaltan la importancia de contar con técnicas los suficientemente sensibles como para tipificar a las poblaciones parasitarias directamente a partir de muestras biológicas.

En el marco de esta tesis, también analizamos los perfiles de microsatélites en dos pacientes co-infectados con V.I.H.. El caso 1 presentó un chagoma cerebral como consecuencia de una reactivación parasitológica por inmunosupresión (Burgos y col., 2005). Se tipificaron las poblaciones parasitarias de ambos tejidos observándose una población de UTD Tc II policlonal, ya que presentaba tres alelos para el locus TAC15, y una población en sangre periférica de linaje TcV y aparentemente monoclonal ya que no se observaron loci de microsatelites con más de dos alelos.

En el caso 2, se analizaron muestras de sangre periférica y LCR, observándose una población policlonal de UTD TcI + TcV en sangre, pero aparentemente monoclonal perteneciente a la UTD TcI en el LCR (Burgos y col., 2008). En este caso, el hallazgo del alelo de 96 pb para TAC 15 fue también marcador de Tc I. Estas observaciones sugieren que (1) *T. cruzi* podría circular en una mayor frecuencia de lo que ha sido asumido en base a la tipificación de cultivos parasitarios realizados a partir de muestras clínicas en los países de América del Sur, (2) la baja tasa de detección de esta UTD en pacientes con enfermedad de Chagas indeterminada o crónica puede ser debido a su baja carga parasitaria en sangre periférica como consecuencia de un tropismo por órganos internos y (3) la exacerbación de la parasitemia de *T. cruzi* I causada por inmunosupresión permite detectar a esta UTD.

En ambos casos de reactivación parasitológica por inmunosupresión por co-infección con V.I.H. se observó una distribución diferencial de poblaciones parasitarias en los

tejidos analizados. Estos casos claramente demuestran la utilidad de la técnica de microsatélites para empezar a evaluar más profundamente la teoría del histotropismo clonal (Andrade y col., 1999; Vago y col., 1996; Vago y col., 2000).

Los perfiles obtenidos de un paciente trasplantado (paciente Tx5 Tabla 1.12) a partir del corazón explantado (Tx5.Exp-Car Tabla 1.12), sangre periférica (Tx5.Sang-Per Tabla 1.12) y biopsia endomiocárdica (Tx5.Biop-Mioc Tabla 1.12), donde se observa que la población responsable del primer evento de reactivación (Tx5.Sang-Per) y del segundo evento de reactivación (Tx5.Biop-Mioc) es la misma que estaba presente en el corazón explantado (Burgos y col., 2010), indicando que la población responsable del primer evento de reactivación no fue erradicada con el tratamiento etiológico.

Otro caso interesante es el análisis de una muestra de tejido de placenta, que resultó estar infectada por una población policlonal Tc VI (Emb4-Placenta, Tabla 1.12).

En conjunto, los resultados obtenidos con el análisis de microsatélites directamente a partir de muestras clínicas demuestran la existencia de infecciones policlonales tanto en sangre como en tejidos (Valadares y col., 2008), así como la distribución diferencial de estas poblaciones según el tejido. Estos resultados están en concordancia con la teoría del histotropismo clonal descripta en algunos estudios sobre la infección humana mediante LSSP-PCR (Andrade y col., 1999; Vago y col., 2000) así como en modelo experimental murino donde demuestran un histrotropismo diferencial según los clones parasitarios y las cepas murinas analizadas (Freitas y col., 2009). Por otro lado, la detección de infecciones policlonales en la mayoría de los pacientes inmunosuprimidos e infecciones simples en la mayoría de los pacientes inmuno-competentes estaría sugiriendo que las infecciones policlonales serían más comunes de lo observado.

1.2.2. PCR Pr1-Pr3: Discriminación entre Tc II y Tc VI

La discriminación entre las UTD Tc II y Tc VI ha sido largamente problemática ya que comparten gran parte de su contenido genómico debido a que la UTD Tc VI surgió de al menos un evento de hibridización relativamente reciente con parásitos Tc II (de Freitas y col., 2006; Westenberger y col., 2005). Por lo tanto, con el objetivo de contar

con un ensayo sensible y resolutivo para discriminar entre estas dos UTD, diseñamos el ensayo de PCR Pr1-Pr3, modificado a partir de la reacción original de PCR-A10. Esta reacción se realiza en la modalidad hemi-nested, y ambas poblaciones parasitarias dan lugar a un producto de amplificación de distinto tamaño. La aplicación de una estrategia hemi-nested aumenta notablemente la sensibilidad de la reacción, posibilitando la detección de cantidades de ADN del orden del picogramo, al igual que para las estrategias dirigidas a la región inter-génica espaciadora del mini-exón. La modificación de los oligonucleótidos permite obtener amplicones diferenciales para ambos UTD, haciéndola más resolutiva ya que se evitan tipificaciones erróneas por la presencia de inhibidores o baja carga parasitaria que impiden la amplificación del fragmento. Por otro lado, los amplicones diferenciales generados para ambas UTD se pueden diferenciar con una corrida electroforética en gel de agarosa 2,5%, así como también por temperatura de desnaturalización de los amplicones en la modalidad de tiempo real (Fig. 1.8). Esta segunda opción hace a la reacción más rápida y con menor riesgo de generar contaminación por arrastre de amplicón ya que permite la identificación precisa del fragmento amplificado mediante el análisis de las temperaturas de desnaturalización sin necesidad de montar una electroforesis. Este método nos permitió genotipificar poblaciones parasitarias directamente a partir de muestras de tejido y sangre periférica de pacientes con enfermedad de Chagas.

Dado que la mayoría de las muestras humanas analizadas provienen de sangre periférica de pacientes argentinos, donde la UTD predominante es Tc V, la reacción PCR Pr1-Pr3 se utiliza mayormente para descartar infecciones mixtas con la UTD Tc II en los casos en que se obtengan dos amplicones en la PCR-24Sα-HN. Sin embargo, el único caso detectado en el marco de esta tesis ha sido un paciente co-infectado con V.I.H., nacido en Buenos Aires que habría adquirido la infección aparentemente por vía connatal, que presentaba una infección Tc II policlonal en el cerebro, pero en sangre periférica solo se detectaron parásitos Tc V. Estos resultados podrían implicar que la ausencia de Tc II en pacientes argentinos, no solo se debe a una menor prevalencia de esta UTD en la región, sino también por un sesgo en el tipo de muestras analizadas o por falta de sensibilidad en este método para tipificar poblaciones parasitarias en pacientes crónicos, que se caracterizan por sus bajas parasitemias.

1.3. Ensayos con tecnología Luminex

El sistema Luminex es una plataforma basada en la tecnología de citometría de flujo e inmunoensayo enzimático y utiliza microesferas fluorescentes unidas covalentemente a sondas de oligonucleótidos, lo que hace posible el análisis de hasta 100 diferentes reacciones en un solo recipiente de reacción. En los últimos años, la tecnología Luminex se ha utilizado cada vez más en investigación y diagnóstico para la detección a gran escala de ácidos nucleicos en modalidad multiplex. La PCR en tiempo real puede ser utilizada para la detección de ácidos nucleicos a gran escala, pero no es capaz de realizar más de 5 ensayos en modalidad multiplex debido al limitante en el número de canales de detección de los termocicladores. El sistema Luminex, en cambio, posibilita la actualización constante de un determinado ensayo, mediante el agregado de nuevas duplas sonda-amplicón a genotipos emergentes que van siendo descubiertos. En este sentido, los *microarrays* también tienen la capacidad de analizar un gran número de blancos de ácidos nucleicos en simultáneo, pero no cuentan con la reproducibilidad necesaria para ensayos de diagnóstico.

Nosotros hemos logrado diseñar un ensayo capaz de tipificar a 3 de los 4 grupos de UTD distinguibles según la región intergénica del mini-exón. Sin embargo, no hemos logrado aún encontrar una sonda capaz de detectar específicamente a Tc IV.

A diferencia de lo que ocurre en la puesta a punto de reacciones de PCR, al diseñar ensayos Luminex donde generalmente se utiliza un gran número de sondas en cada reacción, las condiciones de hibridización y detección se establecen para el primer juego de sondas. Para poder agregar al sistema nuevas duplas de amplicón-sonda, es necesario realizar un rastreo entre un panel de duplas específicas para un determinado blanco molecular y, a partir de éste, elegir la dupla que mejor se adapte a las condiciones obtenidas en los ensayos iniciales.

Para evitar que las diferencias en la composición nucleotídica de las sondas dificulten la puesta a punto, la reacción se lleva a cabo en tampón TMAC (ver Materiales y métodos) que estabiliza las uniones A-T, generando que su fuerza de unión sea igual a la de las

uniones G-C, siendo la fuerza de hibridización una función solamente dependiente de la longitud de la sonda (Wood y col., 1985). Esto permite que sondas de distintas características pero de igual tamaño sean utilizadas bajos las mismas condiciones de reacción.

Otro factor a tener en cuenta es que la hibridización entre las sondas y los amplicones se lleva a cabo a temperaturas entre los 40-55°C, por lo que la estructura secundaria de los amplicones suele ser determinante. Lamentablemente, el hecho de realizar la hibridización en tampón TMAC hace muy difícil el modelado de la estructura secundaria de los amplicones *in silico*. Por lo tanto, la estrategia para encontrar duplas de sonda-amplicón que funcionen bien suele basarse en diseñar amplicones cortos para disminuir la estructura secundaria y evaluar un gran número de sondas hasta encontrar alguna que hibridice adecuadamente en las condiciones del ensayo. Esto lo hemos logrado para tres grupos de *T. cruzi* y para el CI pero aún no encontramos una sonda con estas características para Tc IV.

Cabe destacar la inclusión de un CI en el ensayo, ya que la incorporación de estándares internos es un requisito indispensable para la validación y aplicación clínica de cualquier reacción de PCR con valor diagnóstico (Hoorfar y col., 2003).

Estos resultados preliminares y las características de la tecnología Luminex posicionan a esta plataforma como una alternativa de avanzada para la genotipificación de un organismo sumamente complejo como *T. cruzi*, donde es necesario contar un gran panel de marcadores moleculares. Además, para poder extender el ensayo a aplicaciones eco-epidemiológicas a todas las regiones endémicas y en distinto tipo de muestra biológica, hemos planteado el agregado de duplas amplicón-sonda para la detección simultanea de *B.triatomae*, *T. rangeli* y *T. cruzi bat*, actualmente en realización.

El mayor factor limitante para su utilización es el alto costo del equipo y los reactivos, por lo cual esta estrategia debería ser transferida a centros de referencia.

2. Métodos de Cuantificación de *T. cruzi*

En el marco de esta Tesis hemos desarrollado estrategias de QPCR altamente sensibles, reproducibles, precisas y rápidas para la cuantificación de *T. cruzi* en muestras de sangre periférica humana, tejido humano y tejido murino. De hecho, este es un primer intento de desarrollar estrategias de QPCR en tiempo real altamente confiables ya que incorporan: (1) un kit comercial para el procesamiento de la muestra que minimiza el arrastre de inhibidores de la PCR y estandariza el rendimiento y la calidad de la extracción de ADN, (2) una reacción de PCR que se realiza en una sola ronda, sin necesidad de un análisis por electroforesis posterior, lo que reduce al mínimo la contaminación por arrastre (3) un adecuado control de calidad interno para cada caso particular (sangre humana, tejido humano, tejido murino) y (4) una corrección en el cálculo de la carga parasitaria, de acuerdo con el número de secuencias blanco entre las diferentes UTD de *T. cruzi*. El desarrollo de estas estrategias es un paso clave hacia la normalización y validación de ensayos no comerciales de QPCR para su aplicación de rutina en el laboratorio.

Aunque estudios recientes han demostrado las ventajas de la PCR en tiempo real para detección y cuantificación de *T. cruzi*, ninguno ha implementado procedimientos para normalizar el rendimiento de la extracción de ADN, ni la representatividad de las secuencias blanco de la PCR según población parasitaria. Algunos estudios (Cummings y Tarleton, 2003; Piron y col., 2007; Virreira y col., 2006) han elegido como control interno una secuencia de ADN del huésped, pero la cantidad de ADN humano presente en sangre periférica puede ser muy variable, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. En este caso, nuestra estrategia incorpora la adición de una cantidad estandarizada de un plásmido que contiene una secuencia heteróloga, lo que permite la normalización de los rendimientos de la extracción de ADN y la detección de falsos negativos debido a inhibición en cualquier situación clínica. En este sentido, el Comité de Estandarización Europea (CEN) en colaboración con la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) han propuesto que las reacciones de PCR utilizadas clínicamente requieran de un CI en la mezcla de reacción, y que unicamente

estas reacciones puedan ser sujetas a procesos de armonización y estandarización, pre-requisito para su validación clínica (Hoorfar y col., 2003).

Para la normalización de cargas parasitarias a partir de muestras de tejido si utilizamos como control interno a una secuencia de ADN, de copia única, del huésped y de esta manera poder expresar los resultados como parásitos por número de células huesped.

En cuanto al blanco molecular de amplificación (Elias y col., 2003; Elias y col., 2005; Vargas y col., 2004) se ha observado que el ADN satélite es de 4 a 9 veces más abundante en las UTD Tc II/VI que en la Tc I. Nosotros hemos extendido este análisis a las 6 UTD de *T. cruzi*, describiendo por primera vez las repeticiones de ADN satélite de las UTD Tc III, IV y V (números de acceso en GenBank: EU728662-EU728667). De hecho, hemos detectado una variación de 5 a 10 veces en el contenido de ADN satélite entre las cepas parasitarias del grupo I (Tc I/III) y grupo II (Tc II/V/VI) (Tabla 2.2). Por lo tanto, esta variabilidad debe ser tenida en cuenta para calcular con precisión las cargas parasitarias. En consecuencia, también hemos diseñado un ensayo de PCR en tiempo real altamente sensible (PCR-Lg), para distinguir las poblaciones del grupo *T. cruzi* I (de menor número de copias de la secuencia satélite y mayor temperatura de desnaturalización) del grupo II (un mayor número de copias de la secuencia satélite e inferior temperatura de desnaturalización). Todas las cepas analizadas presentaron sólo un pico de temperatura de desnaturalización, incluidas las híbridas como Cl Brener, a pesar de albergar los dos tipos de secuencias satélite. Esto puede ser explicado por el hecho de que Cl Brener (Tc VI) alberga diez veces más secuencias satélite de tipo II que de tipo I (Vargas y col., 2004) y debido a amplificación exponencial, sólo el tipo de secuencia predominante es detectado. La alta sensibilidad analítica de la Lg-PCR la hace útil para la caracterización directa de muestras biológicas que no pueden ser tipificadas por otros métodos (Burgos y col., 2007; Freitas y col., 2005; Marcet y col., 2006).

El procesamiento de las muestras y la extracción de ADN también deben ser optimizados para la obtener una estrategia de cuantificación confiable. En este sentido, hemos adaptado un kit comercial, basado en la tecnología de membrana de silica (QIAmp DNA Mini Kit) para el procesamiento de muestras GEB. El método de

extracción convencional, basado en Fenol-cloroformo es un método aceptable para PCR cualitativa, aunque en algunos casos trazas de inhibidores de la PCR puedan ser co-purificados (Castella y col., 2006; Clements y col., 2008). Estas sustancias puede que no impidan la amplificación, pero podrían afectar su eficiencia, lo que conduce a resultados de cuantificación inexactos. De hecho, hemos detectado trazas de inhibidores de la PCR en el 29% de las muestras extraídas por el método de Fenol-Cl. Cuando presentes, estos inhibidores provocaron una subestimación de la carga parasitaria en el 67% de las muestras positivas, aunque no afectaron gravemente la positividad de la PCR. Estos resultados sugieren que la extracción por Fenol-Cl de muestras GEB no es adecuado para la de QPCR, aunque puede utilizarse para PCR cualitativa.

2.1 Aplicación en modelo experimental

A diferencia de lo mencionado para muestras de sangre periférica humana, en este caso no se utilizó un control interno heterólogo (CI) para normalizar los resultados entre distintas muestras, si no que se amplificó el gen murino de copia única que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). Los resultados se expresaron como número de parásitos por cada 10^9 o 10^6 células murinas. La amplificación del gen murino también sirvió para confirmar la ausencia de inhibidores de la QPCR en las muestras extraídas.

Para la determinación del rol del gen *LYT1* en la infectividad de *T. cruzi* se analizaron muestras de musculo esquelético y cardíaco de ratones infectados con la cepa L16, clon mutante nulo para el gen *LYT1* de Cl-Brener, así como para la cepa salvaje (WT) en la etapa aguda de la infección (28 días post-infección) y en la etapa crónica de la infección (7 meses post-infección). En este estudio logramos detectar parásitos en tejido murino en un rango dinámico muy amplio, abarcando de 1 parásito por cada 10^9 células huésped, hasta 1 parásito por cada 10^9 células huésped. Esta estrategia permitió observar diferencias significativas entre la infectividad del clon L16 y Cl-Brener WT en ambos tejidos analizados en la etapa aguda de la infección (Fig. 3.9). En la etapa crónica de la infección se pudo observar diferencias significativas solo en músculo esquelético

(Fig. 3.10). Es probable que la falta de significancia en la infectividad entre ambos clones en tejido cardíaco en la etapa crónica se deba a los muy bajos valores de carga parasitaria observados, cercanos al límite inferior del rango dinámico del ensayo (1 parásito/10^9 células huésped). Los casi 4 órdenes de diferencia entre la carga parasitaria observada en la etapa crónica en ambos tejidos pone en evidencia el marcado histotropismo del Cl-Brener en este modelo experimental.

En otro estudio, con el objetivo de analizar las dinámicas de infección producidas por distintas poblaciones parasitarias, se analizaron muestras de ganglio linfático satélite y bazo, de ratones infectados con la cepa RA (Tc VI) o la cepa K98 (Tc I), a 2, 15, 28 y 90 días post-infección (dpi). En este caso se observaron cargas parasitarias entre 1 parásito/10^7 células huésped, hasta 1 parásito/10^3 células huésped. En el bazo, la dinámica de la infección producida por las cepas RA y K98 fue levemente distinta. Mientras que RA tuvo una carga de parasitemia máxima a los 15 días, el pico en K98 fue a los 28 días. En ambos casos, el pico de carga parasitaria fue de aproximadamente 1 parásito / 10^3 células huésped. Sin embargo, la dinámica de la infección observada en el bazo estuvo fuertemente influenciada por cepas infectante. En la infección producida por la cepa RA, se pudo observar un aumento constante hasta llegar a la máxima carga parasitaria de 1 parásito / 10^3 células huésped a los 28 dpi, mientras que la infección por la cepa K98, a los 15 dpi se detectó la carga parasitaria más baja, de solo 1 parásito / 10^7 células huésped, para luego observar la máxima a los 28 dpi menor a los 10 parásitos / 10^6 células huésped (Fig. 3.11).

En ambos estudios se pudo aplicar con éxito la estrategia de QPCR-SG y observar diferencias significativas tanto en la infectividad de dos clones distintos, así como en la dinámica de la infección producida por dos cepas distintas. Esta herramienta sin duda será de gran utilidad para estudios de la enfermedad de Chagas llevados a cabo en el modelo experimental murino.

2.2 Aplicación en estudios clínicos

2.2.1. QPCR-SG

En esta Tesis, se aplicó la estrategia de QPCR-SG a muestras de sangre extraídas de pacientes en diferentes escenarios clínicos. Por su amplio rango dinámico permitió mediciones directas en los casos con altas cargas parasitarias, como pacientes inmunodeprimidos con enfermedad de Chagas y recién nacidos con infección connatal, así como en casos con baja parasitemias, tales como pacientes en fase crónica o bajo tratamiento etiológico. Cuando se aplicó a los recién nacidos, lactantes y niños con infección por *T. cruzi*, se estimaron cargas parasitarias en un amplio rango, entre 0,01 y 640 p/mL de sangre (Fig. 3.3). Las cargas parasitarias más altas, observadas en la población pediátrica más joven, está de acuerdo con los resultados obtenidos por análisis parasitológicos convencionales y PCR-ADNk (Schijman y col., 2003; Freilij y Altcheh, 1995). Por otra parte, las cargas parasitarias más bajas, detectadas en los pacientes pediátricos de mayor edad, reflejan su evolución hacia la fase crónica de la infección connatal (Schijman y col., 2003).

A su vez, hemos sido capaces de realizar un seguimiento de sus respuestas parasitológicas al tratamiento con benznidazol (Fig. 3.4), con un resultado favorable en el 94,7% (36/38) de los casos. Vale la pena señalar que en t3, transcurridos 30 días del inicio del tratamiento, 4 pacientes todavía poseían cargas parasitarias detectables. Al final del tratamiento (t4) 2 de ellos se convirtieron en QPCR-SG-Tc negativos, continuando no detectables durante 18 meses de seguimiento post- tratamiento. Esta observación pone de relieve la importancia de un régimen de tratamiento de 60 días. Entrevistas con las madres de los dos pacientes que persistieron QPCR-SG-Tc positivos a t4 puso de manifiesto la falta de adherencia al tratamiento en uno de ellos (Pd2, Tabla 2.3 y Fig. 3.4, triángulo verde), mientras que en el otro caso (PD1, Tabla 2.3 y Fig. 3.4, el triángulo rojo) la persistencia de la parasitemia indicaría la falta de respuesta parasitológica al benznidazol. Estos casos demuestran la utilidad de la estrategia de QPCR-SG como una alternativa de marcador para la detección precoz del fracaso del tratamiento. Dos pacientes pediátricos (Fig. 3.4, cuadrados de color rosa y amarillo) presentaron un aumento de sus cargas parasitarias de t1 a t2, pero luego mostraron una respuesta parasitológica favorable al tratamiento en las muestras recogidas en t3 y t4,

hecho que fue confirmado por medio de PCR-ADNk en los sucesivos controles post-tratamiento (datos no mostrados). Estos casos, donde se observa una parasitemia menor en t1 en comparación con t2, probablemente representen fluctuaciones naturales de la parasitemia en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

En este contexto, es importante analizar muestras de sangre seriadas por ser capaz de observar una tendencia creciente o decreciente en las cargas parasitarias de los pacientes crónicos en tratamiento. La estrategia de QPCR-SG se utilizó también para la detección precoz de la reactivación de *T. cruzi* después de un trasplante cardíaco. Esto se visualizó a través del incremento de las cargas parasitarias en todos los pacientes que presentaron manifestaciones clínicas de la reactivación (Diez y col., 2007). En particular, en el caso TX1 el paciente está infectado con *T. cruzi* I, y el número de parásitos aumentó de 0,22 p/ml (5 días de pre-Tx) a 9,07 p/mL (78 días post-Tx) cuando el paciente presenta signos y síntomas de reactivación por un chagoma en la piel y parasitemia patente (Diez y col., 2007). En los otros dos casos, TX2 y TX3, que fueron infectados con poblaciones parasitarias del grupo satélite II, los incrementos de las cargas parasitarias fueron notablemente mayores (Tabla 2.3 y Fig. 3.6). En TX3, el tratamiento con benznidazol después de la reactivación produjo una respuesta parasitológica transitoria ya que muestras tomadas 44 y 70 días después del tratamiento resultaron QPCR-SG-Tc positivas (Fig. 3.6). La reactivación parasitológica se confirmó por medio de PCR-ADNk en muestras sucesivas hasta que un segundo episodio de reactivación clínica fue diagnosticado (Diez y col., 2007). En los casos de trasplante cardíaco, la QPCR-SG permitió detectar un aumento de la carga parasitaria, previo al diagnóstico de reactivación, así como también seguir la respuesta parasitológica durante el tratamiento con benznidazol. En conjunto, la alta sensibilidad analítica de la estrategia de QPCR-SG, los bajos niveles de variación intra e inter-ensayo, así como la precisión aportada por la corrección de la PCR-Lg, promueven a este método como una herramienta de laboratorio clave para el seguimiento de pacientes bajo tratamiento etiológico o en riesgo de reactivación clínica. Esto es de particular importancia para las pruebas de nuevas drogas donde una valoración temprana de la eficacia o el fracaso son fundamentales (Molina y col., 2000).

2.2.2. QPCR-MTq

Como continuación en el desarrollo de estrategias de cuantificación de *T. cruzi* por PCR en tiempo real nos propusimos unificar las reacciones QPCR-SG-Tc y QPCR-SG-CI en una sola reacción multiplex. Para ello fue necesario cambiar la tecnología de detección de ADN de SYBR Green, el cual detecta inespecíficamente todo ADN doble cadena, a las sondas Taqman, las cuales permiten una evaluación diferencial de la cantidad de cada producto de reacción dentro de un mismo tubo de ensayo. Esta técnica es igual de sensible que la QPCR-SG-Tc, pero es más confiable ya que las sondas Taqman disminuyen las probabilidades de falsos positivos al ser más específicas, la determinación del CI se encuentra directamente asociada a la de *T. cruzi* y la utilización una Master mix comercial le brinda una mayor reproducibilidad. Otra ventaja es que es más económica y requiere menos trabajo ya que se realizan menos reacciones de PCR.

Esta técnica fue desarrollada en el marco de un proyecto del DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) y de MSF (Médicos sin Fronteras) para la evaluación temprana de la nueva pro-droga E1224 (ER-30346, Eisai Co.; BMS 207.147; Bristol-Myers Squibb). E1224 es rápidamente convertida en Ravuconazol *in vivo* (Urbina y col., 2003a) y su eficacia como droga tripanocida en pacientes crónicos comenzará a ser evaluada en ensayos clínicos este año de Cochabamba, Bolivia utilizando la estrategia de QPCR-MTq. Para esto, nuestro laboratorio acaba de firmar un convenio de transferencia tecnológica y organización de ensayos de certificación de los laboratorios implicados a través de CONICET.

Asimismo, se ha firmado un convenio de transferencia de controles de calidad de calidad de PCR y certificación del laboratorio norteamericano GENTRIS, para validar la aplicación de esta metodología en los ensayos clinicos de posaconazol a cargo de Schering-Plough.

Tenemos la esperanza de que el desarrollo de esta técnica y otras similares permitan una efectiva evaluación de nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Estos estudios, sin dudas, aumentarán las probabilidades de encontrar una

cura a esta enfermedad que hoy en día continua castigando a los sectores más vulnerables de América Latina.

CONCLUSIONES

Desarrollo y aplicación de métodos de tipificación de *T. cruzi*

- Se diseñaron y desarrollaron estrategias moleculares de genotipificación que permiten discriminar poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes a distintas UTD, así como también caracterizar polimorfismo entre poblaciones pertenecientes a una misma UTD. Entre ellas, cabe destacar la puesta a punto de 1) la tecnología basada en sondas Taqman en ensayos de PCR en tiempo real, y 2) el sistema Luminex, que permitió iniciar la construcción de una plataforma de tipificación de *T. cruzi* utilizando tecnología de última generación, estrategia aplicada por primera vez a parasitosis endémicas.

- Dichas estrategias fueron evaluadas para polimorfismo intra-UTD en aislamientos en cultivo de poblaciones naturales de *T. cruzi* y directamente en muestras biológicas y clínicas infectadas. En conjunto, estas técnicas han aportado a la caracterización de la variabilidad genética de poblaciones parasitarias presentes en triatominos silvestres de regiones endémicas de Argentina y el sur de los Estados Unidos de América, y en pacientes con reactivación chagásica por inmunosupresión, donde demostramos histotropismo diferencial de ciertos clones parasitarios pertenecientes a distintas UTD.

Desarrollo y aplicación de métodos de cuantificación de *T. cruzi*

- Se diseñó un método preciso de Q-PCR que permite detectar las fluctuaciones de la carga parasitaria previamente a la detección de los eventos de reactivación clínica por inmunosupresión, como así también monitorear la respuesta parasitológica a drogas tripanocidas poniendo en evidencia casos de falla terapéutica. Esta metodología fue perfeccionada mediante el desarrollo de un sistema QPCR-Multiplex TaqMan y transferida para su validación clínica.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcon de Noya, B., Diaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J.A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M., Rivas, L., Castro, J., Marques, J., Mendoza, I., Acquatella, H., Torres, J., Noya, O., 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. J Infect Dis 201, 1308-1315.

Amato Neto, V., 1999. Etiological treatment for infection by *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1, 337-339.

Andrade, L.O., Machado, C.R., Chiari, E., Pena, S.D., Macedo, A.M., 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol 100, 163-172.

Anez, N., Crisante, G., Rojas, A., Carrasco, H., Parada, H., Yepez, Y., Borges, R., Guevara, P., Ramirez, J.L., 2001. Detection and significance of inapparent infection in Chagas disease in western Venezuela. Am J Trop Med Hyg 65, 227-232.

Anónimo, 1999. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1, 429-432.

Anonymous, 1999. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1, 429-432.

Antas, P.R., Medrano-Mercado, N., Torrico, F., Ugarte-Fernandez, R., Gomez, F., Correa Oliveira, R., Chaves, A.C., Romanha, A.J., Araujo-Jorge, T.C., 1999. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. Am J Trop Med Hyg 61, 308-314.

Araujo, F.M., Bahia, M.T., Magalhaes, N.M., Martins-Filho, O.A., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Tafuri, W.L., 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 Trop 81, 21-31.

Atias, A., Aguirre Mackay, L., Campero, E., Parrochia, E., Jarpa, S., Pizarro, D., Silva, M., 1962. [Megaesophagus and Chagas' disease: first cases described in Chile.]. Bol Chil Parasitol 17, 20-23.

Atias, A., Morales, M., Munoz, P., Barria, M., 1985. [Ocular involvement in congenital Chagas' disease]. Rev Chil Pediatr 56, 137-141.

Avila, H.A., Sigman, D.S., Cohen, L.M., Millikan, R.C., Simpson, L., 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol 48, 211-221.

Barcan, L., Luna, C., Clara, L., Sinagra, A., Valledor, A., De Rissio, A.M., Gadano, A., Garcia, M.M., de Santibanes, E., Riarte, A., 2005. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. Liver Transpl 11, 1112-1116.

Benchimol Barbosa, P.R., 2006. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. Int J Cardiol 112, 132-133.

Bittencourt, A.L., Sadigursky, M., Da Silva, A.A., Menezes, C.A., Marianetti, M.M., Guerra, S.C., Sherlock, I., 1988. Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. Mem Inst Oswaldo Cruz 83, 37-39.

Blanco, S.B., Segura, E.L., Cura, E.N., Chuit, R., Tulian, L., Flores, I., Garbarino, G., Villalonga, J.F., Gurtler, R.E., 2000. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. Trop Med Int Health 5, 293-301.

Blanco, S.B., Segura, E.L., Gurtler, R.E., 1999. [Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina]. Medicina (B Aires) 59 Suppl 2, 138-142.

Bogliolo, A.R., Lauria-Pires, L., Gibson, W.C., 1996. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. Acta Trop 61, 31-40.

Breniere, S.F., Bosseno, M.F., Telleria, J., Carrasco, R., Vargas, F., Yaksic, N., Noireau, F., 1995. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. Am J Trop Med Hyg 53, 179-184.

Briones, M.R., Souto, R.P., Stolf, B.S., Zingales, B., 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. Mol Biochem Parasitol 104, 219-232.

Brisse, S., Barnabe, C., Tibayrenc, M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol 30, 35-44.

Brisse, S., Henriksson, J., Barnabe, C., Douzery, E.J., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M.R., Buck, G.A., Dujardin, J.C., Tibayrenc, M., 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. Infect Genet Evol 2, 173-183.

Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M., 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int J Parasitol 31, 1218-1226.

Britto, C., Cardoso, M.A., Vanni, C.M., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S.S., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C.M., Wincker, P., 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. Parasitology 110 (Pt 3), 241-247.

Britto, C., Silveira, C., Cardoso, M.A., Marques, P., Luquetti, A., Macedo, V., Fernandes, O., 2001. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 96, 823-826.

Burgos, J.M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H.M., Seidenstein, M.E., Piccinali, R., Freitas, J.M., Levin, M.J., Macchi, L., Macedo, A.M., Freilij, H., Schijman, A.G., 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. Int J Parasitol 37, 1319-1327.

Burgos, J.M., Begher, S., Silva, H.M., Bisio, M., Duffy, T., Levin, M.J., Macedo, A.M., Schijman, A.G., 2008. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. Am J Trop Med Hyg 78, 294-297.

Burgos, J.M., Begher, S.B., Freitas, J.M., Bisio, M., Duffy, T., Altcheh, J., Teijeiro, R., Lopez Alcoba, H., Deccarlini, F., Freilij, H., Levin, M.J., Levalle, J., Macedo, A.M., Schijman, A.G., 2005. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. Am J Trop Med Hyg 73, 1016-1018.

Burgos, J.M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura, C., Brusses, B., Favaloro, L., Leguizamon, M.S., Lucero, R.H., Laguens, R., Levin, M.J., Favaloro, R., Schijman, A.G., 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. Clin Infect Dis 51, 485-495.

Camargo, M.E., 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 8, 227-235.

Cardinal, M.V., Lauricella, M.A., Ceballos, L.A., Lanati, L., Marcet, P.L., Levin, M.J., Kitron, U., Gurtler, R.E., Schijman, A.G., 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Int J Parasitol.

Carrasco, H.J., Frame, I.A., Valente, S.A., Miles, M.A., 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 54, 418-424.

Castanera, M.B., Lauricella, M.A., Chuit, R., Gurtler, R.E., 1998. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. Ann Trop Med Parasitol 92, 671-683.

Castella, V., Dimo-Simonin, N., Brandt-Casadevall, C., Mangin, P., 2006. Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. Forensic Sci Int 156, 70-73.

Cecere, M.C., Castanera, M.B., Canale, D.M., Chuit, R., Gurtler, R.E., 1999. *Trypanosoma cruzi* infection in Triatoma infestans and other triatomines: long-term effects of a control program in rural northwestern Argentina. Rev Panam Salud Publica 5, 392-399.

Cerisola, J.A., Rohwedder, R., Bozzini, J.P., Del Prado, C.E., 1971. Blastocrithidia triatomae n. sp. found in Triatoma infestans from Argentina. J Protozool 18, 503-506.

Clements, D.N., Wood, S., Carter, S.D., Ollier, W.E., 2008. Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. Res Vet Sci 85, 74-79.

Corrales, M., Cardozo, R., Segura, M.A., Urbina, J.A., Basombrio, M.A., 2005. Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. Antimicrob Agents Chemother 49, 1556-1560.

Corti, M., 2000. AIDS and Chagas' disease. AIDS Patient Care STDS 14, 581-588.

Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A., Miles, M.A., 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol 18, 171-176.

Cummings, K.L., Tarleton, R.L., 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. Mol Biochem Parasitol 129, 53-59.

Chiari, E., 1999. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1, 299-300.

Chiurillo, M.A., Crisante, G., Rojas, A., Peralta, A., Dias, M., Guevara, P., Anez, N., Ramirez, J.L., 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and Trypanosoma rangeli infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. Clin Diagn Lab Immunol 10, 775-779.

Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: a sequence logo generator. Genome Res 14, 1188-1190.

de Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M., Chiari, E., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R., Pena, S.D., 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog 2, e24.

de Luca D'oro G, M., Gardenal, C.N., Perret, B., Crisci, J.V., Montamat, E.E., 1993. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. Parasitology 107 (Pt 4), 405-410.

del Puerto, R., Nishizawa, J.E., Kikuchi, M., Iihoshi, N., Roca, Y., Avilas, C., Gianella, A., Lora, J., Velarde, F.U., Renjel, L.A., Miura, S., Higo, H., Komiya, N., Maemura, K., Hirayama, K., 2010. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. PLoS Negl Trop Dis 4, e687.

Dias, J.C., Silveira, A.C., Schofield, C.J., 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 97, 603-612.

Diez, M., Favaloro, L., Bertolotti, A., Burgos, J.M., Vigliano, C., Lastra, M.P., Levin, M.J., Arnedo, A., Nagel, C., Schijman, A.G., Favaloro, R.R., 2007. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. Am J Transplant 7, 1633-1640.

Diosque, P., Barnabe, C., Padilla, A.M., Marco, J.D., Cardozo, R.M., Cimino, R.O., Nasser, J.R., Tibayrenc, M., Basombrio, M.A., 2003. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. Int J Parasitol 33, 997-1003.

Diotaiuti, L., Pereira, A.S., Loiola, C.F., Fernandes, A.J., Schofield, J.C., Dujardin, J.P., Dias, J.C., Chiari, E., 1995. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 90, 443-448.

Dunbar, S.A., 2006. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. Clin Chim Acta 363, 71-82.

Dunbar, S.A., Jacobson, J.W., 2007. Quantitative, multiplexed detection of Salmonella and other pathogens by Luminex xMAP suspension array. Methods Mol Biol 394, 1-19.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science 309, 409-415.

Elias, M.C., Vargas, N., Tomazi, L., Pedroso, A., Zingales, B., Schenkman, S., Briones, M.R., 2005. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. Mol Biochem Parasitol 140, 221-227.

Elias, M.C., Vargas, N.S., Zingales, B., Schenkman, S., 2003. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 129, 1-9.

Fernandes, O., Souto, R.P., Castro, J.A., Pereira, J.B., Fernandes, N.C., Junqueira, A.C., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Degrave, W., Zingales, B., Campbell, D.A., Coura, J.R., 1998a. Brazilian

isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg 58, 807-811.

Fernandes, O., Sturm, N.R., Derre, R., Campbell, D.A., 1998b. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 95, 129-133.

Freilij, H., Altcheh, J., 1995. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. Clin Infect Dis 21, 551-555.

Freitas, J.M., Andrade, L.O., Pires, S.F., Lima, R., Chiari, E., Santos, R.R., Soares, M., Machado, C.R., Franco, G.R., Pena, S.D., Macedo, A.M., 2009. The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. PLoS One 4, e5113.

Freitas, J.M., Lages-Silva, E., Crema, E., Pena, S.D., Macedo, A.M., 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. Int J Parasitol 35, 411-417.

Gajate, P.P., Bottazzi, M.V., Pietrokovsky, S.M., Wisnivesky-Colli, C., 1996. Potential colonization of the peridomicile by Triatoma guasayana (Hemiptera:Reduviidae) in Santiago del Estero, Argentina. J Med Entomol 33, 635-639.

Gaunt, M.W., Yeo, M., Frame, I.A., Stothard, J.R., Carrasco, H.J., Taylor, M.C., Mena, S.S., Veazey, P., Miles, G.A., Acosta, N., de Arias, A.R., Miles, M.A., 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 421, 936-939.

Giraffa, G., Rossetti, L., Neviani, E., 2000. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. J Microbiol Methods 42, 175-184.

Gomes, Y.M., Lorena, V.M., Luquetti, A.O., 2009. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Mem Inst Oswaldo Cruz 104 Suppl 1, 115-121.

Guedes, P.M., Urbina, J.A., de Lana, M., Afonso, L.C., Veloso, V.M., Tafuri, W.L., Machado-Coelho, G.L., Chiari, E., Bahia, M.T., 2004. Activity of the new triazole derivative albaconazole against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in dog hosts. Antimicrob Agents Chemother 48, 4286-4292.

Gurtler, R.E., Segura, E.L., Cohen, J.E., 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. Emerg Infect Dis 9, 29-32.

Hartl, D.L., Lohe, A.R., Lozovskaya, E.R., 1997. Modern thoughts on an ancyent marinere: function, evolution, regulation. Annu Rev Genet 31, 337-358.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res 6, 986-994.

Hernandez, P., Heimann, M., Riera, C., Solano, M., Santalla, J., Luquetti, A.O., Beck, E., 2010. Highly effective serodiagnosis for Chagas disease. Clin Vaccine Immunol.

Hide, G., Tilley, A., 2001. Use of mobile genetic elements as tools for molecular epidemiology. Int J Parasitol 31, 599-602.

Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., Fach, P., 2003. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. J Clin Microbiol 41, 5835.

Junqueira, A.C., Chiari, E., Wincker, P., 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 90, 129-132.

Kawashita, S.Y., Sanson, G.F., Fernandes, O., Zingales, B., Briones, M.R., 2001. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. Mol Biol Evol 18, 2250-2259.

Knierim, F., Sandoval, J., Munoz, E., 1973. [Indirect hemagglutination test in chronic chagas disease (author's transl)]. Bol Chil Parasitol 28, 54-57.

Lages-Silva, E., Ramirez, L.E., Pedrosa, A.L., Crema, E., da Cunha Galvao, L.M., Junho Pena, S.D., Macedo, A.M., Chiari, E., 2006. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. J Clin Microbiol 44, 2167-2171.

Lauricella, M.A., Stariolo, R.L., Riarte, A.R., Segura, E.L., Gurtler, R.E., 2005. Distribution and pathogenicity of *Trypanosoma cruzi* isolated from peridomestic populations of Triatoma infestans and Triatoma guasayana from rural Western Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 100, 123-129.

Lewis, M.D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H.J., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. Am J Trop Med Hyg 81, 1041-1049.

Lorca, M., Veloso, C., Munoz, P., Bahamonde, M.I., Garcia, A., 1995. Diagnostic value of detecting specific IgA and IgM with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens in congenital Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 52, 512-515.

Luquetti, A.O., Rassi, A., 1998. Tratamiento específico de la enfermedad de Chagas en la fase crónica: criterios de cura convencionales: xenodiagnóstico, hemocultivo y serología. . Rev Patol Trop 27, 37-51.

Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Carrasco, H.J., Lewis, M.D., Yeo, M., Vargas, J., Torrico, F., Diosque, P., Valente, V., Valente, S.A., Gaunt, M.W., 2009. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. PLoS Pathog 5, e1000410.

Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect 10, 190-212.

Machado, C.A., Ayala, F.J., 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 7396-7401.

Machado, E.M., Fernandes, A.J., Murta, S.M., Vitor, R.W., Camilo, D.J., Jr., Pinheiro, S.W., Lopes, E.R., Adad, S.J., Romanha, A.J., Pinto Dias, J.C., 2001. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. Am J Trop Med Hyg 65, 958-965.

Maguire, J.H., Hoff, R., Sleigh, A.C., Mott, K.E., Ramos, N.B., Sherlock, I.A., 1986. An outbreak of Chagas' disease in southwestern Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg 35, 931-936.

Malchiodi, E.L., Chiaramonte, M.G., Taranto, N.J., Zwirner, N.W., Margni, R.A., 1994. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and Leishmania spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). Clin Exp Immunol 97, 417-423.

Marcet, P.L., Duffy, T., Cardinal, M.V., Burgos, J.M., Lauricella, M.A., Levin, M.J., Kitron, U., Gurtler, R.E., Schijman, A.G., 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., Valente, V.C., Valente, S.A., Batista, J.S., Junqueira, A.C., Souza, A.I., da Rosa, J.A., Campaner, M., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Teixeira, M.M., 2009. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. Infect Genet Evol 9, 1265-1274.

Martin, F., Maranon, C., Olivares, M., Alonso, C., Lopez, M.C., 1995. Characterization of a non-long terminal repeat retrotransposon cDNA (L1Tc) from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with the ape family of DNA repair enzymes. J Mol Biol 247, 49-59.

Maslov, D.A., Lukes, J., Jirku, M., Simpson, L., 1996. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. Mol Biochem Parasitol 75, 197-205.

Mendes, R.P., Hoshino-Shimizu, S., Moura da Silva, A.M., Mota, I., Heredia, R.A., Luquetti, A.O., Leser, P.G., 1997. Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol 35, 1829-1834.

Mendonca, M.B., Nehme, N.S., Santos, S.S., Cupolillo, E., Vargas, N., Junqueira, A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Coura, J.R., Zingales, B., Fernandes, O., 2002. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. Parasitology 124, 177-184.

Mendoza Ticona, C.A., Cordova Benzaquen, E., Ancca Juarez, J., Saldana Diaz, J., Torres Choque, A., Velasquez Talavera, R., de los Rios Alvarez, J., Vega Chirinos, S., Sanchez Perez, R., 2005. [The prevalence of Chagas' disease in puerperal women and congenital transmission in an endemic area of Peru]. Rev Panam Salud Publica 17, 147-153.

Mikamo, H., Yin, X.H., Hayasaki, Y., Shimamura, Y., Uesugi, K., Fukayama, N., Satoh, M., Tamaya, T., 2002. Penetration of ravuconazole, a new triazole antifungal, into rat tissues. Chemotherapy 48, 7-9.

Miles, M.A., Yeo, M., Gaunt. M.W. , 2003. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease.

Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A.J., Loebenberg, D., Urbina, J.A., 2000. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. Antimicrob Agents Chemother 44, 150-155.

Moncayo, A., Luquetti, A.O., 1990. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. Mem Inst Oswaldo Cruz 85, 489-495.

Montamat, E.E., Arauzo, S.S., Blanco, A., 1987. Subcellular localization of leucine aminotransferase and alpha-hydroxyacid dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 22, 185-193.

Montamat, E.E., De Luca d'Oro, G., Perret, B., Rivas, C., 1991. Characterization of *Trypanosoma cruzi* from Argentina by electrophoretic zymograms. Acta Trop 50, 125-133.

Mora, M.C., Sanchez Negrette, O., Marco, D., Barrio, A., Ciaccio, M., Segura, M.A., Basombrio, M.A., 2005. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. J Parasitol 91, 1468-1473.

Moretti, S., Wilm, A., Higgins, D.G., Xenarios, I., Notredame, C., 2008. R-Coffee: a web server for accurately aligning noncoding RNA sequences. Nucleic Acids Res 36, W10-13.

Nery-Guimarães F, S.N., Calusell DT, Mello AL, Rapone T, Snell T, Rodrigues N. , 1968. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). Hospital 73: 1767-1804, 1968; 21. .

Neto, V.A., Doles, J., Rassi, A., Borges Ade, P., de Rezende, J.M., de Oliveira Gomes, M.C., 1968. [New case reports of Chagas' disease transmitted by blood transfusion]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 10, 46-51.

Noireau, F., Bosseno, M.F., Carrasco, R., Telleria, J., Vargas, F., Camacho, C., Yaksic, N., Breniere, S.F., 1995. Sylvatic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: trends toward domesticity and possible infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). J Med Entomol 32, 594-598.

Noireau, F., Gutierrez, T., Flores, R., Breniere, F., Bosseno, M.F., Wisnivesky-Colli, C., 1999. Ecogenetics of Triatoma sordida and Triatoma guasayana (Hemiptera: reduviidae) in the Bolivian chaco. Mem Inst Oswaldo Cruz 94, 451-457.

Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J Mol Biol 302, 205-217.

Oliveira, R.P., Broude, N.E., Macedo, A.M., Cantor, C.R., Smith, C.L., Pena, S.D., 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 3776-3780.

OMS, 2002. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud.

OMS, 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud.

OPS, O.P.d.l.S., 1998. Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas. Conclusiones de una consulta técnica. Rio de Janeiro, Brasil.

Pinto, A.Y., Valente, S.A., Valente Vda, C., 2004. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. Braz J Infect Dis 8, 454-460.

Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., Lopez-Chejade, P., Puig, L., Verges, M., Gascon, J., Gomez i Prat, J., Portus, M., Sauleda, S., 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. Acta Trop 103, 195-200.

Pizzi, T., de Croizet, V., Smok, G., Diaz, M., 1982. [Chagas' disease in a patient with renal transplantation and immunosuppressive treatment]. Rev Med Chil 110, 1207-1211.

Portela-Lindoso, A.A., 2004. [Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction]. Rev Saude Publica 38, 606.

Rabello, A., Luquetti, A.O., Moreira, E.F., Gadelha Mde, F., dos Santos, J.A., de Melo, L., Schwind, P., 1999. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay--ID-PaGIA Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz 94, 77-82.

Rassi, A., Luquetti, A.O., 2004. Current chemotherapy of american trypanosomiasis, Chapter 22. In: The Trypanosomiasis. Ed. Maudlin P.H., Holmes P.H. & Miles M.A. London: CAB International., 421-429.

Rassi, A., Luquetti, A.O. , 2003. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas disease). In: Tyler KM, Miles MA (Eds.) American trypanosomiasis. Boston: Kluwer Academic Publishers, 117-125.

Riarte, A., Luna, C., Sabatiello, R., Sinagra, A., Schiavelli, R., De Rissio, A., Maiolo, E., Garcia, M.M., Jacob, N., Pattin, M., Lauricella, M., Segura, E.L., Vazquez, M., 1999. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. Clin Infect Dis 29, 561-567.

Rivero, I., Moravenik, M., Morales, J., Gomez, M., de Rosas, J.M., 1974. Letter: Chagas's disease--another hazard in acute leukemia. N Engl J Med 290, 285.

Roellig, D.M., Brown, E.L., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Steurer, F.J., Yabsley, M.J., 2008. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. Emerg Infect Dis 14, 1123-1125.

Rottenberg, M.E., de Titto, E.H., Cardoni, R.L., Segura, E.L., 1991. [Immune response in *Trypanosoma cruzi* infection]. Rev Argent Microbiol 23, 101-121.

Russomando, G., de Tomassone, M.M., de Guillen, I., Acosta, N., Vera, N., Almiron, M., Candia, N., Calcena, M.F., Figueredo, A., 1998. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 59, 487-491.

Russomando, G., Rojas de Arias, A., Almiron, M., Figueredo, A., Ferreira, M.E., Morita, K., 1996. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of Triatoma infestans. Exp Parasitol 83, 62-66.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4, 406-425.

Schechter, M., Stevens, A.F., Luquetti, A.O., Snary, D., Allen, A.K., Miles, M.A., 1986. Prevalence of antibodies to 72-kilodalton glycoprotein (GP72) in patients with Chagas' disease and further evidence of zymodeme-associated expression of GP72 carbohydrate epitopes. Infect Immun 53, 547-552.

Schenone, H., Contreras, M., Solari, A., Garcia, A., Rojas, A., Lorca, M., 2003. [Nifurtimox treatment of chronic Chagasic infection in children]. Rev Med Chil 131, 1089-1090.

Schenone, H., Contreras, M.C., Borgono, J.M., Rojas, A., Villarroel, F., 1985. [Congenital Chagas' disease in Chile. Longitudinal study of the reproductivity of women with or without Chagas' disease and of some parasitological and clinical parameters of them and their corresponding children]. Bol Chil Parasitol 40, 24-29.

Schijman, A.G., Altcheh, J., Burgos, J.M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M.J., Freilij, H., 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. J Antimicrob Chemother 52, 441-449.

Schmunis, G.A., 1999. [Risk of Chagas disease through transfusions in the Americans]. Medicina (B Aires) 59 Suppl 2, 125-134.

Schneider, T.D., Stephens, R.M., 1990. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucleic Acids Res 18, 6097-6100.

Schofield, C.J., Diotaiuti, L., Dujardin, J.P., 1999. The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1, 375-378.

Shikanai-Yasuda, M.A., Marcondes, C.B., Guedes, L.A., Siqueira, G.S., Barone, A.A., Dias, J.C., Amato Neto, V., Tolezano, J.E., Peres, B.A., Arruda Junior, E.R., y col., 1991. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 33, 351-357.

Solari, A., Ortiz, S., Soto, A., Arancibia, C., Campillay, R., Contreras, M., Salinas, P., Rojas, A., Schenone, H., 2001. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. J Antimicrob Chemother 48, 515-519.

Sosa Estani, S., Segura, E.L., Ruiz, A.M., Velazquez, E., Porcel, B.M., Yampotis, C., 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 59, 526-529.

Soto, G., Alleva, K., Mazzella, M.A., Amodeo, G., Muschietti, J.P., 2008. AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. FEBS Lett 582, 4077-4082.

Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 83, 141-152.

Souto, R.P., Vargas, N., Zingales, B., 1999. Trypanosoma rangeli: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. Exp Parasitol 91, 306-314.

Strout, R.G., 1962. A method for concentrating hemoflagellates. J Parasitol 48, 100.

Sturm, N.R., Campbell, D.A., 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 115, 35-43.

Sturm, N.R., Degrave, W., Morel, C., Simpson, L., 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol 33, 205-214.

Sturm, N.R., Vargas, N.S., Westenberger, S.J., Zingales, B., Campbell, D.A., 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol 33, 269-279.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24, 1596-1599.

Telleria, J., Lafay, B., Virreira, M., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Svoboda, M., 2006. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. Exp Parasitol 114, 279-288.

Terry, R.S., Smith, J.E., Duncanson, P., Hide, G., 2001. MGE-PCR: a novel approach to the analysis of Toxoplasma gondii strain differentiation using mobile genetic elements. Int J Parasitol 31, 155-161.

Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Int J Parasitol 28, 85-104.

Tibayrenc, M., 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. Kinetoplastid Biol Dis 2, 12.

Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends Parasitol 18, 405-410.

Tibayrenc, M., Ayala, F. , 1988. Isozyme variability of *Trypanosoma cruzi* , the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution 42, 277–292.

Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F.J., 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 115-119.

Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M.C., Dramaix, M., Truyens, C., Carlier, Y., 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. Am J Trop Med Hyg 70, 201-209.

Umezawa, E.S., Bastos, S.F., Coura, J.R., Levin, M.J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., Zingales, B., Luquetti, A.O., da Silveira, J.F., 2003. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. Transfusion 43, 91-97.

Urbina, J.A., 2002. Chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des 8, 287-295.

Urbina, J.A., 2009. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 104 Suppl 1, 311-318.

Urbina, J.A., Docampo, R., 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol 19, 495-501.

Urbina, J.A., Lira, R., Visbal, G., Bartroli, J., 2000. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. Antimicrob Agents Chemother 44, 2498-2502.

Urbina, J.A., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazardi, K., Piras, M.M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P., Ryley, J.F., 1996. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. Science 273, 969-971.

Urbina, J.A., Payares, G., Sanoja, C., Lira, R., Romanha, A.J., 2003a. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Int J Antimicrob Agents 21, 27-38.

Urbina, J.A., Payares, G., Sanoja, C., Molina, J., Lira, R., Brener, Z., Romanha, A.J., 2003b. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. Int J Antimicrob Agents 21, 39-48.

Vago, A.R., Andrade, L.O., Leite, A.A., d'Avila Reis, D., Macedo, A.M., Adad, S.J., Tostes, S., Jr., Moreira, M.C., Filho, G.B., Pena, S.D., 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am J Pathol 156, 1805-1809.

Vago, A.R., Macedo, A.M., Adad, S.J., Reis, D.D., Correa-Oliveira, R., 1996. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. Lancet 348, 891-892.

Vaidian, A.K., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., 2004. Chagas' disease and AIDS. Kinetoplastid Biol Dis 3, 2.

Valadares, H.M., Pimenta, J.R., de Freitas, J.M., Duffy, T., Bartholomeu, D.C., Oliveira Rde, P., Chiari, E., Moreira Mda, C., Filho, G.B., Schijman, A.G., Franco, G.R., Machado, C.R., Pena, S.D., Macedo, A.M., 2008. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. Int J Parasitol 38, 839-850.

Vargas, N., Pedroso, A., Zingales, B., 2004. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. Mol Biochem Parasitol 138, 131-141.

Vauterin, L., Vauterin, P., 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. Eur Microbiol 1, 37-41.

Vazquez, M., Lorenzi, H., Schijman, A.G., Ben-Dov, C., Levin, M.J., 1999. Analysis of the distribution of SIRE in the nuclear genome of *Trypanosoma cruzi*. Gene 239, 207-216.

Viotti, R., Vigliano, C., 2007. Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected 'evidence' by evidence-based medicine. Expert Rev Anti Infect Ther 5, 717-726.

Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., Segura, E., 1994. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. Am Heart J 127, 151-162.

Virreira, M., Martinez, S., Alonso-Vega, C., Torrico, F., Solano, M., Torrico, M.C., Parrado, R., Truyens, C., Carlier, Y., Svoboda, M., 2006. Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg 75, 1082-1084.

Voller, A., Draper, C., Bidwell, D.E., Bartlett, A., 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for chagas' disease. Lancet 1, 426-428.

Westenberger, S.J., Barnabe, C., Campbell, D.A., Sturm, N.R., 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics 171, 527-543.

Wilm, A., Higgins, D.G., Notredame, C., 2008. R-Coffee: a method for multiple alignment of non-coding RNA. Nucleic Acids Res 36, e52.

Wincker, P., Telleria, J., Bosseno, M.F., Cardoso, M.A., Marques, P., Yaksic, N., Aznar, C., Liegeard, P., Hontebeyrie, M., Noireau, F., Morel, C.M., Breniere, S.F., 1997. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. Parasitology 114 (Pt 4), 367-373.

Wisnivesky-Colli, C., Gurtler, R.E., Solarz, N.D., Schweigmann, N.J., Pietrokovsky, S.M., Alberti, A., Flo, J., 1993. Dispersive flight and house invasion by Triatoma guasayana and Triatoma sordida in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 88, 27-32.

Wood, W.I., Gitschier, J., Lasky, L.A., Lawn, R.M., 1985. Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. Proc Natl Acad Sci U S A 82, 1585-1588.

Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G.A., Lopez, E., Gonzalez, N., Patterson, J.S., Gaunt, M.W., de Arias, A.R., Miles, M.A., 2005. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. Int J Parasitol 35, 225-233.

Zaidenberg, M., Segovia, A., 1993. [Congenital Chagas disease in the city of Salta, Argentina]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 35, 35-43.

Zeledon, R., 1974. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. Ciba Foundation Symposium, 20: 51-77.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 104, 1051-1054.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Res 32, e103.

PUBLICACIONES ORIGINALES CON RESULTADOS DE ESTA TESIS