



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Exploración de una nueva proteína para el diagnóstico y
análisis del N-glicoma plasmático en la enfermedad de
Chagas Crónica.**

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

Lic. Micaela Soledad Ossowski

Director de Tesis: Dra. Karina Andrea Gómez

Co-Director de Tesis: Dra. Karina Valeria Mariño

Consejero de estudios: Dr. Guillermo D. Alonso

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología e Inmunología de las Infecciones por Tripanosomátidos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2024

Fecha de Defensa: 12/07/2024

Parte de los resultados expuestos en este trabajo de Tesis, correspondientes al **Capítulo I – Aproximación diagnóstica**, fueron publicados en la revista International Journal of Molecular Sciences el 18 de enero del 2024 bajo el título **“Characterization of Novel *Trypanosoma cruzi*-Specific Antigen with Potential Use in the Diagnosis of Chagas Disease”** (Ossowski, M. S., Gallardo, J. P., Niborski, L. L., Rodríguez-Durán, J., Lapadula, W. J., Juri Ayub, M., Chadi, R., Hernandez, Y., Fernandez, M. L., Potenza, M., & Gómez, K. A, doi:10.3390/ijms25021202)

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a todas aquellas personas, que con su apoyo y colaboración hicieron posible esta Tesis.

Al Estado Argentino que a través del CONICET por proporcionarme los recursos necesarios para poder formarme y realizar investigación científica.

Al INGEBI e IBYME por brindarme el espacio y las condiciones para llevar a cabo el proyecto y no menos importante, permitirme crecer.

A mis directoras, las Karinas. Por confiar en mí para llevar adelante este proyecto, por siempre impulsarme a ser mejor profesional, por brindarme su apoyo incondicional y siempre estar dispuestas a compartir conmigo sus conocimientos. Me llevo siempre sus consejos.

A los Dres. que integran este proyecto: Marisa Fernández, Yolanda Hernández y Raul Chadi. Por su compromiso con los pacientes, por el intercambio mutuo de conocimientos y por ceder su tiempo que permite para poder llevar adelante este trabajo.

A los pacientes. Por confiar en nosotros y donar su sangre. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A Fati, Karen y Arturo, por hacer más fácil mis días científicos. Por las risas, los abrazos, los consejos y la ayuda. Mi día a día siempre es más fácil porque ustedes están.

Al resto de los integrantes del 222, los “viejos”, los “nuevos” y los transitorios por sus mates, las risas, sus consejos y por hacer que el 222 sea un lugar hermoso para trabajar.

A Marian Potenza, Jessi y Juampi, miembros también de LaBIITryp, por ayudarme cada vez que lo necesito, por las risas y los viernes de *Lab meeting* siempre con algo rico para comer.

Al Dr. Fred Luciano Neves Santos y su grupo (especialmente Angelo, Leo, Emily, Ramona, Nati y Rosángela), no sólo por recibirme en su laboratorio con los brazos abiertos, sino por su paciencia, ayuda, por la transmisión de todos sus conocimientos y por hacer más fácil la estancia lejos de casa. Me llevo grandes amigos.

Al Dr. Guillermo Alonso, no sólo por ser mi consejero de estudios sino por siempre donarme y ayudarme con los bichos.

A mis amigos, cada uno de ellos, sin ustedes nada de esto hubiese sido posible. Eternamente agradecida por levantarme en cada caída.

A mi familia, especialmente mis papás, hermanos y sobrinos por ser mi motor y mi sostén todos los días. Por ser lo más importante de mi vida y mi cable a tierra. Los amo hasta el infinito para siempre.

Y por ultimo, pero no menos importante a mi compañero de vida, Rodrigo. Por el amor de todos los días. Por tus abrazos que siempre me tranquilizan el alma. Sabes todo lo que significas para mí.

A cada uno de ellos, ¡Gracias TOTALES!

Índice.....	4
Resumen	10
Abstract.....	13
Abreviaturas.....	15
1. Introducción	19
1.1 Enfermedad de Chagas.....	19
1.1.1 Historia y generalidades.....	19
1.1.2 Agente etiológico y ciclo natural de la infección.	19
1.1.3 Epidemiología, distribución geográfica y vías de transmisión.	21
1.1.4 Heterogeneidad de la población parasitaria.	23
1.1.5 Fases y manifestaciones clínicas.....	24
1.2 Diagnóstico en diferentes escenarios de la ECh.	27
1.2.1 Etapa aguda.....	28
1.2.2 Etapa crónica.....	29
1.3 Estudios de validación de pruebas diagnósticas.	32
1.4 Predicción de la progresión de la enfermedad de Chagas.	35
1.5 Los N-glicanos de plasma como potencial fuente de biomarcadores.....	38
1.6 N-glicosilación: aspectos generales	39
1.7 Desialilación en el proceso inflamatorio	41
2. Antecedentes.....	43
3. Hipótesis y Objetivos.....	47
4. Materiales	49
4.1 Soluciones y medios generales.....	49
4.2 Reactivos comerciales.	51
4.3 Enzimas.....	53
4.4 Antibióticos.	54
4.5 Anticuerpos.	55
4.6 Plásmidos	56
4.6.1 De clonación.....	56
4.6.2 De expresión.	57
4.7 Cepas.....	59
4.7.1 <i>Escherichia coli</i>	59
4.7.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
4.7.3 <i>Leishmania spp.</i>	59

4.8	Línea celular.....	59
5.	Métodos	60
5.1	Reclutamiento de pacientes y obtención de muestra.....	60
5.2	Detección de ADN de <i>T. cruzi</i> y cuantificación de la carga parasitaria en muestras sanguíneas.....	61
5.2.1	Extracción de ADN total de <i>T. cruzi</i>	61
5.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	62
5.3	Preparación de lisados.	63
5.3.1	Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> / Promastigotes de <i>L. tarentolae</i>	63
5.3.2	Tripomastigotes / amastigotes.....	63
5.4	Expresión y purificación del Ac scFv 6B6.....	64
5.5	Obtención del Ac scFv 6B6 como Ac completo o quimera: chim m6B6	65
5.6	Inmunoprecipitación (IP).....	65
5.7	Preparación de células bacterianas competentes.....	66
5.7.1	Competentes químicas.....	66
5.8	Transformación de células bacterianas competentes.....	67
5.9	Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	67
5.9.1	Extracción de ADN genómico de <i>T. cruzi</i> y <i>L. tarentolae</i>	67
5.10	Preparación de ADN plasmídico.	67
5.10.1	Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala o <i>Miniprep</i>	67
5.10.2	Aislamiento de ADN plasmídico a mediana escala o <i>Midiprep</i>	68
5.11	Reacciones en cadena de la ADN polimerasa (PCR).....	68
5.12	Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	69
5.13	Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	69
5.14	Digestión de ADN.....	70
5.15	Cuantificación de los ácidos nucleicos y plásmidos.....	71
5.16	Reacción de ligación.	71
5.17	Clonado de los ORFs.....	71
5.18	Sub-clonado de ORFs.....	73
5.19	Generación de cepas de <i>L. tarentolae</i> recombinantes.....	73
5.19.2	Transfección y selección de parásitos.	74
5.20	Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.	74
5.20.1	Prueba piloto de expresión.....	74
5.21	Obtención de proteínas recombinantes.....	75

5.22	Lisis bacteriana en condiciones desnaturalizantes.....	75
5.23	Purificación de proteínas de fusión a un tag de histidinas por resinas de agarosa Ni-NTA.....	76
5.24	Análisis de proteínas.....	76
5.24.1	Cuantificación de proteínas.....	76
5.24.2	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	77
5.25	Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.....	77
5.25.1	Tinción con reactivo de Coomassie Blue.....	77
5.25.2	Tinción con reactivo de Coomassie Blue compatible con espectrometría de masas.....	77
5.26	Western-Blot (WB).....	78
5.27	Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	78
5.28	Análisis de imágenes.....	79
5.29	Población de estudio.....	79
5.29.1	Dimensionamiento muestral.....	79
5.30	Obtención de paneles serológicos.....	79
5.31	Ensayo Inmuno-enzimático indirecto (ELISA indirecto).....	80
5.31.1	Estandarización de los componentes del ELISA indirecto.....	80
5.32	Expresión y análisis de los resultados.....	81
5.32.1	Determinación de la condición optima.....	81
5.32.2	Determinación del punto de corte (CO).....	82
5.32.3	Normalización de los datos.....	82
5.32.4	Evaluación de parámetros de desempeño.....	83
5.32.5	Cálculo del índice Kappa.....	86
5.32.6	Análisis en serie y paralelo.....	87
5.33	Evaluación del potencial diagnóstico de rTcd3 y rTcd6.....	87
5.33.1	Estudio de Fase I.....	87
5.33.2	Estudio de Fase II.....	87
5.33.3	Reacciones cruzadas.....	88
5.34	Análisis filogenético y predicciones <i>in-silico</i>	88
5.35	Caracterización estructural del N-glicoma de plasma de pacientes con EChc por cromatografía de ultra performance (HILIC-UPLC).....	90
5.35.1	Liberación y derivatización de N-glicanos.....	90

5.35.2	Cromatografía líquida de Ultra Performance de Interacción Hidrofílica (HILIC-UPLC).	90
5.35.3	Cromatografía de Intercambio Aniónico Débil (HPLC-WAX)	91
5.36	Análisis estadístico.....	92
6.	Resultados: Caracterización molecular de la proteína de unión al anticuerpo recombinante scFv 6B6 y validación de su eficacia para el diagnóstico serológico de la EChc.....	93
6.1	Identificación de la proteína de unión al scFv 6B6.	93
6.2	Caracterización de Tc323: aproximación <i>in-silico</i> y análisis experimental.	96
6.2.1	Aproximación <i>in silico</i> : Análisis filogenético y de sintenia de Tc323.....	96
6.2.2	Análisis experimental: Determinación de Tc323 como proteína específica de <i>T. cruzi</i>	99
6.3	Localización subcelular de Tc323.....	102
6.4	Modelado estructural de Tc323.	104
6.5	Clonado y expresión de los dominios estructurales de Tc323.....	106
6.6	Predicción bioinformática de epítopes B en Tc323.	111
6.7	Producción y purificación de los dominios recombinantes D3 y D6	113
6.8	Evaluación del potencial diagnóstico de rTcD3 y rTcD6.....	114
6.8.1	Ensayo de WB.....	114
6.9	Estudio de Fase I.	115
6.9.1	Población de estudio.....	115
6.10	Estandarización de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA	116
6.10.1	Caracterización de paneles serológicos.	119
6.10.2	Rendimiento diagnóstico de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA.	120
6.10.3	Rendimiento diagnóstico de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA según diferentes regiones endémicas para la EChc.	123
6.10.4	Rendimiento diagnóstico de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA en pacientes con distintas formas clínicas de la EChc.	124
6.10.5	Análisis combinatorio de resultados positivos.	126
6.11	Ensayo de ELISA indirecto - Fase II	126
6.11.1	Estandarización de los componentes del ELISA indirecto.	126
6.11.2	Cálculo del tamaño muestral y caracterización de paneles serológicos.	130
6.11.3	Rendimiento diagnóstico de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA – Fase II.	131
6.11.4	Análisis combinatorio de resultados positivos.	134
6.11.5	Análisis de reactividad cruzada.	135

6.12	Determinación del epítipo de reconocimiento del Ac scFv 6B6.	137
7.	Discusión.....	145
8.	Perspectivas	156
9.	Resultados: Exploración del N-glicoma plasmático en búsqueda de nuevos marcadores prognósticos de la EChc.....	158
9.1	Población de estudio.	158
9.2	Análisis del N-glicoma plasmático de individuos con EChc y sujetos no infectados.	158
9.3	Análisis de correlación entre carga parasitaria y abundancia de tetrasialilados (áreas cromatográficas de los picos).....	166
10.	Discusión.....	167
11.	Perspectivas	170
12.	Conclusiones	172
13.	Referencias	174
14.	Apéndice.	196

Exploración de una nueva proteína para el diagnóstico y análisis del N-glicoma plasmático en la enfermedad de Chagas crónica.

Resumen. La enfermedad de Chagas (EC) es una zoonosis potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* que afecta a más de 8 millones de individuos en todo el mundo, especialmente en América Latina. Esta patología presenta una fase aguda generalmente asintomática que, sin tratamiento, progresará a una etapa crónica en la que el 70% de los individuos permanecerá sin manifestaciones clínicas demostrables mientras que el 30% restante presentará mega síndromes gastrointestinales y diversos grados de miocardiopatía. Durante la fase crónica, el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* de tipo IgG debido a la escasa o nula cantidad de parásitos circulantes, aunque el rendimiento de las pruebas serológicas actuales para el diagnóstico de la EC crónica (EChc) es muy variable. Ninguna de ellas constituye por sí misma un ensayo “gold standard” con 100% de sensibilidad y especificidad, por lo que la exploración de nuevos biomarcadores para alcanzar un diagnóstico certero sigue siendo un desafío.

En nuestro laboratorio, gracias a la construcción de bibliotecas de anticuerpos recombinantes a partir de células B de pacientes con la forma cardíaca de la EChc, se obtuvo el anticuerpo de cadena simple (scFv) 6B6 dirigido contra una proteína de alto peso molecular de *T. cruzi*. Esta proteína, aislada por inmunoprecipitación, fue reconocida por plasma de pacientes con EChc, pero no por muestras de individuos no infectados o con leishmaniasis cutánea mediante ensayos de Western-Blot.

En la presente Tesis, mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masa, se identificó al antígeno reconocido por el scFv 6B6 como una proteína de 2983 aminoácidos, no caracterizada hasta ese momento y a la cual se denominó Tc323 (código de acceso **TcCLB.504087.20** en la base de datos TriTrypDB). El análisis filogenético, respaldado por evidencia experimental, demostró que esta proteína está altamente conservada entre las diferentes cepas de *T. cruzi*, y que carece de ortólogos en otros parásitos de importancia sanitaria como *Trypanosoma brucei* y *Leishmania spp.*, lo que implica severos eventos de pérdida en la historia evolutiva de Tc323. En línea con los resultados anteriormente obtenidos, y teniendo en cuenta la imposibilidad de obtener a la proteína de longitud completa de manera recombinante por su tamaño molecular, empleamos un enfoque *in-silico* para predecir la estructura 3D de Tc323 y determinar sus dominios antigénicos. De esta manera, identificamos dos regiones de

Tc323, denominadas D3 (residuos 1369 a 1447) y D6 (residuos 2635-2983), las que se clonaron en un sistema procariótico, se expresaron y purificaron mediante cromatografía de afinidad. La reactividad de rTcD3 y rTcD6 se evaluó mediante ELISA-*in house*, luego de su optimización, empleando plasmas de individuos con EChc con y sin sintomatología clínica, así como individuos no infectados por *T. cruzi* de diferentes regiones endémicas de América Latina (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, México, Paraguay, El Salvador y Estados Unidos). Además, con el objetivo de evaluar la reactividad cruzada, se incorporaron al presente estudio muestras de pacientes con enfermedades infecciosas no relacionadas: dengue, filariasis, hepatitis B, hepatitis C, HIV, HTLV, *Leishmania spp.*, leptospirosis, sarampión, toxoplasmosis, rubéola, esquistosomiasis, estrongiloidiasis, COVID-19 y sífilis. El potencial diagnóstico se validó mediante análisis de curvas ROC. Los parámetros de rendimiento (área bajo la curva (AUC), sensibilidad, especificidad y precisión) mostraron una alta exactitud diagnóstica de ambas moléculas para diferenciar a los individuos seropositivos de los seronegativos.

Por otro lado, la alteración específica del N-glicoma plasmático ha sido asociada a numerosas patologías, y constituye un potencial biomarcador de prognosis para enfermedades inflamatorias crónicas. En función de ello, y dado la ausencia de algún parámetro medible que permita determinar la progresión de la EChc, exploramos el perfil de N-glicoma plasmático de los pacientes sin sintomatología clínica y con diferentes grados de alteraciones cardíacas. Los resultados mostraron que los pacientes cardíacos presentan una alteración en la sialilación de plasma, con una disminución significativa de las estructuras tetrasialiladas en los individuos infectados en comparación con los individuos sin sintomatología clínica y no infectados, donde la abundancia de especies tetrasialiladas correlaciona negativamente con la carga parasitaria en muestras de plasma de los pacientes infectados, independientemente de la sintomatología clínica.

En conjunto, en esta Tesis se abordó un enfoque complementario parásito/huésped, identificando dos dominios antigénicos de la proteína Tc323 con alta capacidad diagnóstica, así como también cambios en la N-glicosilación de proteínas presentes en el plasma de los pacientes con potencial aplicabilidad clínica como biomarcador de prognosis de la EChc.

Palabras claves: Enfermedad de Chagas crónica, antígeno novedoso, diagnóstico, pronóstico, *Trypanosoma cruzi*, reactividad cruzada.

Exploration of a novel protein for the diagnosis and analysis of plasma N-glycome in chronic Chagas Disease.

Abstract. Chagas disease (CD) is a potentially lethal zoonosis caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affecting over 8 million individuals worldwide, particularly in Latin America. This condition typically manifests an asymptomatic acute phase that, without treatment, progresses to a chronic stage where 70% of individuals remain clinically silent, while the remaining 30% develop gastrointestinal mega-syndromes and varying degrees of cardiomyopathy. In the chronic phase, diagnosis relies on detecting anti-*T. cruzi* IgG antibodies due to the low or absent presence of circulating parasites. However, the performance of current serological tests for chronic Chagas disease (CCD) diagnosis is highly variable, lacking a definitive "gold standard" with 100% sensitivity and specificity, posing a challenge for precise diagnosis through exploration of new biomarkers. In our laboratory, by constructing recombinant antibody libraries from B cells of CCD patients with the cardiac form, we obtained the single-chain antibody (scFv) 6B6 targeting a high molecular weight *T. cruzi* protein. This protein, isolated by immunoprecipitation, was recognized by plasma from CCD patients but not by samples from uninfected individuals or those with cutaneous leishmaniasis using Western Blot assays.

In this Thesis, the antigen recognized by scFv 6B6 was identified, through immunoprecipitation and mass spectrometry, as a 2983 amino acid protein named Tc323 (access number **TcCLB.504087.20** in TriTrypDB). Phylogenetic analysis, supported by experimental evidence, demonstrated that Tc323 is highly conserved among different *T. cruzi* strains, lacking orthologs in other clinically significant parasites such as *Trypanosoma brucei* and *Leishmania spp.*, suggesting severe loss events in its evolutionary history. Due to its large molecular size, an *in-silico* approach was employed to predict the 3D structure of Tc323 and identify its antigenic domains, leading to the cloning, expression, and purification of two regions, D3 (residues 1369-1447) and D6 (residues 2635-2983), in a prokaryotic system. The reactivity of rTcD3 and rTcD6 was evaluated by *in-house* ELISA, optimized, and tested against plasma from CCD individuals with and without clinical symptoms, as well as individuals from Chagas-endemic regions in Latin America and those with unrelated infectious diseases. The diagnostic potential was validated using ROC curve analysis. The performance

parameters (area under the curve (AUC), sensitivity, specificity, and accuracy) show high diagnostic accuracy for both molecules in distinguishing seropositive from seronegative individuals.

Furthermore, considering the well described plasma N-glycan alterations described in chronic inflammation, and in the absence of measurable parameters to determine CCD progression, this study explored the plasma N-glycome profile in patients with varying degrees of cardiac involvement and without clinical symptoms. The results showed that cardiac patients present an alteration in plasma sialylation, with a significant decrease in tetrasialylated structures in infected individuals compared to individuals without clinical symptoms and uninfected individuals, where the abundance of tetrasialylated species correlates negatively with the parasite load in plasma samples from infected patients, regardless of clinical symptoms.

In summary, this Thesis explored a complementary parasite/host approach, identifying two antigenic domains of the Tc323 protein with high diagnostic capacity and revealing changes in the N-glycosylation of proteins in the plasma of CCD patients, contributing to a potential clinical applicability as a prognostic biomarker for Chagas disease.

Keywords: Chronic Chagas disease, novel antigen, diagnosis, prognosis, *Trypanosoma cruzi*, cross-reactivity.

Abreviaturas

μF	Microfaradio
μm	Micrometros
μM	Micromolar
2-AB	2-aminobenzamida
2D	Bidimensional
Ac	Anticuerpo
ACC	Precisión
Acs	Anticuerpos
ADA	Adenosina desaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNSat	ADN satélite
Ag	Antígeno
AGP	<i>Acid alpha-1 glycoprotein</i> (α1-glicoproteína ácida)
Ags	Antígenos
Amp^R	Resistencia de ampicilina
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i> (péptido natriurético auricular)
ApoB	Apolipoproteína B
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Ácido siálico
Asn	Asparagina
AUC	<i>Area Under Curve</i> (Área bajo la curva)
BHI	<i>Medio Brain Heart Infusion</i> (Infusión cerebro-corazón)
Bleo^R	Resistencia de bleomicina
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i> (péptido natriurético cerebral)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Seroalbúmina bovina)
bsa	<i>Buried surface area</i>
CCC	Cardiopatía chagásica crónica
CCD	<i>Chronic Chagas disease</i>
CD	<i>Chagas disease</i>
cm	Centímetros
CO	<i>Cut-off</i> (punto de corte)
csp	Cantidad suficiente para
DNTPs	Dideoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DOR	<i>Diagnosis odds ratio</i>
DS	Desvío estándar

DSS	<i>Disuccinimidyl suberate</i> (suberato de disuccinimidilo)
ECA2	Enzima conversiva de la angiotensina 2
ECG	Electrocardiograma
ECh	Enfermedad de Chagas
EChc	Enfermedad de Chagas crónica
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ET-1	Endotelina-1
Fc	Fragmento cristizable
FIL	Filariasis
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
Gal	Galectina
GlcNAc	N-Acetil-glucosamina
GP	<i>Glycan peaks</i> (Picos de glicanos)
h	Horas
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂Od	Agua destilada
HAI	Ensayo de hemaglutinación indirecta
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i> (Cromatografía de interacción hidrófila)
HILIC-FLR	Cromatografía de interacción hidrófila con detección de fluorescencia
HIS	Histidina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidasa de rábano)
HTLV	<i>Human T-cell lymphotropic virus</i> (Virus linfotrópico de células T humanas)
IAC	<i>Internal Amplification Control</i> (Control Interno de Amplificación)
IC	Índice de confianza
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IP	Inmunoprecipitación
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
IR	Índice de reactividad

J	Índice de Youden
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LacNAc	N-Acetil-lactosamina
LB	Medio Luria-Bertani
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> (Cromatografía líquida-espectrometría de masas)
LIT	Medio <i>Liver Infusion Tryptose</i> (Infusión hígado-triptosa)
MeCN	Acetonitrilo
MGATs	N-acetil-glucosaminiltransferasas
MH	Microhematocrito
miARNs	MicroARNs
min	Minutos
mm	Milímetros
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	<i>Overnight</i> (Toda la noche)
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORF	<i>Open reading frame</i> (marco de lectura abierto)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDRs	Pruebas de diagnóstico rápidas
PM	Peso molecular
PNGasa F	N-glicosidasa F
poli-LacNAc	Poli-N-acetil-lactosamina
PSA	<i>Prostatic-specific antigen</i> (antígeno prostático)
qPCR	PCR en tiempo real
RE	Retículo endoplásmico
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i> (característica operativa del receptor)
rpm	Revoluciones por minuto
S/N	<i>Signal-to-noise ratio</i> (Relación señal/ruido)
SAPA	<i>Shed Acute Phase Antigen</i> (antígeno de fase aguda)

scFv	Fragmento variable de cadena simple
SDS	Dodecil sulfato sódico
seg	Segundos
SEN	Sensibilidad
SFB	Suero Fetal Bovino
SPE	Especificidad
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampón Tris-acetato EDTA
TBS	Tampón salino con tris
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TS	Trans-sialidasa
TSSA	<i>Trypomastigote Small Surface Antigen</i> (antígeno pequeño de la superficie del tripomastigote)
TW	Tween-20
U	Unidades
UDTs	Unidades Discretas de Tipificación
UFA	Unidad de fluorescencia arbitraria
UG	Unidades de glucosa
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
V	Volts
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VN	Verdadero negativo
VP	Verdadero positivo
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VR	Verosimilitud
WAX	Cromatografía de intercambio aniónico débil
WB	Western Blot
xg	Fuerza centrífuga x veces mayor a la fuerza gravitacional
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
μL	Microlitro

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Chagas.

1.1.1 Historia y generalidades.

La enfermedad de Chagas (ECh), también conocida como tripanosomiasis americana, es una antroponosis potencialmente mortal causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Fue pioneramente descrita por el médico e investigador brasileño Carlos Chagas en el año 1909, quien identificó el agente causal de la enfermedad, lo asoció a la transmisión por vectores hematófagos (*Triatoma spp.*, entre otros), comprobó su presencia en reservorios domésticos y peridomésticos, y describió el ciclo silvestre. Asimismo, incursionó en las fases aguda y crónica de la enfermedad, iniciando así la descripción de su patogénesis, que aún permanece inconclusa (Coura y Borges-Pereira, 2010a). En Argentina, el Dr. Salvador Mazza confirmó la existencia de casos autóctonos y diagnosticó por primera vez, en 1927, un caso agudo en el país (Ministerio de Salud de la Nación)

A pesar de su descubrimiento hace más de un siglo, esta enfermedad persiste como una afección crónica debilitante que afecta la salud y el bienestar de un gran número de seres humanos. Está íntimamente relacionada al desarrollo socioeconómico de la población, constituyendo la infección parasitaria principal del continente americano, y representando uno de los problemas de salud pública más importantes de América Latina (Lidani *et al.*, 2019)

1.1.2 Agente etiológico y ciclo natural de la infección.

T. cruzi es un protista y parásito intracelular obligado perteneciente al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. *T. cruzi* posee un ciclo de vida complejo, y para completarse requiere de un huésped intermediario invertebrado, el vector insecto hematófago (triatomino) y un hospedero mamífero definitivo. La **Figura 1** esquematiza este ciclo a grandes rasgos.

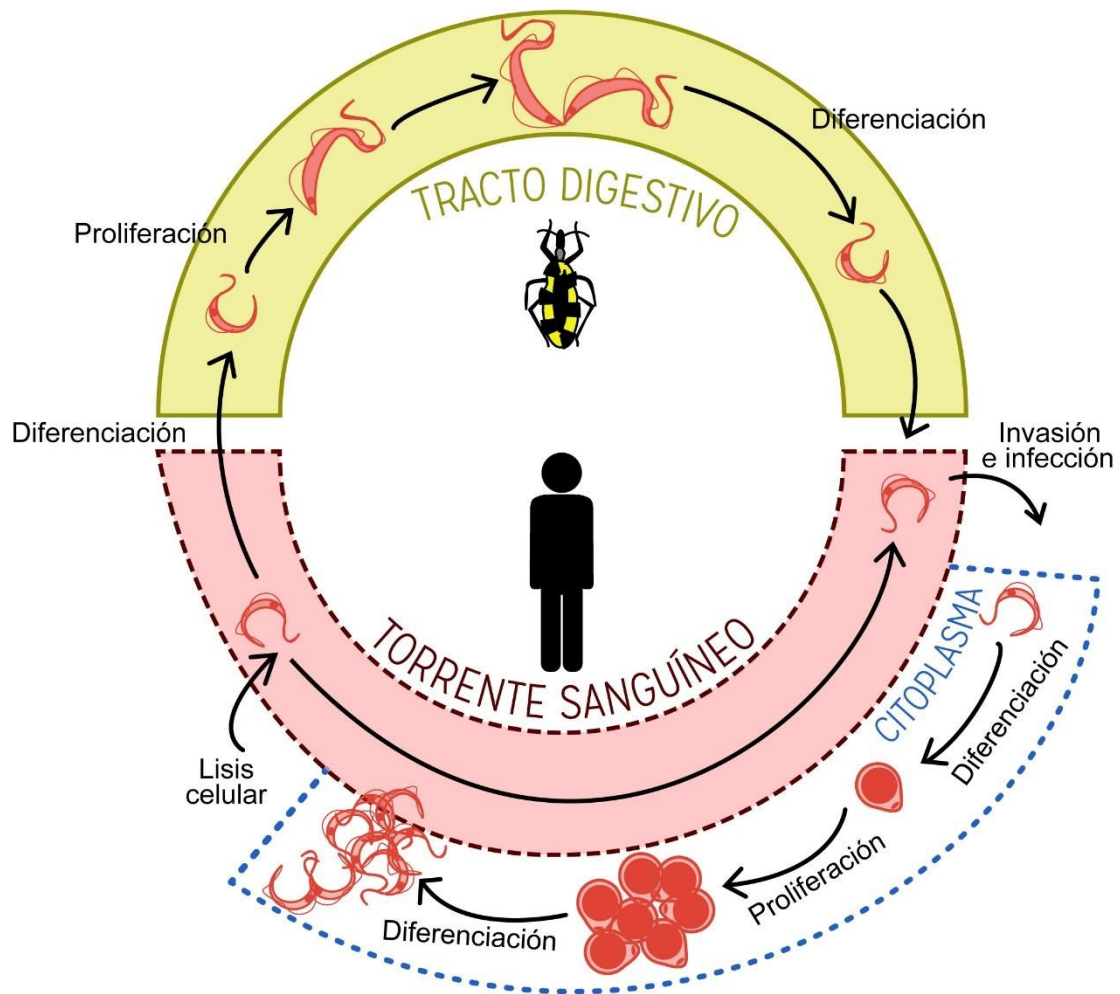


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. El parásito posee tres formas morfológicas claramente diferenciables al microscopio. La forma predominante en el vector es el epimastigote, que es móvil, de baja infectividad y replicativa. En el hospedero mamífero, coexisten dos formas: el tripomastigote (de alta infectividad y movilidad, no replicativo y de vida extracelular), y el amastigote (de baja infectividad y movilidad, replicativo, de vida intracelular). Adaptado de la Tesis doctoral del Dr. Gonzalo R. Acevedo (2018).

Al consumir sangre de un hospedero infectado, el insecto vector adquiere tripomastigotes circulantes (una forma flagelar extracelular no replicativa) que llegan hasta el intestino medio. Allí se diferencian a la forma epimastigotes (forma flagelada replicativa) e inician su replicación por mitosis. La fase siguiente en el ciclo implica ajustes que permiten al parásito abandonar el ciclo replicativo, y dirigirse hacia el intestino posterior del insecto. Allí, se adhiere a través de interacciones hidrofóbicas a la cutícula de la pared del órgano, iniciando así su diferenciación hacia la forma de tripomastigote metacíclico. La herida que genera el insecto al alimentarse permite que estos tripomastigotes penetran en la piel

dañada o las membranas mucosas del huésped, invadiendo sus células y transformándose en amastigote replicantes (forma sin flagelo, intracelular), que se liberan a la circulación nuevamente en forma de tripomastigotes. Esta forma es liberada al torrente sanguíneo cuando la célula del huésped se lisa, pudiendo infectar otras células o ser ingeridos por un triatmino no infectado, culminando así el ciclo (Pérez-Molina y Molina, 2017).

Los tripomastigotes son capaces de invadir una gran variedad de células nucleadas del organismo de un mamífero (Tyler y Engman, 2001). La interacción con la célula a invadir se inicia mediante diversas proteínas de membrana que funcionan como ligandos de componentes de la superficie del parásito. En particular, destacan varios miembros de la superfamilia gp85/trans-sialidasa (TS) (Weinkauf, Salvador y Pereiraperrin, 2011; Walker *et al.*, 2013).

1.1.3 Epidemiología, distribución geográfica y vías de transmisión.

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Chile y Argentina (**Figura 2**), y afecta a 21 países de Latinoamérica (Pérez-Molina y Molina, 2017), con mayor prevalencia en Bolivia, Venezuela y Argentina (Gómez-Ochoa *et al.*, 2022). En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen entre 6 y 8 millones de personas infectadas, más de 75 millones en riesgo de adquirir la enfermedad, 30.000 nuevos casos por año y 10.000 fallecimientos anuales (de Sousa *et al.*, 2023; World Health Organization (WHO), 2023).

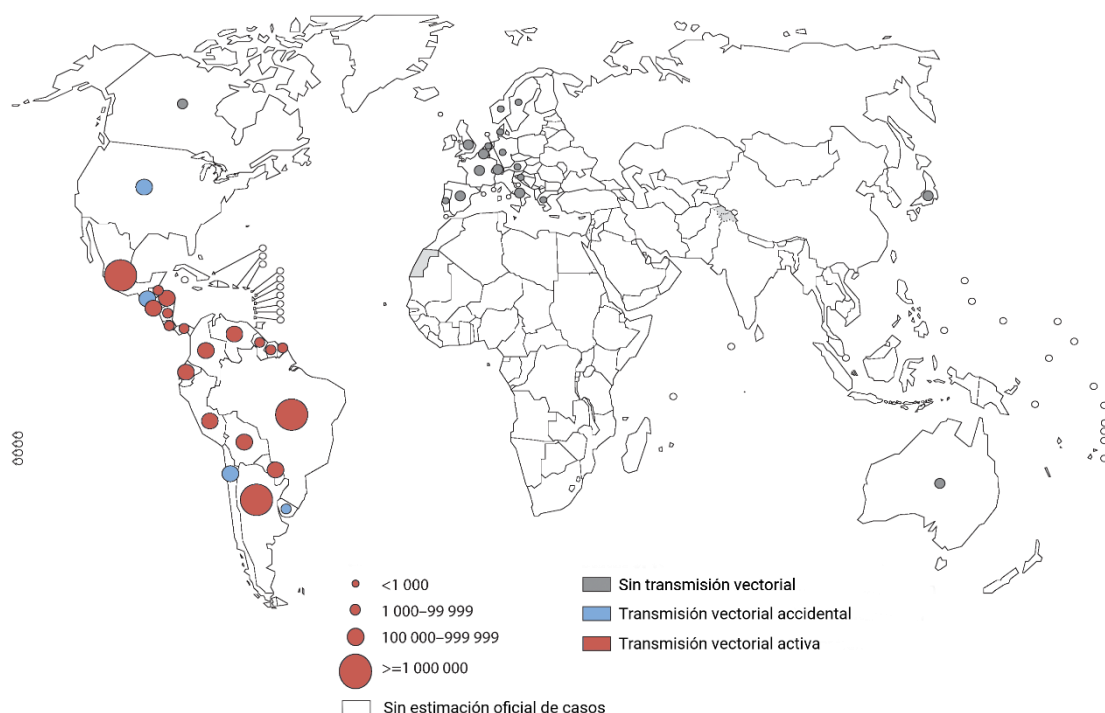


Figura 2. Distribución global de casos de enfermedad de Chagas, según estimaciones oficiales, período 2006-2015 (World Health Organization (WHO), 2017).

La transmisión de *T. cruzi* a través de sus vectores naturales es aún el mecanismo más importante de infección humana en las zonas endémicas. Los vectores responsables de la propagación de la enfermedad pertenecen a la familia *Reduviidae* y, en la región del Cono Sur, la especie más significativa es *Triatoma infestans*, popularmente conocida como Vinchuca (Schofield, 1981). Producto de la ingesta sanguínea, este insecto ocasiona la infección a través del contacto de sus heces, que contienen los parásitos, con la piel ulcerada del hospedero (Rabinovich *et al.*, 1990).

En las últimas décadas, además de la vía vectorial, existen otras formas de transmisión de *T. cruzi* que han cobrado una mayor relevancia tanto en regiones endémicas como no endémicas. Estas modalidades abarcan la transmisión de madres infectadas a los hijos (transmisión congénita), el contagio por transfusión de sangre o por trasplante de órganos provenientes de personas (transmisión sanguínea) infectadas, los accidentes de laboratorio, y la ingesta de comida o bebida contaminada con el parásito (transmisión oral) (de Sousa *et al.*, 2023). Esta última forma de transmisión, denominada Chagas oral, si bien es poco usual, es responsable de brotes regionales de infección aguda en áreas desprovistas de

insectos vectores domiciliados, principalmente en la región amazónica (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012; de Noya *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2019). Estos brotes tienen en común la gravedad de la enfermedad, provocando miocarditis aguda con consecuencias fatales para el paciente, siendo su alta letalidad una de sus características más relevantes (Sánchez y Ramírez, 2013).

Dado que actualmente no se dispone de vacunas efectivas ni de drogas adecuadas para la prevención de la ECh, el control vectorial, así como la detección temprana de la enfermedad y el consecuente tratamiento con drogas antiparasitarias, han sido los métodos más efectivos para prevenir sus consecuencias en América Latina. En la **Figura 3** se resumen las vías de transmisión de la infección de relevancia epidemiológica.

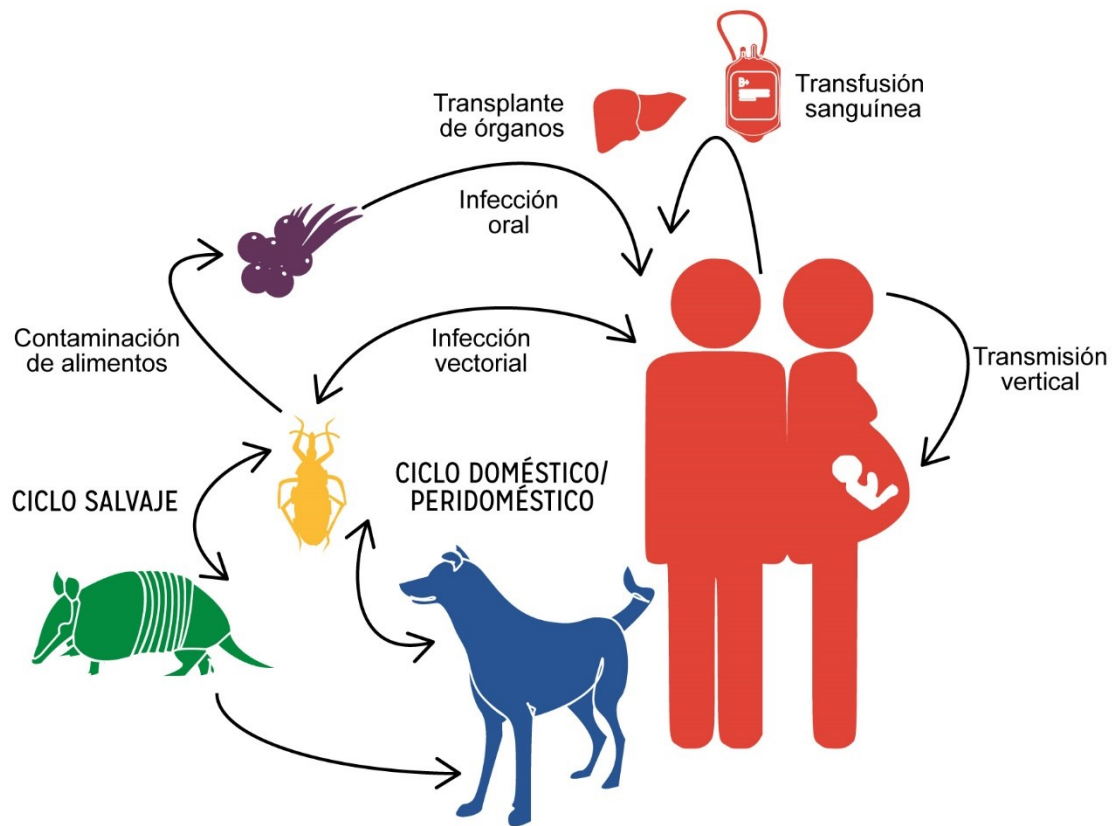


Figura 3. Vías más frecuentes de transmisión de *T. cruzi*. Adaptado de la Tesis doctoral del Dr. Gonzalo R. Acevedo (2018).

1.1.4 Heterogeneidad de la población parasitaria.

T. cruzi presenta una alta diversidad genética lo que llevó a su clasificación en grupos llamados unidades discretas de tipificación (UDTs). Las UDTs se definen

como “conjuntos de poblaciones que están genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra población y que son identificables mediante marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes” (Tibayrenc, 1998). Hasta el momento, se caracterizaron seis UDTs, llamadas TcI- TcVI, a las que recientemente se les agregó la Tcbat, aislada de murciélagos en Panamá y Colombia (Pinto *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2014) y de la cual aún restan estudios epidemiológicos (Zingales y Macedo, 2023). La diversidad genética hallada entre estas UDTs está estrechamente relacionada con la distribución geográfica, la patogénesis, las características clínicas de la infección desarrollada y la sensibilidad a las drogas tripanocidas (Altcheh y Freilij, 2019; Zingales y Macedo, 2023).

1.1.5 Fases y manifestaciones clínicas.

El curso clínico de la ECh, independientemente de la vía de transmisión, comprende dos fases bien diferenciadas. La primera de ellas, la fase aguda, presenta un período de incubación de 1-2 semanas y se caracteriza por una reacción inflamatoria aguda, alta parasitemia inicial y un curso clínico corto. Su duración oscila entre 4-8 semanas y suele ser clínicamente asintomática. No obstante, cuando los síntomas se manifiestan, luego de 7 a 10 días tras la primoinfección (Barrett *et al.*, 2003), estos suelen ser leves e inespecíficos tales como fiebre, edema localizado o generalizado, dolor de cabeza y malestar general. En un pequeño porcentaje de pacientes, la infección aguda se caracteriza por inflamación en el lugar de la inoculación: el Chagoma patognomónico (absceso cutáneo *de T. cruzi*) o el signo de Romana (conjuntivitis unilateral e hinchazón indolora de los párpados superiores e inferiores) (Bern, 2015). La fase aguda suele tener una evolución autolimitada, y llega a su conclusión cuando el sistema inmunológico reduce el número de tripomastigotes circulantes. Si se trata adecuadamente tiene altas posibilidades de curación, especialmente en niños y recién nacidos.

Sin embargo, si la persona no es tratada con las drogas antiparasitarias disponibles, permanece infectada, la parasitemia desciende paulatinamente y se instaura lo que se conoce como fase crónica de la enfermedad de Chagas (EChc) (A. Prata, 2001; Coura y Borges-Pereira, 2010b). Durante esta etapa, entre el 60% y el 70% de las personas infectadas con *T. cruzi* nunca desarrollarán signos o síntomas

de la EChc, manteniendo el electrocardiograma (ECG) y radiografía del tracto gastrointestinal sin alteraciones (A. Prata, 2001). De esta forma representan la llamada forma crónica sin sintomatología demostrable (asintomática o indeterminada) de la ECh, identificada únicamente mediante serología reactiva (IgG) y caracterizada por un pronóstico similar al de poblaciones no infectadas (Bocchi *et al.*, 2017; Pérez-Molina y Molina, 2017). No obstante, en el 30% al 40% de los individuos infectados, esta forma progresará a una enfermedad clínicamente manifiesta décadas después de la infección inicial. Las alteraciones clínicas de esta etapa están estrechamente relacionadas al daño de órganos específicos, particularmente el corazón, el esófago y el colon que se agrupan en las tres formas principales de la enfermedad: cardíaca, digestiva y cardio-digestiva o mixta (A. Prata, 2001; Coura y Borges-Pereira, 2010b; Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010). La forma cardíaca o cardiopatía Chagásica crónica (CCC) es la manifestación clínica más importante de la EChc debido a la frecuencia con la que se desarrolla y su gravedad, morbilidad y mortalidad (de Andrade *et al.*, 2011). Esencialmente, se presenta como una cardiomiopatía dilatada, en la cual un estado crónico de inflamación, generalmente de intensidad moderada pero persistente, conduce de manera progresiva al daño y al desarrollo de fibrosis en el tejido cardíaco (Andrade, Gollob y Dutra, 2014). La CCC se manifiesta siendo una enfermedad compleja que incluye un amplio espectro de manifestaciones, que van desde afectación miocárdica menor hasta disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, miocardiopatía dilatada, arritmias, eventos tromboembólicos e insuficiencia cardíaca terminal (Echavarría *et al.*, 2020). La presentación clínica temprana de la CCC es leve, frecuentemente asociada a alteraciones sintomáticas detectadas en el ECG o en estudios complementarios (Marin-Neto *et al.*, 2007). Posteriormente, pueden evidenciarse alteraciones en la conducción, más frecuentemente la combinación de bloqueo completo de rama derecha y bloqueo fascicular anterior izquierdo, y contracciones ventriculares prematuras (Viotti *et al.*, 2005). En estadios más avanzados de la CCC, se detecta dilatación del ventrículo izquierdo y deterioro de la función sistólica, ambas manifestaciones comunes a todas las cardiomiopatías dilatadas (Ribeiro *et al.*, 2012).

La manifestación gastrointestinal es una complicación menos frecuente en los pacientes con EChc, ocurriendo en el 10 al 20% de los casos, y caracterizándose por el agrandamiento del esófago y/o el colon. Se observa mayoritariamente en la población distribuida al sur de la cuenca del Amazonas (A. Prata, 2001; World Health Organization, 2002), y es rara en el norte de Sudamérica, Centroamérica y México (de Rezende y Luquetti, 1994). Las manifestaciones digestivas involucran principalmente al megaesófago y al megacolon, aunque se pueden encontrar anomalías del sistema nervioso entérico a lo largo de todo el intestino (De Oliveira *et al.*, 1998; Matsuda, Miller y Evora, 2009), como trastornos de la motilidad del tubo digestivo y acalasia leve.

La forma mixta, es decir la combinación de manifestaciones cardíacas y gastrointestinales es la menos frecuente, ocurriendo sólo en un 5 a un 20% de los pacientes con CCC (Pérez-Molina y Molina, 2017).

Las fases clínicas de la ECh se resumen en la **Figura 4**.

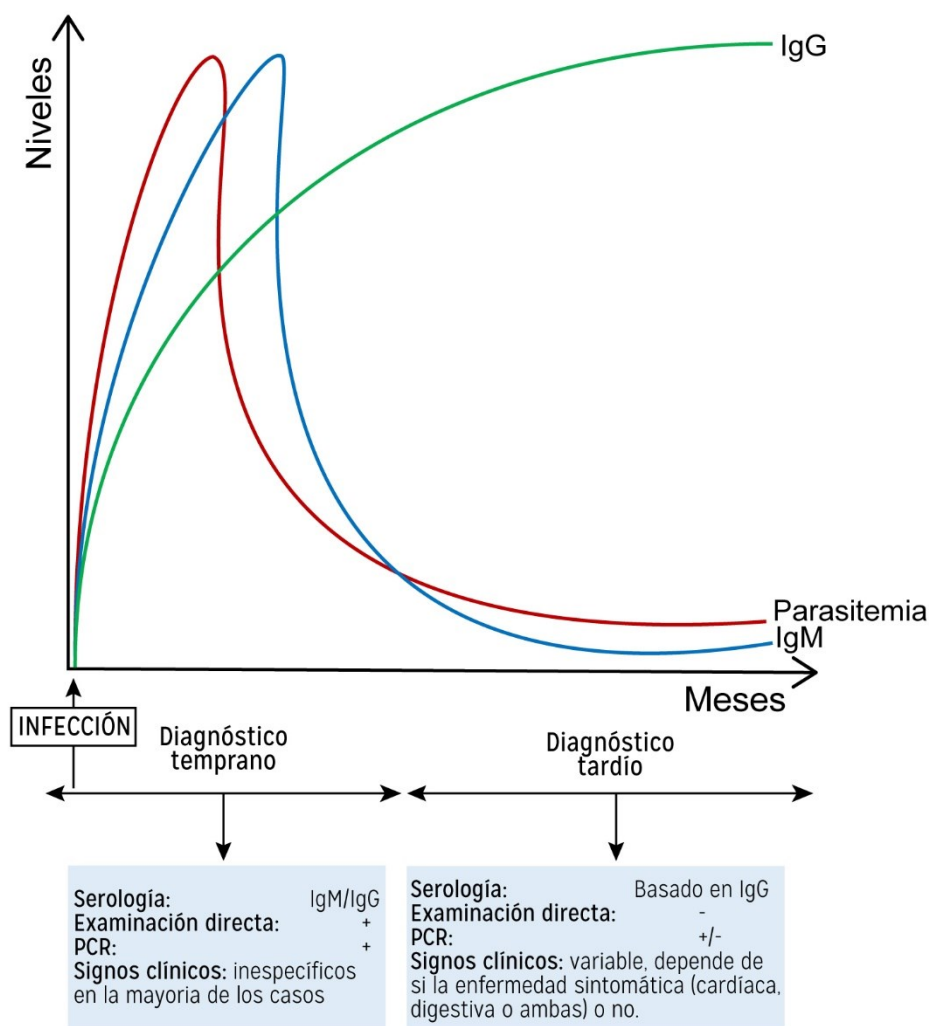


Figura 4. Curso natural de la infección por *T. cruzi*. Adaptado de Ribeiro A. *et al.*, (2024).

1.2 Diagnóstico en diferentes escenarios de la ECh.

La modalidad evolutiva, la etiopatogenia y la historia natural de la ECh son elementos cruciales que influyen en la relevancia de los métodos de laboratorio para su diagnóstico preciso. Se estima que aproximadamente un 5% de los individuos infectados por vía entomológica manifiestan síntomas clínicos durante la etapa aguda de la enfermedad, lo que facilita su detección. El resto de las personas infectadas evoluciona hacia la cronicidad, convirtiéndose así en reservorios potenciales del parásito (Freilij y Storino, 1994).

1.2.1 Etapa aguda.

Como se mencionó anteriormente, tras la infección por *T. cruzi*, los pacientes transitan por una fase aguda que se prolonga durante 40 a 60 días, la cual suele ser típicamente asintomática u oligosintomática, lo que a menudo induce a error en su reconocimiento clínico (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010). En raras ocasiones se puede determinar el sitio de inoculación del parásito a través de sus dos manifestaciones cutáneas: el Chagoma o el signo de Romana (Rangel-Gamboa *et al.*, 2019). Ante este hecho, los médicos deben complementar los hallazgos clínicos con datos epidemiológicos, como casos previamente diagnosticados en la misma área y la presencia de triatominos en los hogares o alrededores. En el laboratorio, y dada la presencia de parásitos en la sangre durante esta fase inicial, la microscopía convencional (que implica la visualización de tripomastigotes circulantes en frotis de sangre periférica o frotis de capa leucocitaria) sigue siendo el método de diagnóstico estándar, tanto para casos agudos como para recién nacidos infectados congénitamente (Freilij y Altcheh, 1995; Gomes, Lorena y Luquetti, 2009). Las pruebas directas o de concentración, como el microhematocrito (MH) o la prueba de Strout, son comúnmente utilizadas para este propósito. Sin embargo, estas técnicas tienen ciertas limitaciones en términos de sensibilidad (~80-90%) y generalmente requieren personal altamente capacitado (Schijman *et al.*, 2021).

Los métodos de diagnóstico indirectos se fundamentan en la observación de la proliferación de parásitos en animales (xenodiagnóstico) o sistemas de cultivo *in vitro* (hemocultivo) (Oliveira *et al.*, 1993; Luquetti y Rassi, 2000). Si bien no brindan un diagnóstico específico para la fase aguda, se observa que el número de parásitos recuperados es mayor en comparación con la fase crónica, además de mostrar positividad temprana cuando el material biológico se recolecta de diez a quince días post-infección. No obstante, su sensibilidad es variable (~20%) y depende también en gran medida de las habilidades y experiencias del operador (Cerisola *et al.*, 1971).

En los últimos años, la detección de ADN del parásito mediante la reacción de PCR se ha convertido en una alternativa atractiva para el diagnóstico de la ECh durante esta fase, principalmente por superar la baja sensibilidad de los ensayos parasitológicos directos (Schijman *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2013). Sin embargo, la

implementación clínica de técnicas basadas en PCR presenta varios desafíos dados principalmente por factores técnicos y operativos (Schijman *et al.*, 2011). Los reactivos utilizados así como los equipos necesarios hacen que estas pruebas no sean factibles en áreas con infraestructura limitada, teniendo que ser derivadas a laboratorios de mayor complejidad. A pesar de ello, el diagnóstico molecular es útil en determinados escenarios, tales como: la detección temprana por la transmisión congénita en recién nacidos, el seguimiento por reactivación del parásito en pacientes inmunodeprimidos o pacientes con miocardiopatía chagásica avanzada que han recibido un trasplante de corazón o pacientes que han recibido un órgano de un donante *T. cruzi* positivo y en algunos casos, en la evaluación de nuevos tratamientos en ensayos clínicos (Alonso-Padilla *et al.*, 2017).

1.2.2 Etapa crónica.

Después de la fase aguda inicial, en ausencia de intervención terapéutica, los pacientes avanzan hacia la EChc, una etapa que puede persistir de manera indefinida (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010). Durante este periodo, el diagnóstico parasitológico directo, así como métodos de detección basados en técnicas moleculares presentan una sensibilidad limitada (Brasil *et al.*, 2010; Schijman *et al.*, 2011) debido a la mínima o nula parasitemia. Así dado que los pacientes muestran una seroconversión temprana tras la infección, la identificación de Ac IgG anti-*T. cruzi* sigue siendo el método más eficaz para evidenciar la exposición directa al parásito (Gomes, Lorena y Luquetti, 2009). En la actualidad, los métodos serológicos convencionales más utilizados son el ensayo de hemaglutinación indirecta (HAI) (Cerisola *et al.*, 1971), inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Stagno y Hurtado, 1971) y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Entre ellas, esta última es la prueba de elección debido a su facilidad de ejecución, bajo costo, posibilidad de automatización y prueba de varios individuos al mismo tiempo (Gomes *et al.*, 2009). No obstante, a pesar de que estas pruebas son sensibles, su desarrollo a partir de preparaciones crudas de antígenos de *T. cruzi* le otorga una baja especificidad, debido principalmente a la posibilidad de reacción cruzada con Ac desarrollados por infección con *Leishmania spp.* o *T. rangeli* (Caballero *et al.*, 2007). Además, las condiciones de cultivo de parásitos y los protocolos de purificación de Ag son

difíciles de estandarizar y, por lo tanto, a menudo dan lugar a variaciones entre diferentes lotes. En un intento por mejorar el diagnóstico serológico de la ECh y evitar los problemas de especificidad de los ensayos y de obtención de Ags, técnicas moleculares, como la clonación y expresión de genes, y la síntesis *in vitro* de péptidos derivados de proteínas de *T. cruzi* permitieron la identificación y caracterización de varios Ags inmunodominantes de *T. cruzi* (Ibañez, Affranchino y Frasch, 1987; Lafaille *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1989; Cotrim *et al.*, 1990; Burns *et al.*, 1992; Houghton *et al.*, 1999), muchos de los cuales se encuentran actualmente en uso (**Tabla 1**). Entre las proteínas recombinantes, las que presentan mejores resultados, en términos de diagnóstico certero, son las proteínas citoplasmáticas CRA/JL8, el antígeno de superficie de tripomastigote B13/Ag2, proteínas de la familia de transialidasa (TS/SAPA), proteínas de citoesqueleto (FRA/JL7), proteínas asociadas a microtúbulos (MAP/JL9), proteínas ribosomales (JL5) y flagelares. Es importante mencionar que varias de estas proteínas, al ser halladas en diferentes laboratorios, poseen diferente nomenclatura, lo que ha llevado a confusiones que aún hoy persisten (Frasch *et al.*, 1991; Da Silveira *et al.*, 2001).

Antígeno	Descripción	Aplicación diagnóstica
CRA / Ag30 / JL8 / TCR27	Antígeno citoplasmático	Infección crónica Formas digestivas
FRA / Ag1 / JL7 / H49	Proteína asociada al citoesqueleto	Infección crónica Formas digestivas
B13 / Ag2 / TCR39 / PEP2 / TSSA	Proteína de superficie de tripomastigote	Infección crónica
Ag36 / JL9 / MAP	Proteína asociada a microtúbulo	Infección aguda / crónica
SAPA / TCNA / TS	Proteínas de la familia de TS	Infección aguda / crónica
FcaBP / 1F8 / Tc-24 / Tc-28	Proteína flagelar de unión a Ca^{2+}	Infección crónica / formas cardíacas
TcE / JL5 / TcP0	Proteínas ribosomales	Infección crónica / monitoreo de drogas
cy-hsp70 / mt-hsp70 / grp-hsp78	Proteínas de shock térmico	Infección crónica / monitoreo de drogas
FL160 / CEA / CRP	Proteínas asociadas a la superficie del flagelo	Infección crónica / monitoreo de drogas
16 antígenos de <i>T. cruzi</i> , SAPA, Ag 1, 2, 13, 30, 36, KMP11, HSP70, PFR2, Tgp63	Antígenos usados en paneles	Monitoreo de drogas

Tabla 1. Diferentes antígenos de uso diagnóstico. Grupos de antígenos o péptidos similares con diferente nomenclatura. Abreviaturas: CRA: antígeno citoplasmático repetitivo; FRA: antígeno repetitivo flagelar; MAP: proteína asociada a microtúbulo; SAPA: antígeno de fase aguda; CEA: antígeno de fase crónica; CRP: proteína regulatoria de complemento; cy-hsp: proteína citoplasmática de fase aguda; grp-hsp: proteína endoplasmática de fase aguda; mt-hsp: proteína mitocondrial de fase aguda; TCNA: neuraminidasa de *T. cruzi*; TS: transialidasa; TSSA: antígeno pequeño de la superficie del tripomastigote (Schijman *et al.*, 2021)

Una de las ventajas clave de los ensayos de ELISA de última generación, los cuales emplean antígenos recombinantes, es que ayudan a mitigar los problemas de especificidad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta mejora viene acompañada de una menor sensibilidad en comparación con las técnicas que utilizan parásitos completos. Para abordar este problema, se ha explorado el uso de combinaciones de antígenos, así como nuevas metodologías de revelado de la reacción antígeno-anticuerpo, como las micropartículas quimioluminiscentes (Abrás *et al.*, 2016; Granjon *et al.*, 2016). Sin embargo, un metaanálisis de las pruebas actualmente disponibles indicó que existe una heterogeneidad significativa en las sensibilidades y especificidades informadas de los ensayos serológicos de diagnóstico (Sánchez-Camargo *et al.*, 2014). La sensibilidad general en 18 estudios y 61 ensayos fue del 90% con una especificidad general del 98%, lo que indica que las

especificaciones de rendimiento de los ensayos serológicos existentes fueron inferiores a lo que se pensaba previo a este estudio de metaanálisis. Por lo tanto, aunque las pruebas de diagnóstico disponibles en la actualidad se caracterizan por su simplicidad, asequibilidad y capacidad para ofrecer resultados sólidos en términos de diagnóstico a nivel poblacional en gran escala, ninguna de ellas es considerada un ensayo *gold standard* con 100% de sensibilidad y especificidad. Todas ellas presentan, en mayor o menor medida, ciertas limitaciones en relación con su reproducibilidad, confiabilidad, especificidad y sensibilidad, lo cual en conjunto atenta contra un diagnóstico seguro. Asimismo, pueden presentarse resultados discordantes debido a la amplia diversidad genética de *T. cruzi* en distintas áreas geográficas o a variaciones en las respuestas inmunes humanas locales (Caballero *et al.*, 2007; Guzmán-Gómez *et al.*, 2015; V. Balouz *et al.*, 2017). En este contexto, las directrices actuales establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomiendan el uso de al menos dos pruebas serológicas basadas en diferentes principios para llegar a un diagnóstico fehaciente (PAHO, 2018; WHO, 2020), requiriéndose una tercera técnica en casos de resultados no concluyentes. En resumen, la falta de una prueba precisa para diagnosticar la EChc no sólo aumenta los costos y el riesgo de perder pacientes, especialmente en áreas endémicas, sino que además retrasa el seguimiento y el tratamiento precoz.

1.3 Estudios de validación de pruebas diagnósticas.

La utilidad de una prueba diagnóstica se basa en varios factores clave, incluyendo su reproducibilidad, precisión, viabilidad y su impacto en la toma de decisiones clínicas (Newman *et al.*, 2013). Para respaldar esta utilidad, se emplean parámetros de desempeño establecidos, los cuales son calculados mediante métodos estadísticos específicos (Gogtay y Thatte, 2017b, 2017a; Santini, Man y Voidăzan, 2021). En el caso particular del diagnóstico serológico, los parámetros a determinar son aquellos relacionados con el éxito de la prueba para identificar correctamente una determinada condición en individuos que efectivamente la padecen, independientemente de la presencia o ausencia de sintomatología. Y, de igual modo, es crucial que la prueba no identifique erróneamente a personas que no

tienen la condición. Por lo tanto, el diseño del estudio debe responder a cuatro interrogantes fundamentales, que a su vez representan las cuatro fases del diseño de un estudio de validación de métodos (Sackett y Haynes, 2002; Haynes *et al.*, 2006).

1. ¿Puede la prueba distinguir entre individuos positivos y negativos?
2. ¿La prueba tiende a dar resultados positivos con mayor frecuencia en individuos con la enfermedad?
3. ¿Cuál es la precisión de la prueba para identificar a los individuos sospechosos de portar la enfermedad dentro de la población?
4. ¿La prueba ofrece algún beneficio para mejorar el estado de salud de las personas afectadas por la enfermedad?

La Fase I de la prueba diagnóstica, conocida como fase exploratoria, tiene como principal objetivo validar si la misma es capaz de diferenciar a los individuos que padecen una condición de los que no. Realizar un estudio piloto (o prueba de concepto) con un tamaño de muestra pequeño es suficiente para responder a esta pregunta. Este tipo de estudio es fundamental ya que, en caso de obtener un resultado negativo, se evita invertir recursos económicos y tiempo en fases posteriores. Las muestras utilizadas en el estudio piloto deben estar bien caracterizadas desde el punto de vista serológico, conteniendo muestras negativas de individuos provenientes de áreas endémicas y no endémicas y muestras positivas representativas de la enfermedad, es decir, de individuos asintomáticos y sintomáticos con los síntomas más variados posibles, así como de distintos grados de evolución clínica de la enfermedad. Asimismo, es importante excluir aquellos sujetos que presentan sospechas, pero sin certezas de tener la enfermedad (Rendón-Macías y Villasís-Keever, 2020). De esta manera, la Fase I permite saber si la prueba es lo suficientemente fiable como para iniciar la Fase II del estudio.

La Fase II pretende evaluar si la prueba tiene más probabilidades de dar resultados positivos en individuos con la enfermedad que en aquellos que no la tienen, y viceversa. Esta Fase se lleva a cabo mediante un estudio de casos y controles, en el que los protocolos utilizados deben estar bien definidos, delineándose los criterios de inclusión y exclusión de muestras/individuos, controlando así las variaciones y distorsiones (sesgos) en la selección (Whiting *et al.*,

2015). Además, el número de muestras debe estar determinado mediante estimadores estadísticos, teniendo en cuenta los parámetros de rendimiento requeridos para la prueba. De manera similar a la Fase I, las muestras positivas deben ser representativas de la enfermedad y las muestras negativas seleccionadas de personas que residen en áreas endémicas y no endémicas. Las muestras de personas sospechosas de portar la enfermedad aún no deberían formar parte del muestreo (Rendón-Macías y Villasís-Keever, 2020).

En la Fase III, el objetivo es analizar el rendimiento de una prueba utilizando muestras de personas sospechosas o no de tener la enfermedad. A diferencia de las Fases I y II, en este caso se trata de un estudio prospectivo, en el cual se desconoce el estado serológico de los individuos, ya que no se le han realizado pruebas de referencia. Los parámetros de rendimiento obtenidos se pueden comparar con los obtenidos de pruebas disponibles comercialmente. No obstante, si la enfermedad es de baja prevalencia, el tamaño de la muestra puede hacer que el estudio sea inviable. Sin embargo, una ventaja de su uso es la posibilidad de determinar dos parámetros de rendimiento que no podrían conocerse hasta esta etapa: los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN). Estos parámetros sólo deben determinarse cuando se utilizan muestras con serología desconocida, de lo contrario los valores predictivos tendrán resultados distorsionados y conclusiones erróneas sobre la realización de las pruebas (Díaz-García *et al.*, 2019; Shreffler y Huecker, 2020).

Finalmente, sigue el estudio de Fase IV, cuyo objetivo es medir el impacto de la introducción de la prueba en función de la mejora o empeoramiento de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad y el gasto asociado a su introducción. Permite determinar si los individuos sometidos a la nueva prueba experimentan algún beneficio en comparación con aquellos que no la reciben, a través de ensayos aleatorizados (Mishra *et al.*, 2019).

Fase	Objetivo principal
I	Establecer valores de referencia.
II	Analizar la validez de la prueba.
III	Analizar el impacto de su incorporación en intervenciones diagnósticas-terapéuticas
IV	Analizar los efectos a largo plazo de la incorporación de la prueba.

Tabla 2. Fases de desarrollo de las pruebas diagnósticas.

1.4 Predicción de la progresión de la enfermedad de Chagas.

Tal como se ha mencionado previamente, se estima que aproximadamente el 30% al 40% de los pacientes infectados por *T. cruzi* progresarán hacia las etapas sintomáticas de la enfermedad, que involucran tejido cardíaco y/o digestivo, con consecuencias potencialmente fatales (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010). Esta afectación de órganos no ocurre inmediatamente, sino que se observa después de varios años de latencia clínica (Pérez-Molina y Molina, 2017). Hasta el momento, continúa siendo un desafío relevante identificar, a través de biomarcadores sensibles y rápidos, a los sujetos con EChc sin sintomatología quienes progresarán hacia la forma sintomática de la enfermedad, para promover un adecuado seguimiento e intervenciones terapéuticas oportunas. Por lo tanto, varias investigaciones han puesto sus esfuerzos en identificar marcadores bioquímicos de daño cardíaco, digestivo y/o inflamación asociada a la ECh. Aunque se han hallado varios biomarcadores de valor pronóstico que muestran un aumento proporcional a la gravedad del daño (Pinazo *et al.*, 2015), la mayoría de ellos no son capaces de distinguir de manera precisa entre la sintomatología causada por la ECh de otras condiciones patológicas (Okamoto *et al.*, 2014).

Los péptidos natriuréticos (cerebrales y auriculares, ANP y BNP, respectivamente) son algunos de los marcadores mejor caracterizados para evaluar el daño cardíaco temprano y predecir el resultado de la insuficiencia cardíaca. Estos se liberan en condiciones de estrés miocárdico, y se ha demostrado que aumentan en pacientes con miocardiopatía asociada a la ECh (Ribeiro *et al.*, 2002; Talvani *et al.*, 2004), además de correlacionarse con su pronóstico clínico (Moreira *et al.*, 2008). En la misma línea, Wang *et al.*, (2010) demostró que niveles más altos de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) se correlacionan con la gravedad clínica y el

empeoramiento de los parámetros ecocardiográficos en pacientes con ECh. Más importante aún, ya que la evaluación conjunta de los niveles de BNP y la actividad ECA2 demostró un valor predictivo positivo superior en comparación con su análisis individual, los autores alentaron el uso de ambos marcadores para predecir desenlaces fatales. Finalmente, también se ha estudiado ampliamente el papel de la endotelina-1 (ET-1) como marcador pronóstico de la patogénesis inducida por *T. cruzi* (Corral *et al.*, 2013; Freeman *et al.*, 2014), aunque no se ha avanzado en la comprobación de estos hallazgos.

Asimismo, dado que la presencia de un ambiente inflamatorio es una característica común de las alteraciones del tejido cardíaco y/o digestivo, también se ha estudiado el valor pronóstico de los marcadores bioquímicos del huésped involucrados en este tipo de procesos. Por ejemplo, varios estudios han evaluado a la proteína C reactiva y la enzima adenosina desaminasa (ADA) como marcadores de la progresión de la ECh debido a que sus niveles aumentaron linealmente en relación con la gravedad de la patología (López *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2010; Bravo-Tobar *et al.*, 2015). Notablemente, los niveles de lectinas (proteínas evolutivamente conservadas para reconocer glicanos en glicoconjugados) con capacidad inmunomoduladora fueron también evaluados: un trabajo realizado por Giordanengo y su grupo (2001) evaluó la presencia de Acs anti-galectina (Gal) 1 (Gal-1), una proteína de expresión ubicua que se ha encontrado en los tejidos de corazón humano y que posee mayoritariamente propiedades inflamatorias. Los autores hallaron que una inmunorreactividad de tipo IgG contra Gal-1 se correlacionaba con la gravedad del daño cardíaco en la etapa crónica de la ECh, pero estaba ausente en miocardiopatías no relacionadas (Giordanengo *et al.*, 2001). En línea con lo anterior, también se han encontrado niveles elevados de Gal-3 en el plasma de pacientes con CCC en comparación con pacientes con ECh asintomática (Menezes *et al.*, 2024). También se encontró que Gal-9 estaba regulada positivamente en fragmentos de biopsia de colon de pacientes con EChc que presentaban megacolon (Beghini *et al.*, 2017).

Finalmente, en los últimos años, se ha propuesto el estudio de los microARNs (miARNs) plasmáticos como marcadores potenciales de progresión (Linhares-

Lacerda *et al.*, 2018; Antonietti *et al.*, 2023; Villar *et al.*, 2024), ya que los mismos han demostrado que los miARNs involucrados en el proceso de regulación genética del desarrollo del corazón y los trastornos cardiovasculares, tienen su expresión desregulada en formas avanzadas de CCC (Eulalio *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de sus prometedores resultados, estas investigaciones se encuentran aún en fases exploratorias.

En general, a pesar de numerosos y diversos intentos que incluyeron lectinas inmunomoduladoras, la posibilidad de disponer con una prueba autorizada que pueda anticipar con precisión la progresión de la EChc sigue siendo remota. Probablemente debido a la naturaleza compleja y multifactorial de la patogénesis de la ECh, ninguna de las moléculas candidatas, derivadas del parásito y/o huésped, se ha traducido en un marcador confiable y fácil de analizar e interpretar (Cortes-Serra *et al.*, 2020).

1.5 Los N-glicanos de plasma como potencial fuente de biomarcadores

Los glicoconjugados (macromoléculas biológicas que incluyen proteínas y lípidos conjugados covalentemente a carbohidratos) desempeñan un papel crucial en varios procesos biológicos, y han emergido como posibles biomarcadores con potencial clínico. Al respecto, los glicanos están implicados en la comunicación celular y la respuesta inmune, y se han descrito funciones de los mismos en diversas patologías, incluyendo las inflamatorias. Particularmente, el estudio y análisis de los N-glicanos en glicoproteínas séricas o plasmáticas (N-glicoma) ha demostrado gran potencial, ya que los mismos se alteran en respuesta a diversas condiciones patológicas, incluyendo enfermedades inflamatorias crónicas y patologías neoplásicas (Mariño *et al.*, 2011; Fung *et al.*, 2023).

En ese sentido, se han identificado alteraciones de la sialilación (Zhao *et al.*, 2017), galactosilación (Qian *et al.*, 2013) y fucosilación (Holst *et al.*, 2016) en el N-glicoma sérico en varios tipos de cáncer, por lo que ha sido postulado como una potencial fuente de biomarcadores. Si bien el análisis del N-glicoma en su totalidad no identifica específicamente las glicoproteínas con glicosilación aberrante, estudios con foco en la identificación de las mismas han demostrado que el biomarcador más utilizado para cáncer de próstata, el antígeno prostático (PSA, del inglés *prostatic-specific antigen*) está glicosilado diferencialmente durante la enfermedad, y la combinación de la medición de PSA y sus estructuras glicosídicas aberrantes ha sido propuesto como un marcador de diagnóstico clínico más específico y sensible que la medición de PSA en sí (Llop *et al.*, 2016). Además, se han hallado otros biomarcadores oncológicos en suero/plasma, entre ellos, la α 1-glicoproteína ácida (AGP, del inglés *acid alpha-1 glycoprotein*) con fucosilación aberrante para hepatocarcinoma (Liang *et al.*, 2019).

Asimismo, las alteraciones en N-glicanos también se han estudiado y demostrado en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas (Gornik y Lauc, 2008; Pavić *et al.*, 2018), autoinmunes (Seeling, Brückner y Nimmerjahn, 2017) e infecciosas (Joenvaara *et al.*, 2018) asociadas, principalmente, a alteraciones en IgG y glicoproteínas hepáticas, como haptoglobina y α 1-glicoproteína ácida (Mariño *et*

al., 2011; Verhelst *et al.*, 2020). En esta línea, y dado que las proteínas de fase aguda alteran sus estructuras durante un proceso inflamatorio, por ejemplo, en sus ramificaciones antenarias o el tipo de monosacárido terminal (van Dijk, Turner y Mackiewicz, 1994; Cecilianí y Pocacqua, 2007; Gornik y Lauc, 2008), estas alteraciones pueden ser cuantificadas por diversas metodologías, incluyendo cromatografía líquida de ultra/alta performance (U/HPLC, del inglés *Ultra/High performance liquid chromatography*). En ese sentido, se ha propuesto a GlycA como un biomarcador compuesto de inflamación sistémica cuyos niveles se encuentran elevados en pacientes con una amplia gama de afecciones crónicas relacionadas con la inflamación (Otvos *et al.*, 2015). Además, GlycA también permite predecir el riesgo cardiovascular temprano (Fung *et al.*, 2023; Galvao *et al.*, 2023).

En infecciones parasitarias, los cambios en el perfil del N-glicoma sérico o plasmático no fueron explorados en profundidad como biomarcadores de diagnóstico o progresión de la enfermedad. Sin embargo, un reciente estudio evidenció cambios en el perfil de N-glicanos de plasma/suero que permitieron distinguir entre una leishmaniasis visceral activa y controles sanos o casos asintomáticos (Gardinassi, L.G *et al.*, 2014; Porcino *et al.*, 2023).

En resumen, la inflamación desencadena cambios en la N-glicosilación sérica/plasmática que podrían usarse como biomarcadores o herramientas de pronóstico. No obstante, en el contexto de la EChc, la evidencia en ese sentido es escasa, por lo que estudios que aborden las alteraciones de la N-glicosilación plasmática en individuos infectados por *T. cruzi* podría contribuir a herramientas de diagnóstico/prognosis, así como promover una comprensión más completa de la intrincada relación entre los N-glicanos y la patogénesis de la enfermedad.

1.6 N-glicosilación: aspectos generales

La N-glicosilación consiste en la modificación postraduccional de proteínas por adición de oligosacáridos de complejidad variable a un residuo de asparagina (Asn), particularmente cuando dicho residuo se encuentra dentro de secuencias de aminoácidos Asn-Xaa-Ser/Thr (N-X-S/T, donde X no es prolina). La biosíntesis de los N-glicanos en células eucariotas se produce secuencialmente en dos fases y en dos

compartimentos de las células eucariotas, el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi. La glicosilación así obtenida es dependiente de factores genéticos (expresión de enzimas que componen la denominada *maquinaria de glicosilación*) y ambientales (ej. estado nutricional de la célula), y es específica de especie, tipo celular y proteína (Stanley *et al.*, 2022), como se demuestra, por ejemplo, con el carácter antigénico de ciertas estructuras presentes en microorganismos patógenos, o la glicosilación diferencial de proteínas producidas de manera recombinante en sistemas heterólogos (Colley KJ *et al.*, 2022).

Los tres tipos de N-glicanos comparten una estructura común, denominada núcleo o *core* (**Figura 5**) y se diferencian en su estructura según:

a) de alta manosa: la estructura *core* o núcleo sólo se extiende con residuos de manosa.

b) Complejos: la estructura *core* o núcleo se extienden por un proceso de adición de N-acetil-glucosaminas, que dan lugar a las antenas. Las mismas pueden ser decoradas con galactosa, y en forma terminal, ácido siálico.

c) Híbridos: están caracterizados por la adición de residuos de manosa en el brazo α 1-6 del núcleo y la adición de GlcNAc que puede ser extendida con galactosa, con o sin ácido siálico, en el brazo α 1-3 del núcleo.

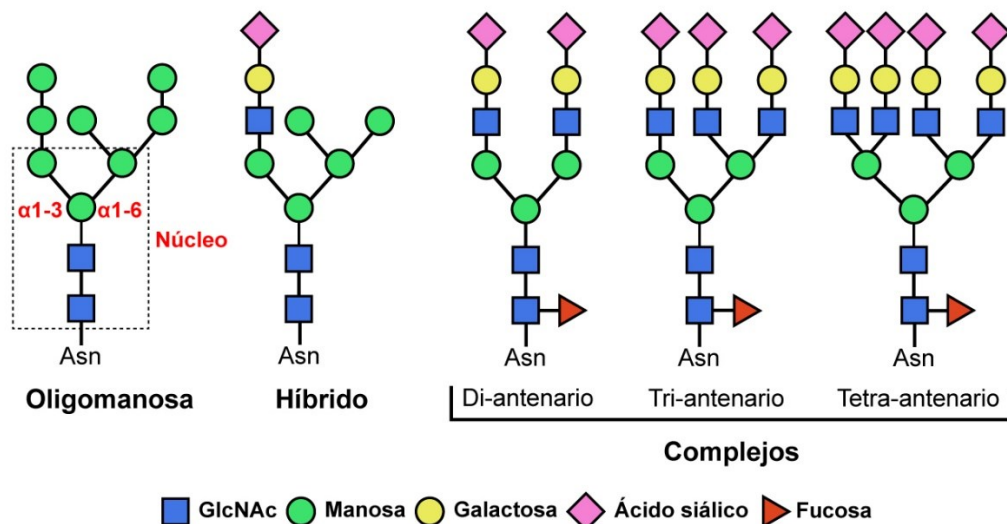


Figura 5. Clasificación de N-glicanos. GlcNAc, N-Acetilglucosamina; Asn, asparagina. La cantidad de GlcNAc adicionadas al núcleo define el tipo de N-glicano complejo. Como ejemplo se presentan estructuras di-, tri- o tetraantenarias.

En particular, la biosíntesis de N-glicanos en el complejo en Golgi es catalizada por enzimas como MGAT-1, MGAT-2, MGAT4a/b y MGAT5 (N-acetil-glucosaminiltransferasas I, II, IVa/b y V, respectivamente) (Schachter, 1986). Durante este proceso, los residuos de manosa de los glicanos precursores son eliminados, y las MGATs inician las ramificaciones de manera secuencial y ordenada, agregando residuos de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) (Schachter, 1986) que darán lugar a las diferentes antenas del glicano, de acuerdo con el número sustituciones con GlcNAc que posean (**Figura 5**). Estas GlcNAc pueden ser extendidas con galactosa, dando lugar a estructuras LacNAc (N-acetil-lactosamina) y si la ramificación se extiende, por cadenas de poli-N-acetil-lactosamina (poli-LacNAc) (Cummings y Kornfeld, 1984). Finalmente, los N-glicanos complejos pueden también ser sialilados o fucosilados en posiciones específicas y mediante las acciones de sialiltransferasas y fucosiltransferasas, respectivamente.

1.7 Desialilación en el proceso inflamatorio

La sialilación de N-glicanos juega un papel vital en la regulación de la vida media de las glicoproteínas en suero. Los glicanos asialilados son reconocidos por los receptores de asialoglicoproteína (AGPR) en el hígado y, como resultado, la glicoproteína se elimina del torrente sanguíneo (Ashwell *et al.*, 1982; Morell *et al.*, 1972) por lo que la sialilación/desialilación durante la inflamación ha estado en el centro de atención durante muchos años.

Particularmente, la alteración de la sialilación de los glicanos de la región Fc de las IgGs ha sido ampliamente demostrada en inflamación (Vattepu, Sneed y Anthony, 2022). En un individuo sano, alrededor del 10-15% de la IgG sérica está sialilada (Gudelj, Lauc y Pezer, 2018), y la unión del ácido siálico al extremo terminal de los N-glicanos de IgG prolonga la vida media de estas inmunoglobulinas en suero (Bas *et al.*, 2019). Además de esto, los ácidos siálicos terminales parecen servir principalmente como un interruptor entre la actividad proinflamatoria y antiinflamatoria de IgG en casos de alteración de la homeostasis. Consistentemente con esto, los pacientes que padecen condiciones típicamente inflamatorias muestran niveles elevados de IgG que carecen del ácido siálico terminal y residuos

de galactosa (Su *et al.*, 2020; Sołkiewicz *et al.*, 2021). En este sentido, los efectos de la administración de IgG intravenosa terapéutica (IGIV), apropiadamente sialilada, se asocian con el carácter antiinflamatorio de IgG que contrarresta la inflamación (Kaneko, Nimmerjahn y Ravetch, 2006; Washburn *et al.*, 2015).

2. Antecedentes

Con anterioridad a este trabajo de Tesis, las Dras. Vanina Grippo y Leticia Niborski (Tesis Doctorales, 2008 y 2012, respectivamente) desarrollaron bibliotecas de Acs recombinantes de cadena simple (scFv) a partir de ADN copia de células B de pacientes con EChc. Utilizando la tecnología de *Phage Display* (Ledsgaard *et al.*, 2018), se aisló un anticuerpo monoclonal humano, denominado scFv 6B6 (**Figura 6**).

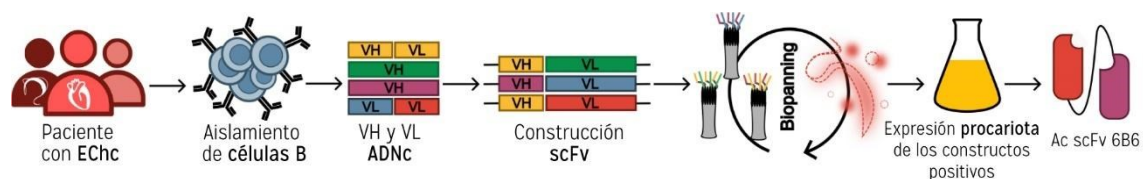


Figura 6. Representación esquemática de una biblioteca de presentación de fagos derivada del ARNm de células B de pacientes con EChc, de la cual se obtuvo el Ac scFv 6B6.

Resultados derivados de esos trabajos demostraron que el Ac scFv 6B6 reconoció una proteína de alto peso molecular cuando se enfrentó a lisado de epimastigote de *T. cruzi* mediante el ensayo de WB y carecía de reactividad contra lisados de otros kinetoplastidos y órganos de rata y ratón ensayados por ELISA (**Figura 7**).

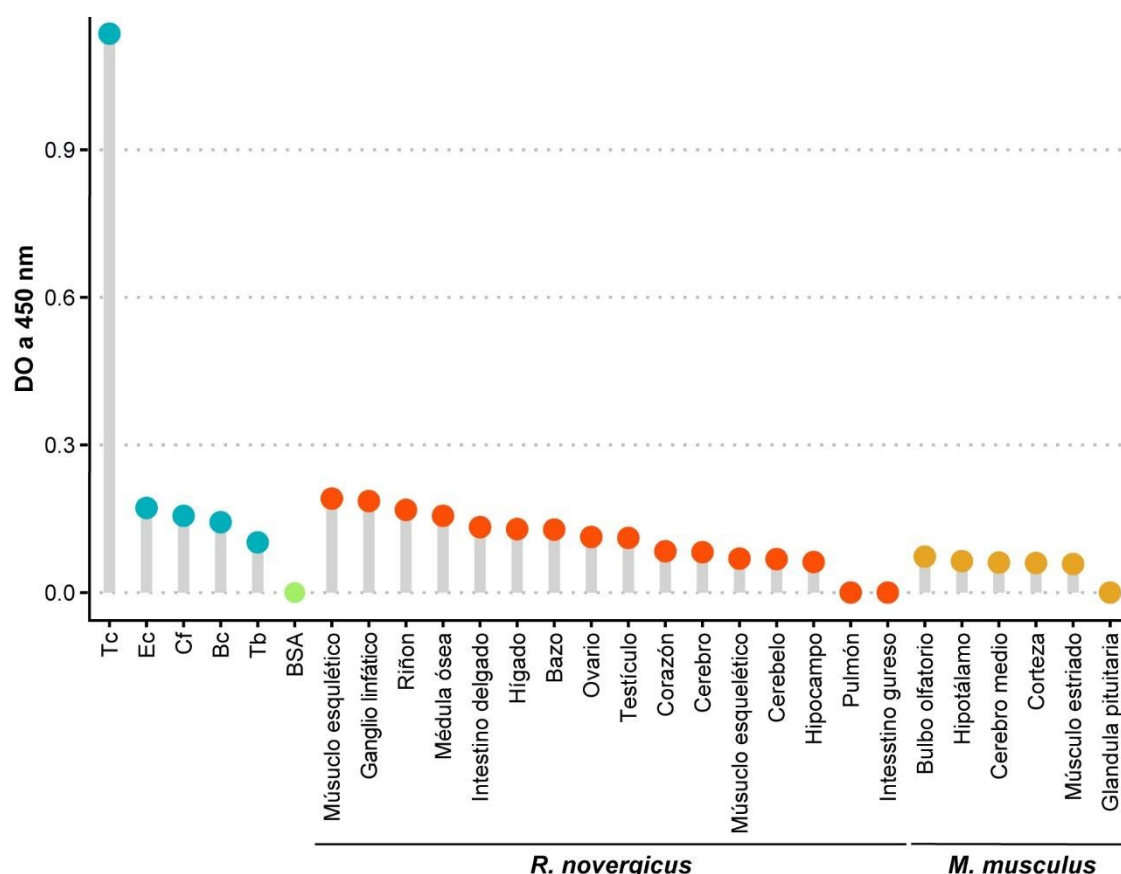


Figura 7. Reactividad del scFv 6B6 frente a lisado de otros microorganismos y de tejidos de rata y ratón. Placas de poliestireno revestidas con lisado (20 µg/mL) o BSA (proteína no relacionada) (5 µg/mL) se incubaron con scFv 6B6 (25 µg/ml) durante 2 h a 37°C. El scFv 6B6 unido se detectó con Ac anti-VSV y Ac de cabra anti-IgG1 de ratón acoplado a HRP. Revelado por TMB.; Los valores están expresados como la media de tres ensayos independientes por duplicado cada uno. El color de los círculos representa el grupo al que pertenece cada lisado: azul: microorganismos; verde: BSA; rojo: lisados de rata y naranja: lisados de ratón (Adaptado de Tesis Doctoral, Dra. Leticia Niborski, 2012). Lisados: Tc, *T. cruzi*; Tb, *T. brucei*; Cf, *C. fasciculata*; Ec, *E. coli*; *R. novergicus*, rata; *M. musculus*, ratón.

Posteriormente, al considerar la ausencia de esta proteína en los kinetoplástidos ensayados, se procedió a evaluar su potencial para el diagnóstico de la EChc. Dentro del marco de la investigación llevada a cabo durante mi Tesina de Licenciatura (2018), se realizó un análisis por WB para determinar si la proteína de unión al Ac scFv 6B6, aislada mediante inmunoprecipitación, era reconocida por muestras de plasma de pacientes EChc, con leishmaniasis cutánea (LC), con infección mixta por *Leishmania spp.* y *T. cruzi*, o sujetos no infectados (NI). Los resultados arrojaron que sólo los individuos crónicamente infectados por *T. cruzi* e individuos con infección mixta por ambos patógenos presentaban reactividad contra esta proteína (**Figura 8**).

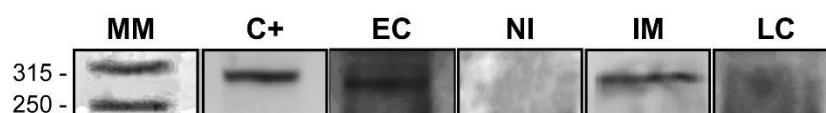


Figura 8. Potencial inmunogénico de la proteína de unión al scFv 6B6. Western-Blot (WB) representativo que muestra la reactividad de diferentes muestras de plasmas contra la proteína de unión al scFv 6B6. La proteína se sembró en SDS-PAGE (8%), se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se reveló con el anticuerpo scFv 6B6. La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. C+: control positivo; EC, plasma de paciente con EChc, NI: plasma de sujeto no infectado, MI: plasma de paciente con infección mixta por *T. cruzi* y *Leishmania spp.*, LC: plasma de paciente con leishmaniasis cutánea.

Por lo tanto, el siguiente paso consistió en evaluar la intensidad relativa de banda (IRB) por parte de los plasmas de pacientes pertenecientes a las distintas cohortes, detalladas más arriba, contra la proteína de unión a scFv 6B6. Tal como se observa en la **Figura 9**, los valores de IRB fueron significativamente mayores cuando se ensayaron plasma de pacientes infectados por *T. cruzi*, en comparación con aquellos provenientes de pacientes infectados con *Leishmania spp.* y sujetos no infectados. Asimismo, a pesar de no existir una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control debido al bajo número de muestras, los pacientes con coinfección por ambos patógenos mostraron una mediana de IRB muy similar a la obtenida para el grupo compuesto por muestras *T. cruzi*-positivas.

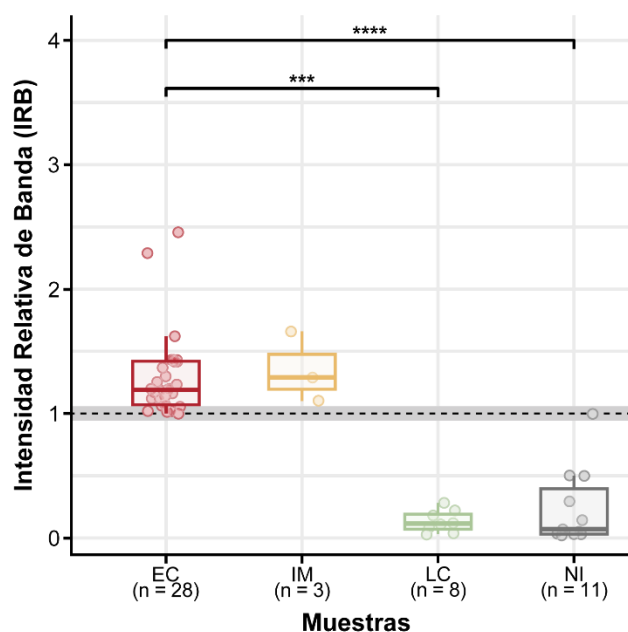


Figura 9. Intensidad relativa banda (IRB) obtenida de muestras de plasma de sujetos positivos (EC) y negativos para *T. cruzi* (NI), con infección mixta por *T. cruzi* y *Leishmania spp.* (IM) e individuos con leishmaniasis cutánea (LC). El valor de corte se estableció en 1 (línea discontinua). Cada punto en el gráfico representa el dato de un individuo. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. Las diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples de Dunn. Las correlaciones significativas se indican con el nivel de significancia (***p < 0,001; ****p < 0,0001).

En la **Tabla 3** se detallan las características de la cohorte de plasmas ensayados contra la proteína de unión a scFv 6B6, incluyendo la característica clínica de los individuos y el número de muestras.

Infección	Manifestación clínica	Número de plasmas positivos / Número total
EC	G0 (pacientes sin manifestación cardíaca)	10/10
	G1 (pacientes con manifestación cardíaca o digestiva)	18/18
NI	NA	1/10
IM	NA	3/3
LC	Cutánea	0/9

Tabla 3. Reactividad plasmática contra la proteína de unión a scFv 6B6 para toda la cohorte de individuos ensayados. EC, cohorte de pacientes con EChc, NI: cohorte de individuos no infectados, IM: cohorte de pacientes con infección mixta por *T. cruzi* y *Leishmania spp.*, LC: cohorte de pacientes con leishmaniasis cutánea.

En virtud de estos hallazgos, uno de los objetivos principales de la presente Tesis se enfoca en la caracterización detallada de esta proteína, explorando su potencial utilidad como herramienta diagnóstica para la EChc.

3. Hipótesis y Objetivos

En función de los Antecedentes expuestos, resulta evidente la importancia de caracterizar nuevas proteínas antigénicas de *T. cruzi*. Más allá de aportar al conocimiento básico sobre la biología del parásito, estos estudios permitirían mejorar la precisión del diagnóstico en sus diferentes escenarios epidemiológicos, reduciendo así el número de resultados no concluyentes. Además, dado que la forma crónica de la ECh puede resultar en una cardiomiopatía dilatada asociada a inflamación, la alteración del N-glicoma plasmático podría ser de utilidad para estudiar la evolución clínica de los pacientes que cursan esta fase.

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue la búsqueda de nuevas herramientas selectivas y específicas de potencial aplicación diagnóstica y pronóstica. En este sentido, y abordando este objetivo desde una perspectiva integral parásito-huésped, nos enfocamos en:

- Caracterizar una nueva proteína de *T. cruzi* como potencial herramienta de diagnóstico.
- Analizar el perfil plasmático de N-glicanos de pacientes con EChc, para establecer si una potencial alteración asociada al proceso inflamatorio podría ser utilizada para la prognosis de cardiomiopatía dilatada chagásica.

Para ello, han sido planteadas dos aproximaciones:

Aproximación I. Caracterización molecular de la proteína de unión al anticuerpo recombinante scFv 6B6 y validación de su eficacia para el diagnóstico serológico de la EChc.

- a. Identificar la proteína reconocida por el scFv 6B6 y realizar un estudio evolutivo de la misma mediante la construcción de un árbol filogenético y estudios de sintenia.
- b. Evaluar su expresión en diferentes linajes filogenéticos de *T. cruzi* y en otros parásitos de importancia sanitaria como *T. brucei* y *Leishmania spp.*

- c. Determinar su localización subcelular en diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.
- d. Predecir mediante análisis *in silico* tanto su estructura tridimensional como la presencia de epítopes de células B.
- e. Clonar y expresar las regiones predichas como inmunogénicas en un sistema de expresión procariota y validar inicialmente su potencial para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*-específicos mediante ensayo de WB.
- f. Estandarizar y optimizar pruebas inmunoenzimáticas en formato ELISA indirecto, utilizando los antígenos derivados de la proteína de unión al Ac scFv 6B6.
- g. Validar el ensayo de ELISA indirecto mediante el uso de plasmas de individuos infectados y no infectados con *T. cruzi* de diferentes regiones geográficas de América y con las diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad, así como evaluar su reactividad cruzada frente a muestras de plasmas de individuos con otras enfermedades infecciosas virales, bacterianas y parasitarias.

Aproximación II. Exploración del N-glicoma plasmático en búsqueda de nuevos marcadores pronósticos de la manifestación cardíaca de la EChc.

- a. Explorar la potencial alteración del N-glicoma de plasma total en pacientes en las distintas fases de la enfermedad crónica (sin manifestaciones clínicas o con alteraciones cardíacas).
- b. Evaluar las potenciales alteraciones del N-glicoma plasmático en función de la carga parasitaria de *T. cruzi* en sangre.

4. Materiales

4.1 Soluciones y medios generales.

BSA-PBS: 1% (p/v) BSA en PBS 1X.

BSA-TBS: 1% (p/v) BSA en TBS TW.

Buffer carbonato/bicarbonato (ELISA): 15 mM Na₂CO₃; 35 mM NaHCO₃ (pH 9,6).

Buffer de corrida de ácidos nucleicos (TAE) 50X: 50 mM Tris base, 1 M ácido acético glacial, 50 mM EDTA (pH: 7,5).

Buffer de corrida de proteínas 1X: 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS (pH 8,3).

Buffer de electrotransferencia de proteínas 1X: 2,5 mM Tris base, 190 mM glicina, 20% (v/v) metanol.

Buffer de elución (inmunoprecipitación): 0,1 M glicina-HCl (pH 2,5-3,0).

Buffer de lavado (inmunoprecipitación): 0,025 M Tris, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 5% glicerol (pH 7,4).

Buffer de siembra de proteínas 5X: 0,5% (p/v) azul de bromofenol, 10% (p/v) SDS, 25% (v/v) β-mercaptoetanol, 50% (v/v) glicerol.

Dextrán sulfato: 1% (p/v) dextrán sulfato (Sigma-Aldrich, Cat. No. D-6001) en *buffer* citrato 0,1 M (pH 5,5).

Hemina 500X: 0.2 N NaOH, en 50 mL en H₂O miliQ en un vaso de precipitado. Luego, se añadió 0.65 g de hemina en polvo (Sigma-Aldrich, Cat. No. MA0902) y se revolvió hasta su completa disolución. Se esterilizó con filtro de 0.22 µm.

HEPES 1M: 2,4% (p/v) HEPES (Sigma-Aldrich, Cat. No. 391338) (pH 7,4). Esterilizado con filtro de 0,22 µm.

Medio BHI completo: Medio BHI base + 25 µg/mL hemina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 100 µg/mL higromicina, 100 µg/mL nourseotricina, 10% suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Córdoba, Argentina) inactivado.

Medio Brain Heart Infusion (BHI) base: 0,6% (p/v) Infusión de cerebro y corazón (sólidos), 0,6% (p/v) de digerido péptico de tejido animal, 0,5% (p/v) NaCl, 0,3% glucosa, 1,45% (p/v) gelatina digerida por enzimas pancreáticas, 0,25% (p/v) Na₂HPO₄; pH: 7,4. Se esterilizó por autoclave.

Medio LB-agar: LB + 10% Agar. Se esterilizó por autoclave.

Medio *Liver infusion tryptose* (LIT) completo: 0,5% (p/v) infusión de hígado, 0,5% (p/v) triptosa, 68 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 22 mM Na₂HPO₄, 2% (p/v) glucosa. Se esterilizó por autoclave y se suplementó con: 25 µg/mL hemina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 10% SFB inactivado (pH 7,4).

Medio Luria-Bertani (LB): 1% (p/v) bactotripton, 0,5% (p/v) extracto de levadura, 1% (p/v) NaCl. Se esterilizó por autoclave.

Medio RPMI-SFB/RPMI-BSA: En ambos casos, se utilizó como base al medio RPMI-1640 (que contiene HEPES y rojo fenol en su formulación comercial (Thermo-Fisher, Cat. No. 23400021). Se adicionó bicarbonato de sodio 0,2% (p/v) y se esterilizó por filtración con filtro de 0,22 µm y se suplementó con L-glutamina 2mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL.

PBS 1X: 38 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 162 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4).

PBS-Imidazol: 0,1 M imidazol, 0,05 M Na₂HPO₄, 0,3 M NaCl (pH 8,0).

PBS-Tritón: 0,1% (v/v) Tritón X-100 en PBS 1X.

PBS-TW: PBS 1X + 0,05% (v/v) de detergente no iónico Tween-20.

PFA-PBS: 4% (v/v) p-formaldehído en PBS 1X.

Rojo Ponceau S: 0,5% rojo Ponceau S, 40% metanol, 10% ácido acético (Sigma-Aldrich, Cat. No. P-3504).

RPMI-BSA: RPMI-1640 suplementado + 0.4% BSA.

RPMI-SFB: RPMI-1640 suplementado + 10% (v/v) SFB inactivado.

Solución de elución (producción de scFv): 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 50 mM EDTA, 300 mM imidazol.

Solución de extracción periplásmica: 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 M EDTA, 0,5 M sacarosa, inhibidores de proteasas 1 tableta /10 mL (Roche, Alemania).

Solución de frenado (ELISA diagnóstico): 4 N H₂SO₄.

Solución de frenado (ELISA-*in house*): 0.2 M H₂SO₄.

Solución de lavado (producción de scFv): 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol.

Solución de lisis de epimastigotes: 5 mM MgCl₂, 25 mM acetato de Potasio (KCH₃COO), 1 mM DTT 1 mM, sacarosa 250 mM, Tritón X100 1% (v/v), solución Tris-HCl 20 mM pH 7,4, cOmplete (inhibidor de proteasas, Roche, Alemania) 1 tableta/10 mL.

Solución de lisis de tripomastigotes: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, cOmplete (inhibidor de proteasas, Roche, Alemania, Cat. No. 04693132001), 1 tableta/10 mL.

Solución de tinción Coomassie Blue (no coloidal): 0,12% *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Sigma-Aldrich, Cat. No. B-2025), 10% (NH₄)₂SO₄, 10% H₃PO₄ (85%), 20% metanol.

Solución decolorante de Coomassie: 40% metanol, 10% ácido acético.

Solución I: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea (pH 8,0).

Solución II: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea (pH 6,3).

Solución III: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea (pH 5,9).

Solución IV: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea (pH 4,5).

TBFI: 0,1 M CaCl₂.

TBFII: 0,1 M CaCl₂, 15% glicerol.

TBS 1X: 5 mM Tris-HCl (pH 7,4), 15 mM NaCl.

TBS-TW20: TBS 1X + 1% (v/v) de detergente no iónico Tween-20.

TMB: 30 mg/mL de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, Cat. No. EC 264-769-6) en *buffer* citrato 0,1 M (pH 5,5), 7,2% DMSO, 1,8% glicerol.

4.2 Reactivos comerciales.

Estándares de peso molecular de ADN:

- Estándar de ADN 1 Kb Plus, Invitrogen, Cat. No. 10787018.
- Escalera de ADN de 100 bp GeneRuler, Thermo Scientific, Cat. No. SM0241.
- LADDER 1 kpb plus, PB-L Productos Bio-Lógicos, Cat. No. MA0902.

Buffer de carga de ácidos nucleicos 6X: *Gel Loading Dye 6X*, New England BioLabs, Cat. No. B7024S.

Estándares de peso molecular de proteínas:

- Estándar de proteínas de rango alto multicolor Spectra™, Thermo Scientific, Cat. No. 26625.
- Estándar de proteínas preteñidas PageRuler, Thermo Scientific, Cat. No. 26616.

Cebadores: todos sintetizados por Macrogen, 100 μM solución de stock.

dNTPs: Invitrogen™ Conjunto de dNTP (100 mM), Invitrogen, Cat. No. 10297018.

Digestión enzimática:

- *Buffer* CutSmart: New England BioLabs, Cat. No. B6004S.
- *Buffer* NEB 3.1: New England BioLabs, Cat. No. B6003S.

Ligación:

- *Buffer* de Ligación: 2X Rapid Ligation *Buffer*, Promega, Cat. No. PAC6711.

IPTG: La solución madre se prepara a 1 M en H₂O miliQ y se conserva a -20 °C.

Concentración de uso: 1 mM. Se esterilizó con filtro de 0,22 µm.

Resina Ni-NTA Agarosa: 50% Ni²⁺-NTA, QIAGEN, Cat. No. 30210.

4.3 Enzimas.

Enzimas de restricción:

- AflIII: New England BioLabs, Cat. No. R0520S.
- BamHI-HF: New England BioLabs, Cat. No. R3136.
- EcoRI: TransGen BioTech, Cat. No. JE201-01.
- HindIII: New England BioLabs, Cat. No. R0104S.
- SacI: New England BioLabs, Cat. No. R0156.
- SmaI: New England BioLabs, Cat. No. R0604L.
- XbaI: Invitrogen, Cat. No. 15226-012.
- XhoI: New England BioLabs, Cat. No. R0146S.

Enzima de ligación:

- T4 DNA Ligase: New England BioLabs, Cat. No. M0202S.

Enzimas de polimerización:

- EasyTaq DNA *Polymerase*, TransGene, Cat. No. AP111.
- Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, New England BioLabs, Cat. No. M0515.

Liberación de N-glicanos:

- PNGasa F (Péptido-N-glicosidasa F): Roche, Cat. No. 11365177001.

4.4 Antibióticos.

- **Penicilina-Estreptomicina (500X):** 50.000 unidades de penicilina G sódica y 50.000 µg de sulfato de estreptomicina (Serendipia Lab., Cat. No. DC1600).
- **X-gal:** 20 mg/mL en dimetilformamida. Se esterilizó con filtro de 0,22 µm. Se conserva a 4 °C en la oscuridad. Concentración de uso: 8 mg/mL.
- **Ampicilina (2000X):** 100 mg/mL en H₂O miliQ. Se esterilizó con filtro de 0,22 µm. Se conserva a -20 °C. Concentración de uso: 100 µg/mL.
- **Cloranfenicol (1000X):** 34 mg/mL (Sigma-Aldrich, Cat. No. P- SIALC0857-25G) en H₂O miliQ. Se esterilizó con filtro de 0,22 µm. Se conserva a -20°C. Concentración de uso: 34 µg/mL.
- **Bleomicina/Zeocina (1000x):** 10 mg/mL (Invivogen, Cat. No. ant-zn-1) en H₂O miliQ. Se esterilizó con filtro de 0,22 µm. Se conserva a -20 °C. Concentración de uso: 10 µg/mL.
- **Nourseotricina (100X):** 10 mg/mL (Jena Bioscience, Cat. No. AB-102L) en H₂O miliQ. Se esterilizó con filtro de 0.22 µm. Se conserva a -20 °C. Concentración de uso: 100 µg/mL.
- **Higromicina B (500X):** 10 mg/mL en H₂O miliQ. Se esterilizó con filtro de 0,22 µm. Se conserva a -20 °C. Concentración de uso: 50 µg/mL (Thermo Scientific, Cat. No. 10687010).
- **Tetraciclina (1000X):** Se prepara en una concentración de 10 mg/mL en etanol 70%, conservándose a -20 °C en oscuridad. Concentración de uso: 10 µg/mL.

4.5 Anticuerpos.

Anticuerpo	Especie	Catálogo	Fabricante	Concentración/ Dilución de uso
Comerciales				
Anti-6X His acoplado a HRP (clon HIS-1) monoclonal	Ratón	A7058	Sigma-Aldrich	WB: 1/3000
Anti-Tubulina, Tirosina, (clon TUB-1A2) monoclonal	Ratón	T8328	Sigma-Aldrich	WB: 1/6000
Anti-IgG humana acoplado a HRP policlonal	Conejo	A8792	Sigma-Aldrich	WB: 1/3000 ELISA: 1/3000
Anti-IgG ratón acoplado a HRP policlonal	Cabra	401215	Calbiochem	WB: 1/6000
Anti-IgG conejo acoplado a HRP policlonal	Cabra	401216	Calbiochem	WB: 1/6000
Alexa Flúor 488 Anti-IgG conejo	Cabra	A-11008	Invitrogen	IFI: 1/500
Cy3 Anti-IgG (H+L) ratón	Cabra	M30010	Invitrogen	IFI: 1/500
Anti-6X His monoclonal	Ratón	4A12E4	Invitrogen	IFI: 1/1000 WB: 1/3000
No comerciales				
Anti-Tc323 (scFv-6B6) monoclonal	-	-	Desarrollado en el laboratorio (Tesis Dra. Niborski, Leticia)	WB: 13 µg/mL ELISA: 20 µg/mL
Anti-Tc323 (chim m6B6) monoclonal	-	-	Desarrollado en el laboratorio (Tesis Dra. Niborski, Leticia)	WB: 3 µg/mL IFI: 12 µg/mL
Anti-TcCyP19	Conejo		Cedido por la Dr. Jacqueline Búa	WB: 1/300 IFI: 1/300
Anti-BiP	Conejo		Cedido por la Dr. Jacqueline Búa	WB: 1/10000

Tabla 4. Listado de anticuerpos utilizados en este trabajo. HRP (*horseradish peroxidase*); fluoróforos: Alexa 488, y cianina 3 (Cy3). Se indica la especie inmunizada, el código comercial, el fabricante del Ac y la concentración/dilución de uso; WB, Western-Blot; ELISA, Inmunoensayo enzimático; IFI, Inmunofluorescencia indirecta.

4.6.2 De expresión.

- **pRSET-A (Invitrogen):** Plásmido utilizado como vector de expresión procariotas que confiere resistencia a la ampicilina (amp^R). Contiene el promotor T7lac para expresión en fase con una cola de histidinas en su región N-terminal que facilita la purificación del producto proteico por columnas de afinidad. El promotor T7lac contiene la fusión del promotor de la T7 ARN polimerasa y el operador *lac*. Los fragmentos de ADN insertados sólo se expresan en presencia de un agente inductor (IPTG) y de una fuente de T7 ARN polimerasa. En este trabajo, se ha utilizado la cepa de *E. coli* BL21(DE3) como fuente de esta polimerasa, ya que en ella la expresión de la T7 ARN polimerasa también se halla bajo el control del operón *lac*. Las proteínas expresadas bajo este sistema presentan una cola de histidinas en su extremo N-terminal (6xHis) (**Figura 11**).

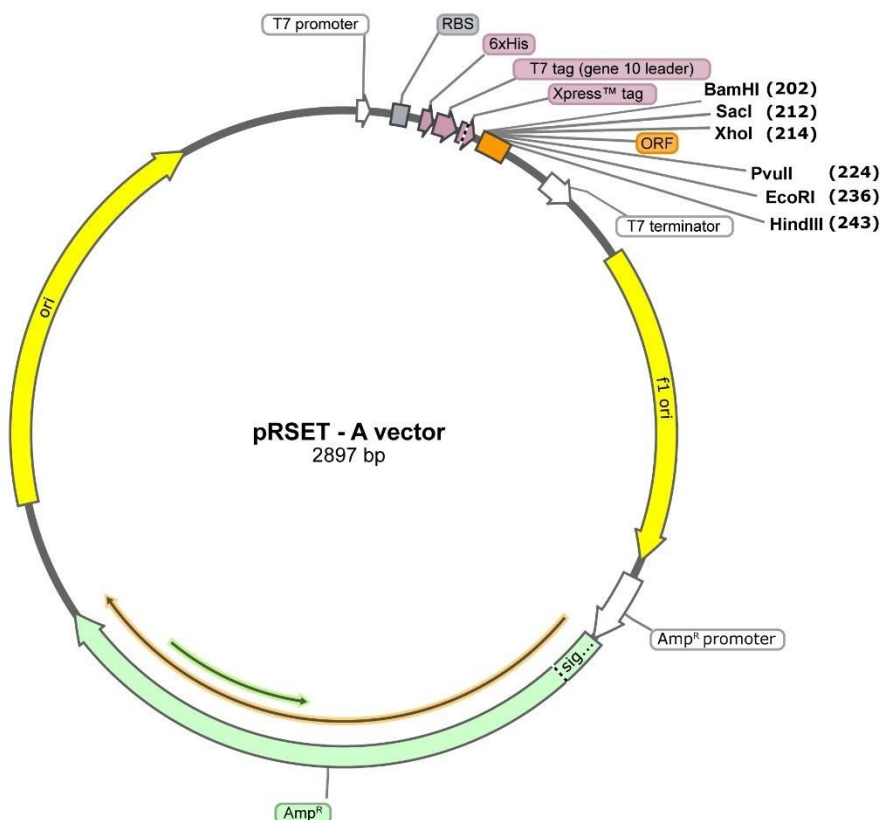


Figure 11. Mapa circular del plásmido pRSET-A. Sitio de unión ribosomal (RBS, del inglés *ribosomal binding site*), 6xHis, secuencia de hexahistidinas (*tag*) N-terminal; Ori, sitio de inicio de la replicación; ORF, marco de lectura abierto (del inglés, *open reading frame*). Se indican las enzimas de restricción específicas cuyo sitio de corte se incluyó en los cebadores *forward* (BamHI, SacI, XhoI) y *reverse* (PvuII, EcoRI, HindIII) utilizados para la amplificación de cada ORF específico y su posterior clonado en este plásmido (ver Apéndice).

- **pLEXSY_I-ble3 (Jena Bioscience):** Plásmido utilizado para la expresión de proteínas inducibles a partir de construcciones integrativas en el eucariota *L. tarentolae* (cepa T7-TR). Permite un control estricto de la expresión de proteínas análoga a la expresión bacteriana de T7. La expresión se activa mediante la adición de un inductor (tetraciclina). La selección de los transfectantes se realiza con Bleomicina o a su análogo Zeocina, ya que este plásmido contiene el gen de resistencia a dicho antibiótico (Bleo^R). Las proteínas expresadas bajo este sistema presentan una cola de histidinas en su extremo C-terminal (**Figura 12**).

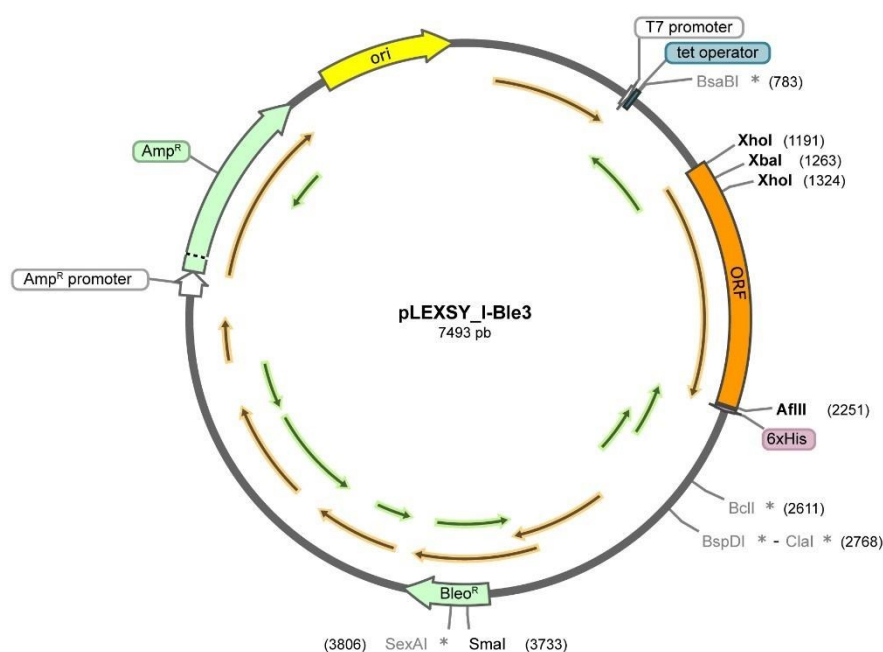


Figura 12. Mapa circular del vector pLEXSY_I-Ble3. 6xHis, secuencia de hexahistidinas (*tag*) C-terminal; Ori, sitio de inicio de la replicación; ORF, marco de lectura abierto (del inglés, *open reading frame*). Se indican las enzimas de restricción específicas cuyo sitio de corte se incluyó en los cebadores *forward* (**XbaI y XhoI**) y *reverse* (**AflIII**) utilizados para la amplificación de cada ORF específico y su posterior clonado en este plásmido (ver Apéndice).

4.7 Cepas.

4.7.1 *Escherichia coli*

- ***Escherichia coli* (*E. coli*) DH5a** – **Genotipo:** F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -, Thermo Scientific, Cat. No. 18265017. Cepa para clonado.
- ***E. coli* BL21 Rosetta (DE3) pLysS** – **Genotipo:** F-ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^R), Novagen, Sigma-Aldrich, Cat. No. 70956-M. Cepa para expresión. Inducible por IPTG.

4.7.2 *Trypanosoma cruzi*.

Cepa	UDT	Ciudad, País	Hospedero/Vector
Dm28c	TcI	Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>
CL Brener	TcVI	Río Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>
Tulahuen	TcVI	Tulahuen, Chile	<i>Homo sapiens</i>
Y	TcII	São Paulo, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
HE	TcV	Paraguay	<i>Triatoma infestans</i>

Tabla 5. Cepas de *T. cruzi* utilizadas en este estudio con su correspondiente UDT Unidad Discreta de Tipificación), según la nomenclatura revisada de Zingales y col., 2023

4.7.3 *Leishmania* spp.

- ***Leishmania mexicana*:** Cepa infectiva para los humanos aislada originalmente en Yucatán, México a partir del vector *Lutzomyia olmeca*.
- ***Leishmania tarentolae* (cepa LEXSY T7-TR):** Cepa comercial no infectiva aislada originalmente a partir del vector *Tarentola mauritanica*. Está modificada genéticamente para la expresión de proteínas ya que expresa constitutivamente la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7pol) y el represor del elemento de respuesta a tetraciclina (Tet^R). Además, presentan genes de resistencia a los antibióticos de selección nourseotricina e higromicina.

4.8 Línea celular.

- VERO (ATCC[®] CCL-81[™]): células epiteliales provenientes de riñón de primate. Utilizada para la obtención y mantenimiento de las formas tripomastigotes de *T. cruzi*.

5. Métodos

5.1 Reclutamiento de pacientes y obtención de muestra.

La selección y toma de muestras de los pacientes con EChc fueron llevadas a cabo en el Servicio de Cardiología del Hospital General de Agudos “Dr. Ramos Mejía”, el Instituto Nacional de Parasitología (INP-ANLIS) “Dr. Mario Fatała Chabén” y el Hospital General de Agudos “Dr. Ignacio Pirovano”, ubicados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Todos los protocolos empleados siguen los lineamientos de la Declaración de Helsinki y de los Comités de Ética Médica de los respectivos centros de muestreo. En concordancia con esto, cada uno de los pacientes incluidos en el estudio proporcionó su consentimiento informado por escrito antes de que se llevara a cabo la extracción de la muestra, y previa explicación de la naturaleza de la investigación.

Las muestras consistieron en 35 a 80 mL de sangre venosa periférica, recolectada en tubos anticoagulados con EDTA (BD-Vacutainer). Una fracción de 3 mL sangre completa se separó y centrifugó durante 10 min a 2000 rpm para la obtención del plasma, el cual se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Otra alícuota de 2 mL se separó para la detección de ADN de *T. cruzi* por qPCR (ver 5.2. **Detección de ADN de *T. cruzi* y cuantificación de la carga parasitaria en muestras sanguíneas**).

Los criterios de inclusión de los pacientes implicaron tener resultados serológicos positivos para la ECh, confirmados por al menos dos métodos diagnósticos independientes, que incluyeron inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) o ensayo de ELISA, además de residir en el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), una zona no endémica para la infección. Por otro lado, los criterios de exclusión abarcaron la presencia de hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, disfunción tiroidea, insuficiencia renal, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, trastornos hidroelectrolíticos, alcoholismo, antecedentes médicos que sugirieran obstrucción coronaria arterial, enfermedades reumáticas, embarazo, tratamiento con Benznidazol y/o Nifurtimox,

así como la incapacidad para completar los exámenes requeridos. Todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión fueron sometidos a un examen clínico y cardiológico exhaustivo, que incluyó una evaluación de la historia clínica, un examen físico, un electrocardiograma en reposo, análisis clínicos de laboratorio, radiografías de tórax y ecocardiogramas, según la consideración de los médicos a cargo.

Considerando la evaluación clínica y cardiológica, los pacientes fueron divididos en grupos de acuerdo con una la clasificación de Kuschnir (Kuschnir *et al.*, 1985) y categorizados en función de la presencia o ausencia de sintomatología en:

- **Grupo G0:** pacientes que no presentaron signos ni síntomas evidentes de patología cardíaca (**K0**, radiografía de tórax y electrocardiograma normales).
- **Grupo G1:** pacientes con alteraciones cardíacas se dividen en tres subgrupos, cada uno con un grado de severidad diferente; K1: Pacientes que presentan alteraciones como bloqueo de rama derecha y/o izquierda, así como diversas anomalías en la conductividad cardíaca; K2: Pacientes con dilatación del ventrículo izquierdo; K3: Pacientes que sufren de insuficiencia cardíaca. Dentro de este último grupo (G1), también se incluyeron a los pacientes que padecían alteraciones digestivas debido a la infección por el parásito.

Adicionalmente muestras de individuos no infectados por *T. cruzi* fueron incluidas como grupo control, utilizando (a excepción de la serología) los mismos criterios de inclusión y exclusión.

5.2 Detección de ADN de *T. cruzi* y cuantificación de la carga parasitaria en muestras sanguíneas.

5.2.1 Extracción de ADN total.

A partir de las muestras sanguíneas de cada paciente, se extrajo ADN utilizando el kit comercial *High Pure PCR Template Preparation* (Diagnostics Corp., Indiana, EE. UU.), según las instrucciones provistas por el fabricante. A continuación, se describe detalladamente el protocolo seguido:

En un vial de 2 mL se agregó 40 µL de proteinasa K (10 mg/mL), 200 µL de *buffer* de unión, 200 µL de la muestra de sangre (previamente homogeneizada) y 5 µL de control interno de amplificación o IAC (del inglés, *Internal Amplification Control*) (100 pg/µL) (Duffy *et al.*, 2013). La mezcla anterior se homogeneizó durante 15 seg en Vortex y se incubó a 70 °C durante 10 min en bloque térmico. Posteriormente, se añadió 100 µL de isopropanol, se homogeneizó en vortex y el volumen total se incorporó en su correspondiente columna *High Pure Filter* en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm, descartándose el tubo colector con el filtrado, y colocando la columna en un nuevo tubo colector. Luego, se añadieron 500 µL de solución removedora de inhibidores, y se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente, descartando nuevamente el tubo con el filtrado. Se llevaron a cabo dos rondas adicionales de procedimientos similares al paso anterior, esta vez incorporando una solución de lavado. Finalmente, la columna se centrifugó a 13800 rpm para la eliminación del etanol residual, se agregaron 100 µL de solución de elución precalentada a 70 °C y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. El eluato obtenido se conservó a -20 °C para su posterior análisis.

5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

En este estudio, la detección y cuantificación de *T. cruzi* se llevó a cabo siguiendo el procedimiento establecido por el equipo del Dr. Alejandro Schijman, LaBMeCh-INGEBI-CONICET (Duffy *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2015). En este protocolo, se emplea una reacción “multiplex” que amplifica la secuencia objetivo en el ADN satélite (ADNSat) de *T. cruzi* y el IAC en dos reacciones simultáneas. La reacción se realizó utilizando 5 µL de ADN en un volumen final de 20 µL de qPCR supermix. La amplificación se llevó a cabo en el equipo de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, California, EE. UU.) o Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Cambridgeshire, Reino Unido), con las siguientes condiciones de ciclado: 10 min de pre-incubación a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg y de 58 °C durante 1 min, con lectura de la señal de fluorescencia al final de cada ciclo. Una vez obtenidos los resultados se definieron como positivas todas aquellas que obtengan un valor de C_q (*cycle quantification*)/ C_t (*cycle threshold*).

La cuantificación de la carga parasitaria se llevó a cabo mediante una curva estándar de 5 puntos construida con diluciones seriadas

5.3 Preparación de lisados.

5.3.1 Epimastigotes de *T. cruzi* / Promastigotes de *L. tarentolae*.

Epimastigotes de *T. cruzi* (cepas Dm28c, Y, HE y CL Brener) o promastigotes de *Leishmania tarentolae* se cultivaron en medio LIT o BHI, respectivamente y se recolectaron en su fase exponencial de crecimiento por centrifugación a 400 g durante 10 min en tubos cónicos de 50 mL. Luego de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en PBS y se centrifugó nuevamente para lavar el medio de cultivo excedente. El sedimento resultante fue resuspendido en solución de lisis de epimastigotes, siguiendo la relación 0,5 mL de solución de lisis por cada 10^9 parásitos, y sometido a 5 ciclos de congelado en N₂ líquido y descongelado a 37 °C. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford (Bio-Rad, California, EE. UU.), obteniéndose valores de concentración de 4,3 a 12,5 mg/mL. Se procedió de igual manera para obtener los lisados de promastigotes de *Leishmania mexicana* y parásitos procíclicos de *Trypanosoma brucei*, los cuales fueron gentilmente cedidos por el Dr. Carlos Labriola, de la Fundación Instituto Leloir y por el Dr. Guillermo Alonso y la Dra. Alejandra Schoijet del Laboratorio de Señalización y Mecanismos Adaptativos en Tripanosomátidos (INGEBI-CONICET), respectivamente. Los extractos proteicos fueron conservados a -80 °C hasta su utilización.

5.3.2 Tripomastigotes / amastigotes.

A partir de cultivo de células VERO en medio RPMI-SFB infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* [cepa Dm28c, multiplicidad de infección (MOI) 3:1], se recuperaron los sobrenadantes luego del día 3-5 post infección. Específicamente, se centrifugó a 400 g por 10 min para separar los restos de las células sustrato, se recuperó el sobrenadante, y finalmente se centrifugó a 2000 g por 10 min para sedimentar los parásitos. El sedimento resultante se lavó con 1 mL de PBS y se contaron los parásitos en cámara de Neubauer. Seguidamente, se centrifugó a 2000

g por 10 min y se descartó el sobrenadante, conservándose los tripomastigotes en el sedimento.

Para la obtención de los amastigotes, un total de 1×10^7 de los tripomastigotes derivados de células anteriormente obtenidos, se colectaron por centrifugación y se lavaron tres veces con RPMI-BSA pH 7,4 y dos veces más con RPMI-BSA pH 5, en ausencia de SFB. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 100 μ L de RPMI-BSA pH 5 y se incubaron a 37 °C. Luego de 24 h, los parásitos fueron recolectados por centrifugación durante 10 min a 2000 rpm.

En ambos casos, se almacenaron los sedimentos a -20 °C hasta acumular una cantidad total de 6×10^8 parásitos totales, para luego resuspenderse en solución de lisis de tripomastigotes, a razón de 150 μ L de *buffer* por cada 10^7 parásitos. La suspensión resultante se sometió a 5 ciclos de congelado en N₂ líquido y descongelado a 37 °C, y se cuantificó proteínas totales por el método de Bradford (Bio-Rad, California, EE. UU), obteniéndose concentraciones de 1,47 mg/mL y 4,5 mg/mL para el lisado de amastigotes y tripomastigotes, respectivamente.

5.4 Expresión y purificación del Ac scFv 6B6.

Bacterias *E. coli* HB2151 transformadas con el plásmido de scFv 6B6 se crecieron en agitación a 37 °C en medio LB/Ampicilina-Glucosa 2%. Al día siguiente, 10 mL de ese cultivo se inocularon a 800 mL de medio LB/Ampicilina-Glucosa 2% hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,7-1. Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 5000 g en una centrifuga Sorvall RC-5C PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y fueron resuspendidas nuevamente en medio LB/Ampicilina (sin glucosa), al cual se le adicionó 1 mM de IPTG para inducir la expresión del anticuerpo. Los cultivos permanecieron en agitación a 20 °C durante aproximadamente 18 h. Al día siguiente, la suspensión bacteriana se centrifugó a 4 °C por 10 min a 5000 g y el *pellet* se resuspendió lentamente, y evitando la formación de burbujas en 10 mL de solución de extracción periplásmica mediante pipeteo. Luego, se mantuvo en agitación en hielo por 30 min y se centrifugó a 4 °C por 15 min a 10000 g para separar la fracción periplásmica. La fracción periplásmica se dializó a 4 °C ON contra PBS-Imidazol. La purificación del scFv se realizó a través de su

extremo 6xHIS, utilizando una columna de Ni-NTA (QIAGEN, Helden, Alemania) en una proporción 1:20. Después de eluir con el *buffer* de elución (PBS-Imidazol), las fracciones obtenidas se dializaron contra PBS ON a 4 °C, con el objetivo de eliminar el Imidazol presente. Se determinó la concentración de proteínas por DO a 280 nm y se calculó la concentración de scFv según su coeficiente de extinción molar calculado previamente en base a su secuencia aminoacídica.

CEM (coeficiente de extinción molar): 1,55.

5.5 Obtención del Ac scFv 6B6 como Ac completo o quimera: chim m6B6

El clonado del Ac scFv 6B6 como IgG, su expresión temporal en células HEK293 (provenientes de tejido embrionario humano del riñón), y su posterior purificación, se realizó en cooperación con el Dr. Jos Raats de ModiQuest *Research - Monoclonal Antibody Generation Services en Nijmegen*, Países Bajos). Brevemente, se crearon dos construcciones utilizando distintos plásmidos de expresión eucariótica con diferentes niveles de selección. Se clonó la región variable de la cadena ligera del scFv en un plásmido de expresión junto con el gen de la región constante de la cadena ligera (kappa) de *M. musculus*. Por otro lado, se clonó la región variable de la cadena pesada del scFv junto al gen de la región constante de la cadena pesada (IgG1) de *M. musculus* en otro plásmido de expresión. Se co-transfectaron células HEK293 con una combinación de estos plásmidos, cada uno codificando una cadena de la inmunoglobulina, y posteriormente se purificaron a través de una columna de proteína A.

5.6 Inmunoprecipitación (IP).

La inmunoprecipitación de la proteína Tc323 se realizó utilizando un kit comercial (Pierce™Co-Immunoprecipitation Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU), y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Brevemente, se pasó 1 mg de lisado de epimastigote de *T. cruzi* (cepa CL-Brener) a través de una columna de agarosa Proteína A/G para minimizar la unión no específica de las

proteínas del parásito a la resina. En paralelo, se entrecruzaron covalentemente 20 µg del Ac chim m6B6 con la proteína A/G agarosa utilizando DSS (Thermo-Scientific) durante 1 h a TA. Luego, el Ac chim m6B6 acoplado a agarosa se incubó con el lisado de *T. cruzi* previamente aclarado con agitación suave durante 1 h a 4 °C. Después de los lavados, las proteínas unidas se eluyeron con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,0, y se neutralizó inmediatamente con el agregado de 5 µL de Tris-HCl 1 M, pH 9,0, para evitar la degradación de las proteínas.

Las fracciones eluídas se resuspendieron en *buffer* de muestra 5X (provisto por el fabricante), y fueron resueltas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, como se describe más abajo. Las bandas inmunoprecipitadas detectadas por tinción del gel con Azul de Coomassie G-250 se cortaron y analizaron con LC-MS/MS en *FingerPrints Proteomic Facility*, Universidad de Dundee, Escocia.

5.7 Preparación de células bacterianas competentes.

5.7.1 Competentes químicas

Para la preparación de bacterias competentes, se partió de una colonia aislada y se inició con ésta un cultivo de 10 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes a la cepa utilizada. El cultivo se incubó ON a 37 °C y en agitación a 180 rpm. Al día siguiente, se inocularon 100 mL de medio LB con una dilución 1/100 del cultivo anterior. El cultivo se mantuvo con agitación de 180 rpm a 37 °C hasta alcanzar una DO a 600nm de 0,4-0,5. Alcanzada dicha DO, las células reposaron en hielo durante 20 min para ser luego centrifugadas en frío a 4000 rpm durante 10 min. Luego, se removió el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 20 mL del *buffer* TBFI previamente enfriado. El procedimiento de centrifugación y lavado del *pellet* se repitió dos veces, utilizando igual volumen (20 mL) o un cuarto del volumen inicial de TBFI. Finalmente, el sedimento resultante se resuspendió en 5 mL de TBFI. Las células se fraccionaron en alícuotas de 50 µL, se congelaron rápidamente en N₂ y se guardaron a -80 °C.

5.8 Transformación de células bacterianas competentes.

Un total de 50 μ L de bacterias competentes fueron transformadas con 5 μ L del producto de ligación o con 50 ng de vector circularizado, según correspondiera. Luego de incubar 30 min en hielo, se realizó un shock térmico incubando las bacterias a 42 °C durante 1 min e inmediatamente incubando en hielo por 3 min. Posteriormente, se agregaron 800 μ L de medio LB y se incubó a 37 °C durante 1 h en agitación. Finalmente, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, se volcó el sobrenadante y el sedimento de bacterias se resuspendió en 50 μ L de medio LB y sembrado en medio LB agar, en presencia del antibiótico apropiado. Se sembró la totalidad del volumen de bacterias cuando se transformó con un producto de ligación y una dilución 1/10 cuando se transformó con un vector no digerido. Para los vectores pGEM-T Easy y pRSET-A, se utilizó ampicilina como agente de selección.

5.9 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.

5.9.1 Extracción de ADN genómico de *T. cruzi* y *L. tarentolae*

Un cultivo de 3-4 mL de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL Brener y Dm28c) o promastigotes de *L. tarentolae*, en fase logarítmica tardía, fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 min y lavado dos veces con PBS 1X frío. Los parásitos se resuspendieron en 200 μ L de PBS 1X y se les extrajo el ADN genómico utilizando el kit comercial *High Pure PCR Template Preparation* (Diagnostics Corp., Indiana, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron rendimientos típicos de 20-30 ng/ μ L y las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

5.10 Preparación de ADN plasmídico.

5.10.1 Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala o *Miniprep*

Para la extracción de ADN plasmídico en pequeña escala, se inoculó una colonia aislada en 5 mL de medio LB suplementado con el/los antibióticos correspondientes, y se incubó a 37°C ON en agitación (180 rpm). Al día siguiente, se cosecharon las bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. Posteriormente, los plásmidos se obtuvieron utilizando el sistema de purificación QIAGEN *plasmid purification* (QIAGEN, Helden, Alemania), de acuerdo con el protocolo suministrado

con el mismo. Finalmente, el ADN se resuspendió en 20 μ L de H₂O miliQ estéril y la cantidad de ADN se cuantificó por métodos cromatográficos y por gel, como se describe en el ítem 2.9. Los rendimientos obtenidos fueron > a 200 ng/ μ L.

5.10.2 Aislamiento de ADN plasmídico a mediana escala o *Midiprep*.

En los casos en donde se requirió concentraciones mayores de ADN plasmídico, se inocularon las colonias en 50 mL de medio LB que contenía los antibióticos correspondientes y el cultivo permaneció en agitación (180 rpm) ON a 37 °C. Las bacterias se cosecharon al día siguiente por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min y la extracción del ADN plasmídico se realizó utilizando el kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). Se obtuvo un rendimiento > 400 ng/ μ L.

5.11 Reacciones en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR para amplificar los ORFs D1, D3, D4, D5 y D6 se realizaron a partir de 10-25 ng de ADN genómico de *T. cruzi*, cepa CL Brener utilizando la enzima EasyTaq ADN polimerasa. Por su parte, los ORFs D5-CIT y D5-SEC se amplificaron a partir de ADN genómico de *T. cruzi*, cepa Dm28, empleando la enzima Q5® High-Fidelity ADN polimerasa. En todos los casos, la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ L de acuerdo con el protocolo para EasyTaq y Q5® High-Fidelity polimerasas, respectivamente. Cada reacción constaba de los componentes enumerados en la **Tabla 6**.

Componente	Concentración Inicial	Concentración Final
DNTPs	10 mM de cada uno	200 μ M
Buffer de reacción	5X o 10X	1X
Cebador <i>forward</i>	5 μ M	0.5 μ M
Cebador <i>reverse</i>	5 μ M	0.5 μ M
EasyTaq/Q5 High Fidelity ADN Polymerase	5 U/ μ L	1 μ L
ADN	-	10-25 ng
H ₂ O libre de nucleasas	-	csp para 25 μ L

Tabla 6. Mezcla de reacción para una PCR con ADN genómico o plasmídico como plantilla.

Todas las reacciones de PCR se efectuaron en el termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, California, EE. UU.). La reacción se realizó según las condiciones enumeradas en la **Tabla 7**, repitiéndose los pasos 2 a 4 durante 30-40 ciclos. La temperatura de hibridación fue determinada para cada par de cebadores correspondientes. Además, cabe aclarar que cada par de cebadores lleva adicionado en sus extremos 5' y 3' sitios de cortes específico para endonucleasas de restricción, que permiten su clonado direccional en los vectores de expresión pRSET-A o pLEXSY-Ible3. Estos sitios junto con las secuencias específicas de cada cebador y las condiciones de ciclado para cada ORF se enumeran en la **Tabla 1 y 2** del Apéndice.

Etapas	Temperatura	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	95 °C	3 min
2. Desnaturalización	95 °C	30 seg
3. Hibridación de cebadores	58-65 °C	1 min
4. Extensión	72 °C	30 seg por cada kb
5. Extensión final	72 °C	10 min

Tabla 7. Condiciones de termociclado.

5.12 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

Los fragmentos de ADN se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 1 % en *buffer* TAE 1X. Cada 40 mL de agarosa se agregó 3 µL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) 10 mg/mL. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con *buffer* de carga de ácidos nucleicos 6X y se sembraron junto a estándares de PM de ADN. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (100-120 V) en una cuba horizontal (SubCell®GT agarose gel electrophoresis system, Bio-Rad) cubierta con *buffer* TAE 1X. Para los geles analíticos se utilizaron 10 µL de la muestra, mientras que para los geles preparativos se utilizaron 60 µL. El ADN se visualizó en un transiluminador de emisión UV a 302 nm (Syngene). Las imágenes de los geles se guardaron en formato digital.

5.13 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Los productos de amplificación por PCR y de reacciones de digestión enzimática se purificaron a partir de geles de agarosa. Para ello, se realizó una electroforesis de

ADN, tal como se describe en la sección **5.12**, y la banda del tamaño esperado se escindió del gel utilizando un bisturí, observándose bajo luz UV. Posteriormente, la purificación se llevó a cabo utilizando el kit “Wizard® SV Gel Clean-Up System” (Promega, Madison, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.14 Digestión de ADN.

La digestión de fragmentos de ADN se realizó de forma analítica y preparativa. El gel analítico se usó para comprobar el patrón plasmídico correcto después de la digestión del ADN, y el gel preparativo se usó para aislar el fragmento de ADN deseado después de la digestión del vector o del producto de PCR.

Una digestión preparativa contenía los reactivos que se enumeran en la **Tabla 8**.

Componente	En 50 µL
ADN	1 µg
Enzima de restricción	10 U
<i>Buffer</i> de digestión	5 µL
H ₂ O miliQ csp	50 µL

Tabla 8. Composición de una digestión de restricción para plásmido de ADN o producto de PCR.

Después de una incubación durante 1 h a 37 °C, la digestión del ADN se detuvo por inactivación de la enzima a 65 °C durante 20 min, se mezcló con volumen adecuado de *buffer* de carga de ácidos nucleicos 6X y se corrió en un gel de agarosa (ver sección **5.12 Electroforesis de ADN en gel de agarosa**). La banda de interés se escindió y se purificó del gel, según ítem detallado a continuación.

Nota: La enzima SwaI tiene un tiempo de incubación para la digestión eficiente de 24 h a 25 °C en *buffer* NEB 3.1. El resto de las enzimas de restricción empleadas en la presente Tesis fueron incubadas en el *buffer* CutSmart.

5.15 Cuantificación de los ácidos nucleicos y plásmidos.

Para conocer la concentración de ADN nucleico o plásmido en solución, se midió absorbancia a 260 utilizando el equipo Nanodrop1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU), y se calculó su pureza por la determinación de la proporción DO a 260 nm/280 nm y DO a 230 nm/280 nm. Paralelamente, también se realizó la cuantificación por gel, corriendo alícuotas electroforéticamente en geles de agarosa y comparando la intensidad de banda con los estándares de PM de ADN.

5.16 Reacción de ligación.

La reacción de ligación se realizó con tres relaciones molares diferentes de inserto a vector. Las proporciones fueron: inserto a vector 3:1 y 6:1, utilizando 50 ng de vector. La cantidad necesaria de inserto de ADN en relación a la cantidad de vector se calculó de acuerdo con la Ecuación 1. El volumen de reacción fue de 10 µL en un tubo de PCR, que contenía el ADN, 5 µL de buffer de ligación 2X, 1 µL de ligasa T4 y H2O miliQ estéril hasta un volumen total de 10 µL.

$$m_{inserto}[ng] = \frac{m_{vector}[ng] \cdot l_{vector}[pb] \cdot fe}{l_{inserto}[pb]}$$

Ecuación 1. Cálculo de la cantidad de ADN de inserto necesaria ($m_{inserto}$). m_{vector} , masa de vector; l_{vector} , el largo del vector en pb; Fe, determinado por la relación de vector:inserto, factor de exceso inserto/vector; $l_{inserto}$, largo del ADN inserto en pb.

5.17 Clonado de los ORFs

Se utilizaron ORFs amplificados por PCR y purificados de geles de agarosa. Para el caso de los fragmentos clonados en el vector pGEM®-T Easy, se utilizó la enzima ADN polimerasa EasyTaq ya que añade un residuo de adenina a los extremos 5' de todos los productos de PCR. En todos los casos, se verificó la identidad de los ORFs en cada plásmido por secuenciación (Macrogen, Corea del Sur).

- **Clonado a pGEM®-T Easy:** Se empleó este plásmido para el clonado directo de los ORFs: D1, D3, D4, D5 y D6, amplificados por PCR. Se utilizaron los reactivos del kit pGEM®-T Easy (Promega, Madison, EE. UU.). Se transformaron bacterias competentes químicas DH5α (ver sección **5.8 Transformación de células**

bacterianas competentes) con los 10 μ L totales de reacción de ligación y se plaquearon en LB-Agar/Ampicilina/IPTG/X-Gal. Para confirmar que las colonias obtenidas contenían el vector pGEM-T con los insertos, se seleccionaron las de color blanco (de acuerdo con lo establecido por el mecanismo de α -complementación), y se sub-cultivaron en tubos falcon con 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/mL) a 37 °C. Como control, se picó una colonia azul (o de un plásmido sin inserto). De los cultivos, se realizó extracción de ADN plasmídico (ver sección **5.10.1. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala o Miniprep**) y de éste, 3-5 μ L se sembraron en un gel de agarosa. En los casos en los que el tamaño de ADN plasmídico de las muestras de posibles recombinantes fuera mayor al del control sin inserto, 5 μ L de la extracción fueron utilizados como templados para una doble digestión enzimática con las enzimas específicas de cada ORF y a una PCR con cada par de cebadores específicos, a fin de confirmar su positividad. Los 10 μ L restantes fueron enviados a secuenciación para corroborar su identidad.

- **Clonado a pLEXSY-Ible3:** Se empleó este plásmido para la expresión eucariota de los ORFs: D5-CIT y D5-SEC. Los cebadores *forward* y *reverse* contenían sitios específicos de restricción para insertar estos fragmentos en el plásmido pLEXSY-Ible3 (ver **Tabla 2**, Apéndice). Por lo tanto, para la obtención de los constructos, tanto el plásmido como los productos de PCR de cada fragmento, fueron digeridos con las correspondientes enzimas de restricción, y los fragmentos se resolvieron por electroforesis de agarosa, purificándose las bandas correspondientes a cada inserto y al plásmido linealizado. Para la ligación, se utilizó una relación molar inserto: vector de 6:1, y se siguió el protocolo explicado en la sección 5.16 (**Reacción de ligación**). Se transformaron bacterias competentes químicas DH5 α (ver sección **5.8 Transformación de células bacterianas competentes**) con los 10 μ L totales de reacción de ligación y se plaquearon en LB-Agar/Ampicilina. La identificación y confirmación de colonias positivas se llevó a cabo siguiendo un procedimiento similar al descrito anteriormente, aunque en esta ocasión se seleccionaron colonias al azar debido a la ausencia del mecanismo de α -complementación en este plásmido.

5.18 Sub-clonado de ORFs.

- **Subclonado a pRSET-A:** Los ORFs clonados en el plásmido pGEM-T fueron transferidos al plásmido de expresión procariota pRSET-A. Para ello, tanto las construcciones pGEM-T-D1, pGEM-T-D3, pGEM-T-D4, pGEM-T-D5 y pGEM-T-D6, como el vector pRSET-A vacío fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción elegidas para el clonado (ver **Tabla 1**, Apéndice). Luego de la purificación de cada inserto, éstos se ligaron en reacciones independientes al vector linealizado pRSET-A. En todos los casos, se utilizó para la ligación una relación molar 3:1 y se siguió el protocolo explicado en el ítem 6.8 (Reacción de ligación). Se transformaron bacterias competentes químicas BL21 Rosetta (DE3) pLysS (ver sección **5.8 Transformación de células bacterianas competentes**) con los 10 µL totales de reacción de ligación y se plaquearon en LB-Agar/Ampicilina/Cloranfenicol. El rastreo de las colonias positivas se realizó por digestión con las enzimas de restricción especificadas para cada ORF.

Vectores generados para expresión en *E. coli* BL21.

- pRSET-A-D1 (N-6xHis tag).
- pRSET-A-D3 (N-6xHis tag).
- pRSET-A-D4 (N-6xHis tag).
- pRSET-A-D5 (N-6xHis tag).
- pRSET-A-D6 (N-6xHis tag).

Vectores generados para expresión en *L. tarentolae*.

- pLEXY-Ible3-D5 (C-6xHis tag).

5.19 Generación de cepas de *L. tarentolae* recombinantes.

5.19.1.1 Preparación de los plásmidos transfectantes.

Midi-preparaciones de los constructos pLEXY-Ible3-D5/CIT y pLEXY-Ible3-D5/CIT se digirieron con la enzima de restricción SmaI para obtener el vector lineal (ver sección **5.14 Digestión de ADN**). Como control de efectividad del corte, las digestiones se corrieron en un gel de agarosa y se realizó una purificación mediante el kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) (ver sección

5.10.2. Aislamiento de ADN plasmídico a mediana escala o Midiprep) y se concentró mediante evaporador de vacío o Speedvac.

5.19.2 Transfección y selección de parásitos.

El día previo a la transfección, cultivos de *L. tarentolae* en fase logarítmica de crecimiento se diluyeron 1:10. Luego, se tomaron 10 mL de cultivo por cada plásmido a transfectar, se colectaron por centrifugación a 2000 rpm durante 3 min y se resuspendieron en 350 µL de medio BHI base. Para cada transfección, la suspensión parasitaria se incubó 10 min en hielo con el agregado de 10 µg de ADN plasmídico (tal como se describió en el párrafo anterior (sección **5.19.1.1**), en un volumen máximo de 40 µL. Estas mezclas se transfirieron a cubetas de electroporación de 0,2 cm de ancho y se les aplicó un pulso de 450 V y 450 µF, utilizando el equipo Gene Pulser II (Bio-Rad, California, EE. UU.). Se removieron las cubetas del equipo, se las incubó en hielo durante 10 min y la muestra se transfirió a botellas de cultivos conteniendo 7 mL de medio BHI-completo. Se incluyeron controles transfectando parásitos con 40 µL de H₂O miliQ estéril, sin plásmido recombinante. Los parásitos se incubaron por 20 h a 28 °C y, transcurrido ese tiempo, se le agregó el antibiótico de selección, Bleomicina.

A partir del agregado del antibiótico de selección, se realizaron diluciones 1:10 de los cultivos en medio fresco, hasta observar ausencia de crecimiento en el control de transfección. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 28 °C sin agitación.

5.20 Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.

5.20.1 Prueba piloto de expresión.

Para cada proteína se realizó una prueba piloto de expresión a fin de determinar el tiempo óptimo de inducción. Para ello, se inoculó 5 mL de medio líquido LB-Ampicilina/Cloranfenicol con una colonia de *E. coli* cepa BL21 transformada con el plásmido de expresión. Se creció el cultivo ON a 37 °C con agitación y luego, se utilizaron 500 µL para inocular 5 mL de medio LB-Ampicilina/Cloranfenicol (dilución 1/10). Cuando el cultivo alcanzó una DO a 600 nm de 0,4-0,6 se retiró una alícuota de 1 mL, que representó el tiempo cero de inducción. Se indujo la expresión

de las proteínas con IPTG 1 mM y se tomó 1 mL de alícuota a distintos intervalos de tiempo (1, 2, 4 y 16 h) y se midió su DO a 600 nm en espectrofotómetro de cubetas Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, EE. UU.). Las alícuotas se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min a 4 °C y se lisó el sedimento bacteriano en 50 µL de *buffer* de siembra de proteínas 1X. A fin de normalizar el número de bacterias que expresan la proteína recombinante y sembrar en cada calle la misma cantidad, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{6}{DO} = \mu L \text{ a sembrar por calle}$$

Para el análisis, las muestras se hirvieron durante 5 min y se sembraron en un gel SDS-PAGE 10-12%.

5.21 Obtención de proteínas recombinantes.

Una vez determinado el tiempo de inducción óptimo para cada proteína, se procedió a inocular 40 mL de medio LB-Ampicilina/Cloranfenicol con una colonia transformada conteniendo el plásmido de expresión. Este cultivo se incubó ON a 37 °C. Posteriormente, se empleó este cultivo para inocular 400 mL de LB-Ampicilina/Cloranfenicol, diluyendo 1/10, y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,4-0,6. En términos generales, la expresión de las proteínas se indujo con IPTG 1 mM durante 4 h a 37 °C. Sin embargo, para la proteína D3-6xHis, la inducción se realizó a igual concentración de IPTG, pero durante 16 h a 21 °C. En todos los casos, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm a 4 °C en una centrifuga Sorvall RC-5C PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). El sedimento resultante fue procesado inmediatamente o, caso contrario, se reservó a -80 °C hasta su utilización.

5.22 Lisis bacteriana en condiciones desnaturalizantes.

El sedimento anterior se incubó en hielo durante 30 min y se resuspendió en 2-5 mL de solución I por cada g de peso húmedo. Posteriormente, se agregó lisozima en una concentración final de 1 mg/mL y se mantuvo en hielo por 30 min más.

Pasado ese tiempo, la muestra se sometió a sonicación 5 veces a una potencia de 200-300W durante 10 seg, intercalando con 10 seg de incubación en hielo. Luego, se centrifugó por a 10.000 rpm por 10 min a TA y se reservó el sobrenadante para continuar con el protocolo de purificación (ver sección **5.23 Purificación de proteínas de fusión a un tag de histidinas por resinas de agarosa Ni-NTA**).

5.23 Purificación de proteínas de fusión a un tag de histidinas por resinas de agarosa Ni-NTA.

La purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad de níquel en un sistema de incubación en batch en condiciones desnaturalizantes y elución de flujo por gravedad. Para ello, se añadió 1 mL de resina de agarosa 50% Ni-NTA por cada 4 mL de sobrenadante obtenido (ver sección **5.22**) y se incubó durante 60 min a 200 rpm en el agitador rotativo PTR-35 (Grant-Bio). Transcurrido ese tiempo, la mezcla anterior se transfirió a una columna de cromatografía Poly-Prep® (Bio-Rad, California, EE. UU.). Se descartó el sobrenadante y se lavó la resina 2 veces con 3 mL de la solución II. Finalmente, se procedió a la elución de la proteína recombinante unida a la resina, a través de su tag de histidinas, empleando un esquema de dos pasos: 4 eluciones iniciales con 500 µL de solución III seguido por 4 eluciones finales con 500 µL de solución IV. Cada eluido se alicuotó en fracciones de 10 µL y se conservó a -80 °C. Una fracción de ellos (20%) se sometió a liofilización.

5.24 Análisis de proteínas.

5.24.1 Cuantificación de proteínas.

Se utilizó el protocolo original descrito por Bradford (Bradford, 1976). En placas de 96 pocillos se incubó 10 µL/pocillo de una dilución 1/5, 1/10 y 1/20 de cada muestra (según corresponda) y se agregó 200 µL/pocillo del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se realizó un duplicado de cada muestra y se midió absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, EE. UU). Para la construcción de una curva de calibración se utilizó como estándar a la proteína BSA (del inglés, *bovine serum albumin*) (0,01-1 mg/mL), y sobre la base de la misma se determinó la concentración proteica de las muestras.

5.24.2 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Las proteínas se resolvieron por medio de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS), empleando cubas verticales Mini-PROTEAN (Bio-Rad, California, EE. UU.) (Laemmli, 1970). Los geles se polimerizaron sobre placas de vidrio de 7,3 x 10,1 cm y 8,3 x 10,1 cm, con separadores de 1,5 mm. Las muestras para analizar se prepararon con el volumen correspondiente de *buffer* de siembra 5X y se hirvieron por 5 min. Se utilizaron geles de “*stacking*” de 3% poliacrilamida, y diferentes geles separadores (o de resolución) de 8, 10 o 12% de poliacrilamida, según los pesos moleculares de las proteínas a separar. En todos los casos, se utilizó una solución madre conteniendo acrilamida 29,2% (p/v) y bis-acrilamida 0,8% ((p/v)).

Las corridas electroforéticas se desarrollaron a TA, aplicando un voltaje constante de 90 V durante aproximadamente 30 min, hasta que las proteínas atravesaron el gel de “*stacking*”; a continuación, se utilizó un voltaje constante de 120 V hasta que el frente de corrida -indicado por el azul de bromofenol- se localizara a aproximadamente 1 cm del extremo inferior del gel separador.

Los estándares de peso molecular de proteínas utilizados cubren los rangos de 10 a 315 KDa.

5.25 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

5.25.1 Tinción con reactivo de Coomassie Blue.

El gel de poliacrilamida se sumergió en la solución de tinción de Coomassie blue ON con agitación suave. Se destiñó utilizando H₂O hasta la visualización de las bandas.

5.25.2 Tinción con reactivo de Coomassie Blue compatible con espectrometría de masas.

En los casos donde se analizaron las bandas proteicas para su identificación por espectrometría de masas (LC-MS/MS), se realizó una tinción con Coomassie blue coloidal. Para ello, se fijaron las proteínas dejando el gel en solución fijadora 30%

etanol, 2 % ácido fosfórico ON, se lo lavó 3 veces por 30 min con H₂O_d y se agregó la solución de tinción 18 % metanol, 17 % (NH₄)₂SO₄ en agitación por 30 min. Luego, se agregó 0.5% (p/v) de Coomassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich) a la solución de tinción con agitación durante dos días. Se lavó el gel con H₂O_d y se cortaron las bandas de interés con un escalpelo limpio. Estas bandas fueron analizadas con LC-MS/MS en *FingerPrints Proteomic Facility*, Universidad de Dundee, Escocia.

5.26 Western-Blot (WB).

Las muestras para analizar por WB fueron resueltas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, como se indica en la sección 5.24.2, y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C®, Amersham) durante 1 h a 250 mA constantes en *buffer* de transferencia, de acuerdo con la técnica descrita por Towbin y col. (Towbin, Staehelin y Gordon, 1979). Luego las membranas se sumergieron en solución de Rojo Ponceau S durante 5 min a TA. Las bandas correspondientes a las proteínas transferidas a la membrana se visualizaron por desteñidos sucesivos con H₂O_d. Seguidamente, se procedió a bloquear los sitios de unión inespecíficos por incubación con una solución de bloqueo (5% (p/v) de leche en polvo en *buffer* TBS TW). Las membranas bloqueadas se incubaron con el Ac primario correspondiente diluido en solución de bloqueo BSA-TBS por 1 h a TA o a 4 °C ON en agitación. Al otro día, las membranas se lavaron 3 veces con *buffer* TBS TW y se incubaron con el Ac secundario correspondiente conjugado a HRP disuelto en solución de bloqueo BSA-TBS, durante 1 h a TA y en agitación. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 10 min cada uno, 3 veces con TBS TW, y una última vez con TBS 1X. Las bandas inmunorreactivas se detectaron por quimioluminiscencia sustrato ECL o bien incubadas con una solución de dextrán sulfato durante 5 min en agitación para ser reveladas con TMB (sustrato de la enzima HRP), en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La reacción se detuvo con H₂O_d.

5.27 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes axénicos de *T. cruzi* (cepa Dm28c) y promastigotes de *L. tarentolae* recombinantes fueron recolectados, lavados 3 veces con PBS 1X, adheridos a portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich)

y fijados durante 30 min con PFA-PBS. A continuación, los parásitos fijados se permeabilizaron o no con PBS-Tritón durante 2 min, se bloquearon con BSA-PBS durante 30 min, y luego se incubaron toda la noche con los Acs chim m6B6, anti-TcCyp19 y Anti-His 6X. Después de 4 lavados con PBS 1X, los portaobjetos se incubaron durante 1 h con Acs secundarios anti-IgG de conejo (H+L) conjugado a Alexa Flúor 488 o anti-IgG de ratón conjugado a Cy3, ambos diluidos en 1:500 en BSA-PBS. Los portaobjetos se lavaron 4 veces con PBS 1X y se montaron con VectaShield (Vector Laboratories Inc., CA, EE. UU.) que contenía 300 ng/mL de DAPI para la tinción de ácidos nucleicos y se sellaron con esmalte. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 880 acoplado a un módulo AiryScan con objetivo de 63x.

5.28 Análisis de imágenes.

Todo procedimiento que haya implicado el análisis de imágenes se llevó cabo mediante el software utilizando el software ImageJ-Fiji (*National Institutes of Health*—NIH, Bethesda, MD, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>).

5.29 Población de estudio.

5.29.1 Dimensionamiento muestral.

El número de muestras a ensayar se dimensionó utilizando el software R versión 4.3.1 (Team, 2021), asumiendo una sensibilidad del 99% y una especificidad del 99% y adoptando un error absoluto del 2% y nivel de confianza del 95%.

5.30 Obtención de paneles serológicos.

Las muestras de plasmas de individuos *T. cruzi*-positivos de nacionalidad argentina (n = 191), boliviana (n = 53) y paraguaya (n = 14) fueron obtenidas por el personal médico del Servicio de Cardiología del Hospital General de Agudos “Dr. Ramos Mejía”, el Instituto Nacional de Parasitología (INP-ANLIS) “Dr. Mario Fatale Chabén” y el Hospital General de Agudos “Dr. Ignacio Pirovano”, tal como se detallada en la sección **5.1 Reclutamiento de pacientes y obtención de muestra**. Los plasmas de pacientes *T. cruzi*-positivos oriundos de México (n = 25), El Salvador

(n = 8), EE. UU (n = 6) fueron obtenidos gracias a la colaboración con el Dr. Fernán Agüero del Laboratorio de Genómica y Bioinformática (IIB – Universidad de San Martín), mientras que las muestras de pacientes colombianos fueron obtenidas a través de la colaboración con el Dr. Omar Triana de la Universidad de Antioquia. Finalmente, el ensayo de ELISA indirecto con las proteínas rTcD3 y rTcD6, empleando plasmas de individuos *T. cruzi*-positivos de regiones endémicas y no endémicas de Brasil (n = 450) fue realizado en Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) – (Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz-BA), bajo la dirección del Fr. Fred Luciano Neves Santos, en el marco de una beca UNU-BIOLAC. En todos los casos, se utilizaron muestras de sujetos negativos emparejadas al lugar de origen.

5.31 Ensayo Inmuno-enzimático indirecto (ELISA indirecto).

5.31.1 Estandarización de los componentes del ELISA indirecto.

Los ensayos de ELISA indirecto fueron primariamente estandarizados para determinar la concentración óptima de los antígenos rTcD3 y rTcD6, así como la mejor dilución del Ac secundario y de las muestras de plasma, utilizando un enfoque tablero de ajedrez o “*checkerboard titration*”. Esta matriz se basa en el cruce de variables utilizadas para ajustar la prueba, con el objetivo identificar las condiciones que mejor diferencian las muestras positivas de las negativas. Para ello, microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc-Greiner bio-one, Alemania) fueron sensibilizadas con 100 µL de *buffer* carbonato conteniendo diferentes cantidades de antígenos recombinantes (40, 30, 25, 20, 15 y 10 ng por pocillo). Luego de la adición de los antígenos, las placas fueron bloqueadas adicionando 100 µL de solución bloqueadora *WellChampion*TM (Ken-Em-Tec, Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) en cada pocillo y, después de un periodo de incubación de 15 min a TA, las microplacas se vaciaron mediante inversión, y se colocaron en una estufa a 37 °C durante 90 min para su secado. Al final de este tiempo, las microplacas estaban listas para su uso.

Para la estandarización de las muestras de plasmas, se utilizaron duplicados de muestras plasmáticas de cuatro individuos negativos y tres positivos para EChc diluidos a 50, 100, 200 y 400 veces, empleando el *buffer* PBS 1X. Dos pocillos

sensibilizados, pero sin adición de muestra de plasma (denominados blanco), fueron utilizados como control negativo para analizar la señal *background* de los antígenos.

Posterior al bloqueo, se agregaron a cada pocillo 100 μ L de las muestras de plasmas previamente diluidas. Las placas se sellaron e incubaron en estufa a 37 °C durante 60 min (Binder 9010, Thermo-Scientific, EE. UU.). Al final de este paso, las placas se lavaron cinco veces con adición de 300 μ L de *buffer* PBS-TW para eliminar el material no adsorbido. Luego se agregaron 100 μ L de Ac secundario diluido en PBS 1X en cada pocillo.

Para la estandarización del Ac secundario, éste fue evaluado a diluciones de 1:3.000, 1:6.000, 1:20.000, 1:40.000 y 1:80.000. Las microplacas se sellaron nuevamente y se incubaron en estufa a 37° C durante 30 min (Binder 9010, Thermo-Scientific, EE. UU.). Al final de la incubación, las microplacas se lavaron como se describió anteriormente. Después del segundo ciclo de lavado, se agregaron a cada pocillo 100 μ L de solución reveladora TMB Plus (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca). Después de 15 min y protegido de la luz, se añadieron 50 μ L de H₂SO₄ 0,5 M para detener la reacción. Luego se leyó la DO a 450 nm, utilizando un espectrofotómetro de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, EE. UU.).

5.32 Expresión y análisis de los resultados.

5.32.1 Determinación de la condición óptima.

Los valores de DO obtenidos de los pocillos denominados “blanco” se restaron de la DO de las muestras ensayadas. Posteriormente, se calcularon las medianas de los valores de DO de las muestras positivas y negativas, así como sus respectivas desviaciones estándares, utilizando el software R versión 4.3.1 (Team, 2021). Los criterios establecidos para determinar las mejores condiciones se basaron en relación señal/ruido o *signal-to-noise ratio* (S/N). Esta relación está definida como la mediana de la DO de las muestras positivas / mediana de las DO de las muestras negativas, ambos analizados en la misma placa. La mejor condición es aquella que presenta el valor más elevado de S/N *ratio* y en la que la mediana de la DO de las

muestras positivas sea mayor a 0,900 y la mediana de la DO de las muestras negativas sean menor a 0,250.

5.32.2 Determinación del punto de corte (CO).

Los puntos de corte se calcularon individualmente para cada microplaca, utilizando los mismos 5 controles positivos y negativos en cada una de ellas. Cada control está constituido, a su vez, por 5 muestras *T. cruzi*-positivas y negativas. Los valores de DO fueron exportados al software R versión 4.3.1 y analizados utilizando la función *cutpointr* del paquete *cutpointr* (Thiele y Hirschfeld, 2021). De esta manera, se calculó el área bajo la curva ROC (AUC), utilizando un intervalo de confianza del 95% [IC 95%] para obtener los valores del punto de corte (Greiner, Pfeiffer y Smith, 2000). Para la interpretación de los valores de AUC se consideraron excelentes: $1,00 \leq AUC \leq 0,90$; bueno: $0,90 < AUC \leq 0,80$; razonable: $0,80 < AUC \leq 0,70$; pobre: $0,70 < AUC \leq 0,60$ y malo: $0,60 < AUC \leq 0,50$ (Mandrekar, 2010).

5.32.3 Normalización de los datos.

Se realizó la normalización de los datos para evitar la variabilidad inherente a cada microplaca. Para ello, se calculó el índice de reactividad (IR) para cada muestra, como se describe a continuación:

$$\text{Índice de reactividad (IR)} = \frac{\text{DO de la muestra}}{\text{Valor de CO}}$$

Se consideraron negativas todas las muestras con un RI menor a 1,00 y positivas todas aquellas con un RI igual o mayor a 1,00 (Apéndice– Resultados). Las muestras que obtuvieron $RI = 1,0 \pm 10\%$ fueron consideradas en la zona gris (zona inconclusa). Para evitar errores sistemáticos, se estableció como criterio de repetición que todas las muestras con un RI entre 0,90 y 1,20, independientemente del estado serológico, fueran reevaluadas. Después de obtener los valores de RI para cada muestra, los resultados se representaron en gráficos utilizando R software versión 4.3.1.

5.32.4 Evaluación de parámetros de desempeño.

La evaluación del potencial diagnóstico de rTcD3 y rTcD6 se realizó utilizando parámetros que describen el desempeño del ensayo, como la sensibilidad, especificidad, precisión, índice de Younden (J), razones de verosimilitud e índice de Kappa de Cohen, junto con sus intervalos de confianza (Ouchchane *et al.*, 2009). Para ello, se utilizaron tablas de doble entrada (tablas 2 x 2) relacionando los resultados obtenidos mediante el uso de las proteínas recombinantes con los obtenidos mediante el método *gold standard* previamente definido (**Figura 13**).

		ENFERMEDAD		
		Presente	Ausente	
PREDICCIÓN	Positiva	VP	FP	VP + FP VPP
	Negativa	FN	VN	FN + VN VPN
		A + C	B + D	
		Sensibilidad	Especificidad	

Figura 13. Combinación binaria entre los resultados probables obtenidos en una determinada prueba y el diagnóstico real de la enfermedad. FN, falso negativo; FP, falso positivo; VN, verdadero negativo; VP, verdadero positivo; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

A partir de esta tabla, es posible derivar ciertos conceptos y determinar parámetros de rendimiento, tales como:

- Verdaderos Positivos (VP):** son muestras que tienen un resultado positivo dentro del grupo muestral previamente diagnosticadas como positivas para la EChc.
- Verdaderos Negativos (VN):** son muestras que tienen resultado negativo dentro del grupo muestral previamente diagnosticado como negativo para la EChc.
- Falsos Positivos (FP):** son muestras que tienen un resultado positivo dentro del grupo muestral previamente diagnosticadas como negativas para la EChc.
- Falsos Negativos (FN):** son muestras que tienen un resultado negativo dentro del grupo muestral previamente diagnosticado como positivo para la EChc.

Por consiguiente, la sensibilidad (SEN) se establece como la probabilidad de que el resultado de la prueba sea positivo en muestras serológicamente positivas para la EChc, reflejando la cantidad total de predicciones correctas en relación con la cantidad real de muestras positivas. Evidentemente, cuanto más cerca esté la sensibilidad de 1 (o 100%), mejor será el rendimiento de la prueba. Esta probabilidad se define entre individuos enfermos y se estima según la siguiente fórmula:

$$SEN = \frac{VP}{VP + FN}$$

La especificidad (ESP) se define como la probabilidad de que un resultado sea negativo en la prueba entre las muestras serológicamente negativas para la EChc. Por lo tanto, esta propiedad expresa la cantidad total de pruebas correctamente negativas sobre el total de muestras negativas para la enfermedad. De manera similar a la sensibilidad, cuanto más cercana a 1 (o 100%) esté la especificidad, mejor será el rendimiento de la prueba. Esta probabilidad se define entre individuos no infectados y se estima según la fórmula a continuación:

$$ESP = \frac{VN}{VN + FP}$$

Los valores de los intervalos de confianza al 95% [IC 95%] para la sensibilidad y especificidad se calcularon utilizando las fórmulas que se presentan a continuación:

$$[IC\ 95\%] = \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{SEN \times (1-SEN)}{NE}} \text{ y } [IC\ 95\%] = \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{ESP \times (1-ESP)}{NI}}$$

Donde:

NE: Número de individuos con EChc.

NI: Número de individuos no infectados.

La precisión diagnóstica (ACC) es un parámetro que se refiere a los resultados correctamente clasificados (VP y VN) dentro del conjunto de muestras evaluadas, es decir, representa la proporción de diagnósticos correctos. Su valor oscila entre 0 y 1, siendo 1 (o 100%) la ausencia de resultados falsos positivos y falsos negativos. Se calcula según la siguiente fórmula:

$$ACC = \frac{VP + VN}{VP + VN + FN + FP}$$

El índice de Youden (J) (Youden, 1950; Schisterman *et al.*, 2005) se empleó como un parámetro para evaluar la precisión de una prueba diagnóstica. Su rango va de -1 a 1, indicando que los valores cercanos a 1 representan la ausencia de resultados falsos negativos y falsos positivos (una prueba perfecta). El cálculo de este índice se realizó de la siguiente manera:

$$J = SEN + ESP - 1$$

Los índices de verosimilitud (RV) se definen como cuántas veces más o cuantas veces menos probable es que se identifique un determinado resultado de una prueba en individuos enfermos en comparación con los individuos que no padecen la EChc. En otras palabras, una "razón de probabilidad" es la probabilidad de que una persona con la enfermedad presente un resultado determinado en la prueba, dividida por la probabilidad de que un individuo sin la enfermedad muestre ese mismo resultado. Estos parámetros tienen la característica de reunir los valores de SEN y ESP en un único estimador, constituyendo una medida global del poder de discriminación de una prueba diagnóstica. Por lo tanto, una nueva prueba diagnóstica será inútil si $RV = 1$ al no discriminar entre positivos y negativos. La prueba es mejor, más útil y discrimina más cuando los valores de RV difieren de 1. Según la **Tabla 9**, los valores de RV superiores a 1 indican una mayor probabilidad de que la enfermedad esté presente; Los valores inferiores a 1 indican que la nueva prueba no añade valor diagnóstico.

RV positivo	RV negativo	Utilidad
>10	<0,1	Altamente relevante
5-10	0,1-0,2	Buena
2-5	0,5-0,2	Regular
<2	>0,5	Mala

Tabla 9. Rangos de valores de razones de verosimilitud y su impacto en utilidad clínica.

Los exámenes diagnósticos dicotómicos ofrecen dos coeficientes de probabilidad: el RV positivo (RV+) indica el aumento en la probabilidad de un resultado positivo en muestras positivas (sensibilidad), en comparación con muestras negativas (complemento de especificidad). El RV negativo (RV-) muestra el incremento en la probabilidad de un resultado negativo en muestras positivas (complemento de sensibilidad), en contraste con muestras negativas (especificidad). Estos parámetros se calcularon de la siguiente manera:

$$RV+ = \frac{SEN}{1-ESP} \quad y \quad RV- = \frac{1-SEN}{ESP}$$

Por último, se calculó el *Diagnostic Odds Ratio* (DOR) que es una métrica integral de la precisión diagnóstica empleada para evaluar en términos generales la capacidad discriminativa de los procedimientos de diagnóstico. El DOR de una prueba representa la relación entre las probabilidades de obtener un resultado positivo en individuos con la enfermedad en comparación con las probabilidades en individuos sin la enfermedad (Glas *et al.*, 2003). Sus valores oscilan entre 0 e ∞ . Cuanto más alto sea su valor, mayor poder discriminativo presenta la prueba. Su cálculo se realiza utilizando la fórmula:

$$DOR = \frac{\left(\frac{TP}{FN}\right)}{\left(\frac{FP}{TN}\right)} \quad y$$

$$[IC\ 95\%] = [e^{\ln(DOR) \pm 1,96 \sqrt{\left(\frac{1}{TP}\right) + \left(\frac{1}{FN}\right) + \left(\frac{1}{FP}\right) + \left(\frac{1}{TN}\right)}}]$$

5.32.5 Cálculo del índice Kappa

La concordancia entre el rTcD3/rTcD6-ELISA y las pruebas de referencia se determinó utilizando el análisis del coeficiente Kappa (κ) de Cohen. Este coeficiente tiene un valor máximo de 1,00, que indica un acuerdo total entre las evaluaciones, y un valor mínimo de cero, que señala la ausencia de acuerdo entre las evaluaciones. La interpretación del índice κ es la siguiente: $\kappa = 1,0$ (acuerdo perfecto), $0,99 \leq \kappa \leq 0,81$ (acuerdo casi perfecto), $0,80 \leq \kappa \leq 0,61$ (acuerdo sustancial), $0,60 \leq \kappa \leq 0,41$ (acuerdo moderado), $0,40 \leq \kappa \leq 0,21$ (acuerdo justo), $0,20 \leq \kappa \leq 0$ (ausencia de acuerdo), $\kappa = 0$ (acuerdo débil). Los valores del índice κ y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC95%) se calcularon como se describe a continuación:

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Pe} \quad y \quad [IC\ 95\%] = \kappa \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{Po(1-Po)}{n(1-Pe)(1-Pe)}}$$

Donde:

Po: Probabilidad observada.

Pe: Probabilidad esperada.

5.32.6 Análisis en serie y paralelo

Para evaluar mejor el rendimiento diagnóstico de las proteínas rTcd3 y rTcd6, se emplearon múltiples estrategias de pruebas (enfoques en serie y en paralelo), considerando las características de las pruebas individuales. Es posible organizar múltiples pruebas simultáneamente (pruebas en paralelo), donde un resultado positivo en cualquiera de las pruebas es indicativo de la enfermedad, o realizarlas secuencialmente (pruebas en serie), solicitando nuevas pruebas basadas en los resultados de las pruebas anteriores. En este caso, todos los resultados deben ser positivos para establecer un diagnóstico de enfermedad (Cebul, Hershey y Williams, 1982). Para este análisis se empleó la herramienta *on-line* EpiTools (<https://epitools.ausvet.com.au/>) (Sergeant, 2018).

5.33 Evaluación del potencial diagnóstico de rTcd3 y rTcd6.

5.33.1 Estudio de Fase I.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de los antígenos rTcd3 y rTcd6 para discriminar muestras serológicamente positivas para EChc de las negativas. Para ello, se utilizó un panel serológico caracterizado que incluía 333 muestras *T. cruzi*-positivas y 141 muestras *T. cruzi*-negativas. Las reacciones de ELISA indirecto se realizaron como se describió en la sección **5.31** Ensayo Inmunoenzimático indirecto (ELISA indirecto) anteriormente. Para cada uno de los antígenos se determinaron las medianas de los IR, así como los parámetros de desempeño.

5.33.2 Estudio de Fase II.

En la Fase II del estudio, se evaluó la capacidad diagnóstica de estos antígenos ampliando el panel serológico: 405 muestras positivas para la EChc y 536 muestras

de sujetos no infectados. Estas muestras se agruparon según sus regiones geográficas de origen. Nuevamente, las reacciones de ELISA indirecto se realizaron como se describió en la sección **5.31 Ensayo Inmuno-enzimático indirecto (ELISA indirecto)** y se determinaron las medianas de los IR, así como los parámetros de desempeño para cada antígeno.

5.33.3 Reacciones cruzadas.

Se llevó a cabo el estudio para evaluar posibles reacciones cruzadas de los antígenos rTcD3 y rTcD6 empleando plasmas de individuos positivos para las siguientes infecto-parasitarias: dengue, esquistosomiasis, estrongiloidiasis, filariasis, hepatitis B, hepatitis C, VIH, HTLV, leishmaniasis cutánea, leishmaniasis visceral, leptospirosis, lepra, rubéola, sarampión, sífilis, toxoplasmosis y COVID-19; pero negativo para enfermedad de Chagas. Las reacciones de ELISA se realizaron según lo descrito en la sección **5.31 Ensayo Inmuno-enzimático indirecto (ELISA indirecto)**, determinándose la mediana del IR para cada antígeno y los parámetros de desempeño. El estudio de reacciones cruzadas fue realizado en el laboratorio del Dr. Fred Luciano Neves Santos (Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz-BA), Brasil).

5.34 Análisis filogenético y predicciones *in-silico*.

Para el análisis filogenético de Tc323, se construyó la historia evolutiva de la proteína utilizando el software PhyML (versión 3.0) (Guindon *et al.*, 2010). Para este análisis, las secuencias se obtuvieron mediante búsquedas BLASTn dentro de la base de datos TriTrypDB (Aslett *et al.*, 2009) y NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando la secuencia de nucleótidos de Tc323 como consulta. La ausencia de secuencias homólogas en otras especies de Kinetoplastea se confirmó mediante búsquedas BLASTp, PSI BLAST y tBLASTn, utilizando todos los homólogos de Tc323 como entrada. La alineación de secuencias múltiples se realizó con el programa MAFFT (Katoh *et al.*, 2002), y la visualización y edición de resultados se llevaron a cabo con el software MEGA [versión X, Penn State, Filadelfia, PA, EE. UU.] (Kumar *et al.*, 2018). Finalmente, los filogramas se obtuvieron mediante el método de Máxima Verosimilitud, con el modelo *General Time Reversible* (GTR) según *Smart Model Selection* (SMS) (Lefort, Longueville y Gascuel, 2017).

El análisis de sintenia se realizó utilizando el software de sintenia simple (www.dveltri.com/simplesynteny/). Se utilizó un fragmento genómico de 38.5 kb (nucleótidos 426366 a 464886) del genoma de la cepa Y de *T. cruzi* (GenBank CM026649) como referencia. Los marcos de lectura abiertos presentes en esta región se utilizaron para identificar regiones de sintenia en las cepas *T. cruzi* Esmeraldo like (GenBank NW001849505), Bug2148 (GenBank NMZN01000123), Brazil (GenBank CM026605), S231 (GenBank OGCJ01000236) y *T. brucei* TREU927 (GenBank NT165288).

Los motivos de la proteína Tc323 se predijeron utilizando la herramienta en línea InterProScan (Paysan-Lafosse *et al.*, 2023). Se utilizó el servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu>) (Källberg *et al.*, 2014) para predecir los modelos estructurales tridimensionales. La calidad estereométrica de las estructuras de proteínas generadas se verificó mediante PROCHECK, utilizando el gráfico de Ramachandran (Laskowski *et al.*, 1993).

Se utilizó el servidor web HADDOCK (*High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing*) v.2.2 (van Zundert *et al.*, 2016) para realizar simulaciones de acoplamiento flexible entre el anticuerpo scFv 6B6 y la proteína Tc323 con parámetros de acoplamiento predeterminados (<https://wenmr.science.uu.nl>). El complejo acoplado se visualizó utilizando el software PyMOL (<https://pymol.org/2/>).

Para la predicción de epítopes de células B se utilizó la secuencia aminoacídica de Tc323 en la Base de Datos de Inmunoepítopes (IEDB) (<http://www.iedb.org>).

Por último, para el análisis de conservación de Tc323 entre cepas de *T. cruzi* se utilizó la cepa CL Brener como referencia, empleando el software Unipro UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012).

5.35 Caracterización estructural del N-glicoma de plasma de pacientes con EChc por cromatografía de ultra performance (HILIC-UPLC).

5.35.1 Liberación y derivatización de N-glicanos.

Las muestras de plasma (5 μ L) fueron reducidas, alquiladas en oscuridad e inmovilizadas en *buffer* de acrilamida según lo descrito por *Saldova et al.*, 2013. Luego, el gel se lavó intercaladamente con 1 mL de MeCN y con NaHCO₃ 20 mM (pH 7,2), repitiendo este proceso dos veces y descartando el sobrenadante. Al finalizar, el gel se secó en Speedvac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Luego, se añadieron 4 μ L de PNGasaF (Roche) en 61 μ L de una solución de NaHCO₃ 20 mM, y se procedió a incubar ON a 37°C. Los glicanos se extrajeron del gel por lavado con 200 μ L de H₂O miliQ por 20 min en sonicador. Este proceso se repitió dos veces, alternando entre H₂O miliQ y MeCN. Los N-glicanos fueron secados ON en Speedvac y luego se reconstituyeron e incubaron en ácido fórmico 1% (v/v) durante 40 min a TA, seguido de un nuevo secado en Speedvac. Posteriormente, los N-glicanos se disolvieron en 10 μ L de una solución de 2-AB (*Royle et al.*, 2008), y se incubaron durante 3 h a 65 °C. Para eliminar el exceso de 2-AB, se llevó a cabo una cromatografía en papel Whatman utilizando MeCN. Para recuperar los N-glicanos, se recortó la sección del papel y se lavó en el interior de una jeringa de 5 mL conectada a un filtro PTFE (0,45 μ m). Se llevaron a cabo 4 lavados con 500 μ L de H₂O miliQ, obteniendo finalmente 2 mL de solución que se secaron ON en Speedvac.

5.35.2 Cromatografía líquida de Ultra Performance de Interacción Hidrofílica (HILIC-UPLC).

Los N-glicanos obtenidos, como se describe en la sección anterior, se resuspendieron en 30 μ L de H₂O de calidad HPLC. Se tomó una muestra de 6 μ L, la cual se secó y luego se volvió a suspender en 20 μ L de una solución *buffer* compuesta por 30% de formiato de amonio 50 mM (pH 4,4) y 70% MeCN.

La separación de los N-glicanos se llevó a cabo a través de cromatografía líquida de ultra resolución con detección de fluorescencia (FLR λ_{ex} = 330 nm, λ_{em} = 420 nm), utilizando una columna BEH de glicanos (150 x 2.1 mm, 1.7 μ m, partículas híbridas de sílice y puente etilsiloxano, Waters, Milford, MA, USA) en un sistema

Acquity H-Class (Waters, Milford, MA, USA). Se utilizó formiato de amonio 50 mM (pH 4,4) como solvente A y MeCN como solvente B. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 40 °C, mientras que la temperatura de la muestra se estableció en 5 °C. El tiempo total de corrida fue de 45 min, dividido en varias fases: inicialmente, un gradiente de 70% de solvente A y 30% de solvente B con un flujo constante de 0,4 mL/min durante 2 min, seguido por la misma proporción a un flujo de 0,56 mL/min durante 30 min. Posteriormente, las proporciones se cambiaron a 55% de solvente A y 45% de solvente B, manteniendo el mismo flujo de 0,56 mL/min durante 4 min; finalizando con un nuevo cambio a 30% de solvente A y 70% de solvente B y un flujo final de 0,4 durante 4 min.

Todos los datos generados se analizaron mediante el software Waters Empower 3. Para la conversión de los valores de tiempo de retención a unidades de glicanos (UGs), se utilizó un estándar externo de dextrano parcialmente hidrolizado. Esto permitió la comparación reproducible de los picos con datos de literatura y bases de datos pertinentes (Royle *et al.*, 2006, 2008; Saldova *et al.*, 2014)

5.35.3 Cromatografía de Intercambio Aniónico Débil (HPLC-WAX)

Un total de 10 µL de glicanos marcados según el método descrito en la sección anterior se secaron y reconstituyeron en 10 µL de H₂O HPLC. En el proceso de separación, se empleó una columna BioSuite DEAE de 2.5 µm NP AXC con dimensiones de 4.6 x 35 mm (Waters, Milford, MA, USA) dentro de un sistema de separación Acquity H-class (Waters), equipado con un módulo de control de temperatura (Waters). El solvente A consistió en acetato de amonio al 50 mM (pH 7,0) diluido en un 20% (v/v) de MeCN, mientras que el solvente B fue una solución acuosa de MeCN al 20%. Se fijó la temperatura de la columna a 40° C y la de la muestra a 5° C.

Las condiciones del gradiente empleado fueron las siguientes: un gradiente lineal 0% -40% de solvente A durante 2 min a un flujo de 1 mL/min, seguido de una transición de 40% a 100% de solvente A durante 3 min, manteniéndose en 100% de solvente A durante 4 min. Posteriormente, se redujo la concentración de solvente A de 100% a 80% durante 0,5 min, culminando con una fase de 0% de solvente A

durante 3,5 min. Para la calibración del sistema, se empleó un estándar de N-glicanos de Fetuína. Las exoglicosidasas específicas para la confirmación estructural se detallan en la sección **4.3 Enzimas**.

5.36 Análisis estadístico.

Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.) y paquetes de código abierto de lenguaje R para aplicar las pruebas estadísticas pertinentes a cada caso, según se indica en Resultados. Se utilizó un nivel de significancia (α , probabilidad de cometer error de tipo I) de 0,05 en todas las pruebas estadísticas realizadas.

6. Resultados: Caracterización molecular de la proteína de unión al anticuerpo recombinante scFv 6B6 y validación de su eficacia para el diagnóstico serológico de la EChc.

6.1 Identificación de la proteína de unión al scFv 6B6.

Tal como se mencionó en la Introducción, uno de los anticuerpos aislados de las bibliotecas de Acs recombinantes de cadena simple (scFv) a partir de ADNc de células B de pacientes con EChc, fue el denominado scFv 6B6. Este anticuerpo reconoce una proteína de aproximadamente 300-320 KDa presente en lisado de epimastigote de *T. cruzi*. Con el propósito de identificar la proteína diana, se empleó un enfoque de inmunoprecipitación (IP) seguido por análisis de espectrometría de masas. Para ello, inicialmente se desarrolló un Ac 6B6 quimera (chim m6B6) que fusiona los dominios variables scFv 6B6 humano con los dominios constantes de IgG1k murinos. Esta elección se basó en la capacidad de la inmunoglobulina completa para ofrecer una mayor sensibilidad en los experimentos de IP en comparación con sus fragmentos (DeLuca *et al.*, 2021). El Ac chim m6B6 se generó en colaboración con el Dr. J. Raats, *ModiQuest Research-Monoclonal Antibody Generation Services, Nijmegen-Holanda*.

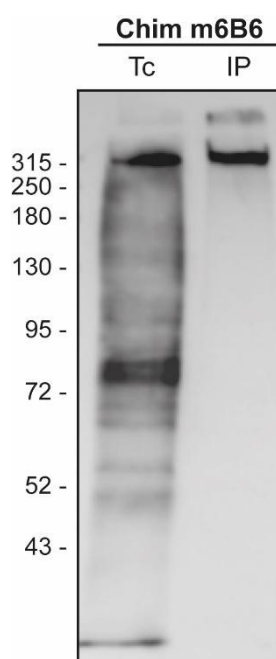


Figura 14. Reactividad del Ac quimera 6B6 IgG1/k. El extracto proteico de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL-Brener - Tc; 30 µg) y la proteína de unión a scFv 6B6 obtenida por inmunoprecipitación (IP; 10 µg) se sometieron a un SDS-PAGE (8%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con el Ac chim m6B6. La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. Los marcadores de peso molecular (expresados en kDa) se indican a la izquierda.

Luego de confirmar que el Ac chim m6B6 poseía la misma especificidad hacia el antígeno de *T. cruzi* que el scFv del cual derivaba (**Figura 14**), dicho Ac se acopló covalentemente a una resina de agarosa proteína A/G para la IP de la proteína diana a partir del lisado de epimastigotes de *T. cruzi*. Los eluidos se analizaron mediante SDS-PAGE con tinción de *Coomassie blue coloidal* y WB. La visualización de las proteínas en el gel reveló dos bandas principales: una del peso molecular esperado de ~315 kDa (a) que correspondía a la proteína de unión del Ac 6B6 y otra, de 50 kDa (b), resultante de la cadena pesada del Ac chim m6B6. La banda (a) fue reconocida específicamente por el scFv 6B6 en el WB (**Figura 15**). Posteriormente, las bandas se cortaron del gel, se sometieron a digestión proteolítica con tripsina y se analizaron mediante LC-MS/MS (**Figura 15**).

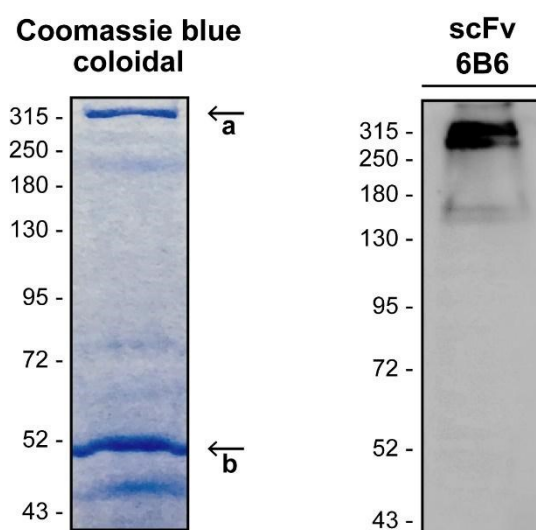


Figura 15. Identificación de la proteína de unión al Ac 6B6. El lisado de epimastigote de *T. cruzi* (cepa CL-Brener) se incubó con el Ac chim m6B6 unido covalentemente a la resina de agarosa Proteína A/G. Las proteínas retenidas fueron eluidas y separadas mediante SDS-PAGE (8%), seguido por la tinción de proteínas con *Coomassie blue coloidal* (panel izquierdo) o transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas con el Ac scFv 6B6 (panel derecho). Las flechas señalan la banda de proteína analizada por LC-MS/MS (**a**) y la cadena pesada del Ac chim m6B6 (**b**). Los marcadores de peso molecular (expresados en kDa) se indican a la izquierda.

A través de los espectros MS/MS se obtuvieron las masas peptídicas que se introdujeron en el motor de búsqueda MASCOT, posibilitando la identificación del Ag de unión al Ac 6B6. En total, se identificaron dos proteínas: una proteína hipotética de *T. cruzi* de 323 kDa (código de acceso **TcCLB.504087.20**; UniProtKB Q4D1D9) que presentaba altas puntuaciones y con un peso molecular esperado, y otra que correspondía a una proteína relacionada con la zona de unión flagelar de 180 kDa (código de acceso **Tc00.1047053509631.140**), cuyas puntuaciones fueron bajas y además no coincidía con el peso molecular esperado. Por lo tanto, se continuó con el estudio de la proteína de alto peso molecular, compuesta por 2983 aminoácidos, cuyos péptidos identificados mostraron una cobertura del 8% (**Tabla 10**). En lo sucesivo se hará referencia a esta proteína como Tc323.

Péptido	Posición en la secuencia de Tc323	Largo	PEP
WVPITSDESGPEGFIITER	215-233	19 aa	$2,13 \times 10^{-5}$
AVHTNVNDISQSEPLIAYVQGTAAETLKLAVV	269-300	32 aa	$9,61 \times 10^{-4}$
VTSLQGYQSGVVVGTTTR	688-704	17 aa	0,153
LLFQNGLTEEDEK	814-826	13 aa	0,120
CFNVDDPQGNPIR	1045-1057	13 aa	0,005
VFQSSIAIPWSAGK	1217-1230	14 aa	0,009
ASLLWTSDLNGER	1263-1275	13 aa	0,006
VAPGMGEALFAFGLGR	1353-1368	13 aa	0,146
AVDGAFEETALFQLK	1873-1886	14 aa	0,008
NDPLFVFAYPNGYR	2079-2091	13 aa	0,021
INTAMIDQEQR	2235-2246	11 aa	$7,23 \times 10^{-4}$
TLYVTTLDGIQSLRS	2482-2496	15 aa	0,165
MVTPSDVTIGPVR	2516-2528	13 aa	0,002
VGLFDASDGTGIMDLTSGK	2578-2596	19 aa	$3,02 \times 10^{-6}$

Tabla 10. Identificación de la proteína de unión al Ac scFv 6B6. Secuencias peptídicas identificadas mediante espectrometría de masas. Se indica su posición en Tc323, el largo (en aminoácidos, aa) y la probabilidad de error a posteriori (PEP, del inglés *Posterior Error Probability*).

Figura 16. Historia evolutiva de Tc323 en homólogos dentro del orden Tripanosomatida. Los números en las ramas indican la máxima probabilidad del respaldo de Bootstrap. Los códigos de acceso mostrados en el árbol pertenecen a TriTrypDB o NCBI. Las barras de escala horizontal representan 0,3 sustituciones por posición en la secuencia de ácido nucleico.

Cepa	Código del genoma	Cobertura (%)	Identidad de nucleótidos
TCC	GCA_003177095.1	100	97,97
S231	GCA_900252365.1	100	97,96
Dm28c	GCA_003177105.1	100	100
Brazil A4	GCA_015033625.1	100	100
JR	GCA_000331405.1	100	99,73
G	GCA_003719455.1	100	99,69
Sylvio X10/1	GCA_000188675.2	100	99,71
Y	GCA_002749425.1	100	99,71
Bug2148	GCA_002749415.1	100	99,66
CL Brener Esmeraldo-like	GCA_000209065.1	100	97,97
S154a	GCA_003594715.1	100	97,41
S11	GCA_003594385.1	100	97,74
Berenice	GCA_013358655.1	100	97,15
S23b	GCA_003594425.1	100	97,19
S92a	GCA_003594445.1	100	97,15
S15	GCA_003594585.1	100	97,43
S44a	GCA_003594705.1	100	97,48
S162a	GCA_003594605.1	100	97,13

Tabla 11. Identidad de secuencia de nucleótidos de Tc323 en linajes de *T. cruzi*. Se utilizó el marco de lectura abierto de Tc323 de Dm28c como referencia (señalada en gris) y se comparó con el homólogo presente en genomas ensamblados disponibles en NCBI. La cepa, los códigos del genoma, la cobertura (en %) y las identidades se muestran en columnas.

Dada la presencia de proteínas homólogas a Tc323 en especies del género *Trypanosoma* y en un representante de *Paratrypanosoma* (*P. confusum*), se evidencia que el ancestro común de estas proteínas se originaría en el antecesor que dio origen a los Tripanosomátidos. Este hallazgo explicaría la presencia de Tc323 en dichos géneros que divergieron en los inicios de esta familia. Es relevante subrayar la ausencia de proteínas homólogas a Tc323 en otros parásitos patógenos para los humanos tales como *Leishmania spp* o *T. brucei*. Por lo tanto, a pesar de que el ancestro de la proteína tendría su origen en el antepasado de los géneros mencionados, sólo ha persistido en ciertas especies del género *Trypanosoma*, indicando eventos significativos de pérdida a lo largo de la evolución. En particular,

en la especie *P. confusum*, Tc323 presenta dos eventos de divergencia consecutivos mientras que dentro de *T. cruzi* se observan dos eventos independientes de divergencia. Estos últimos podrían sugerir adaptaciones específicas dentro de esta especie, con posibles implicancias funcionales y adaptativas en el contexto del ciclo de vida del parásito y de la patogénesis de la ECh.

Por otro lado, para complementar los resultados filogenéticos obtenidos, se realizó un análisis de sintenia que reveló la presencia del homólogo de Tc323 en linajes representativos de *T. cruzi* y su ausencia en *T. brucei* (**Figura 17**). Este resultado confirmó la existencia de una única copia de Tc323 por genoma haploide en *T. cruzi*. De hecho, se determinó que este gen está ubicado en los cromosomas 24 y 23 de los genomas completamente ensamblados de las cepas Y (GCA_015033655) y Brasil (GCA_015033625) de *T. cruzi*, respectivamente.

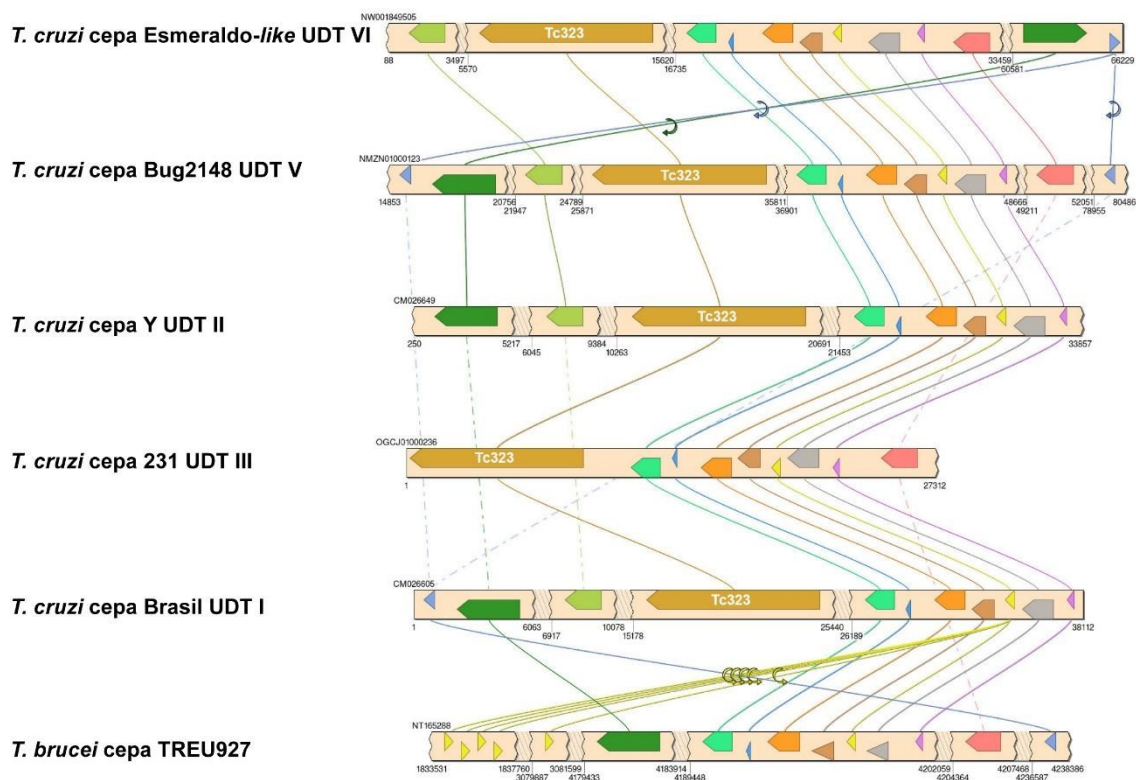


Figura 17. Análisis de microsinetias de las regiones genómicas que albergan Tc323. Se comparó un fragmento genómico de 38520 pb (cepa Y de *T. cruzi*) que contiene el gen codificante de Tc323 (flecha marrón) con regiones homólogas de las cepas Esmeraldo-like, Bug2148, Brasil, S231 de *T. cruzi* y TREU927 de *T. brucei*. Se indican, además, las DTUs a las que pertenece cada cepa.

6.2.2 Análisis experimental: Determinación de Tc323 como proteína específica de *T. cruzi*.

Puesto que se determinó la ausencia de Tc323 en otros parásitos de relevancia sanitaria como *T. brucei* y distintas especies de *Leishmania* mediante análisis filogenéticos y de sintenia, la fase subsiguiente de la investigación se orientó hacia la validación experimental de esta observación. Para ello, se realizó un ensayo de WB que corroboró la ausencia de Tc323 en los extractos de los patógenos filogenéticamente relacionados ensayados: forma sanguínea y procíclica de *T. brucei* y forma promastigote de *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. mexicana* (**Figura 18A**). Resultados análogos se observaron por un ensayo de ELISA, donde se constató que el scFv 6B6 reconoció preferencialmente al lisado de *T. cruzi*, sin que se observara ninguna reacción significativa frente a la forma procíclica de *T. brucei* o a promastigotes de *L. mexicana* (**Figura 18B**). En este último caso, se utilizó a la proteína no relacionada BSA como control de especificidad de reconocimiento.

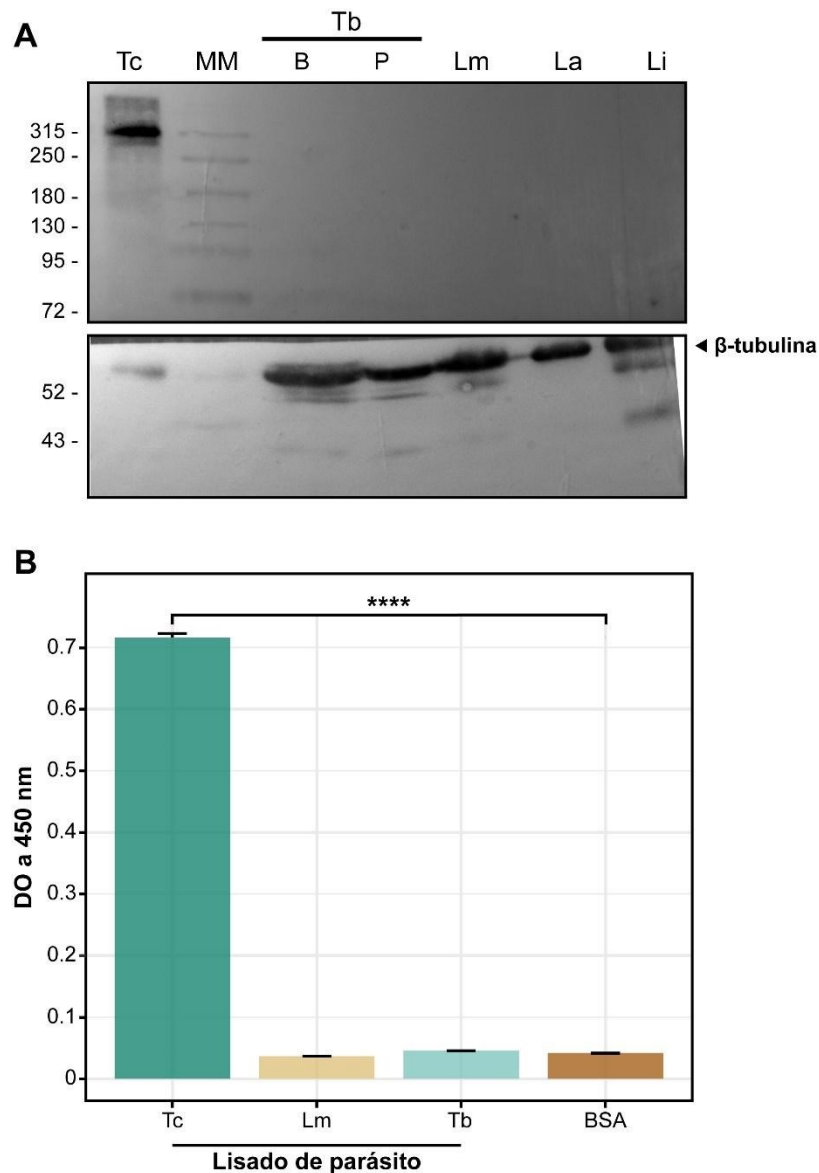


Figura 18. Detección de Tc323 en *T. cruzi* y en otros kinetoplástidos mediante ensayo de WB y ELISA. (A) Un total de 30 µg de extractos proteicos procedentes de lisados de diferentes parásitos se separaron por SDS-PAGE (8%), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con el Ac chim m6B6 (panel superior) y β-tubulina (control de carga, panel inferior). La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. Tc: epimastigote de *T. cruzi* cepa Dm28c; Tb: *T. brucei*; B y P, forma sanguínea y procíclica; respectivamente; Lm: promastigote de *L. mexicana*; La: promastigote de *L. amazonensis*; Li: promastigote de *L. infantum*. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en kDa) se indican a la izquierda. (B) Reactividad del Ac scFv 6B6 frente extracto celular total (20 µg/mL) de: epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c; Tc), promastigotes de *L. mexicana* (Lm) y formas procíclicas de *T. brucei* (Tb) por ELISA. Los datos se expresan como Densidad Óptica (DO) a 450 nm [media ± DS, n = 2]. Las diferencias de reactividad entre los diferentes lisados versus a BSA fueron evaluadas mediante ANOVA de un factor, seguido de pruebas de comparación múltiple de Dunn. Las barras representan el DS. Las correlaciones significativas se indican con el nivel de significancia (**** $p < 0,0001$).

A continuación, se llevaron a cabo ensayos adicionales de WB que confirmaron la presencia de Tc323 en los lisados de diversas cepas y estadios de vida de *T. cruzi* (**Figura 19A y 19B**), observando que esta proteína muestra una expresión diferencial entre estadios y linajes evolutivos. Cabe destacar que, aunque no fueron realizados ensayos densitométricos y réplicas que permitan realizar un análisis estadístico, los resultados sugieren que Tc323 se expresa en mayores niveles en epimastigotes con respecto a los estadios infectivos (amastigote y tripomastigote). De manera similar, se observó que Tc323 presenta mayor abundancia de expresión en las cepas Dm28c y HE, correspondientes a los UDTs I y V, respectivamente.

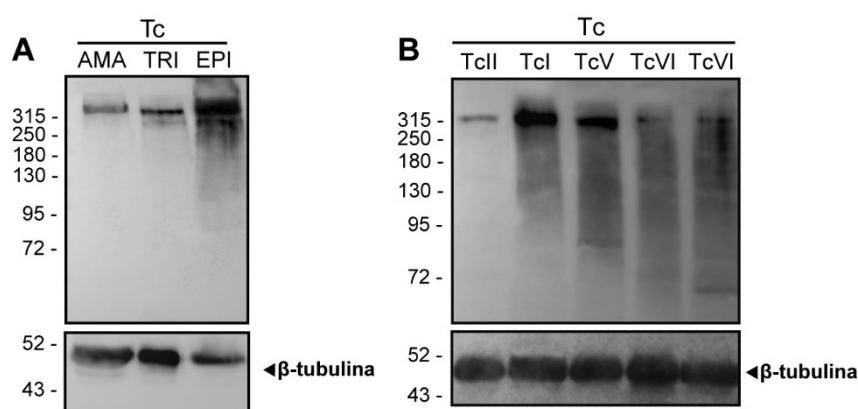


Figura 19. Detección de Tc323 en los distintos estadios morfológicos y cepas de *T. cruzi*. (A) Un total de 30 μ g de extractos proteicos derivados de las tres formas del ciclo de vida del parásito fueron separados por SDS-PAGE (8%), transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con el Ac chim m6B6 (panel superior) y β -tubulina (control de carga, panel inferior). La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. Los marcadores de peso molecular (expresados en kDa) se indican a la izquierda. Tc: epimastigote de *T. cruzi* cepa Dm28c; AMA, TRI y EPI, formas amastigote, tripomastigote y epimastigote, respectivamente. (B) Un total de 50 μ g de extractos proteicos provenientes de epimastigotes de diferentes linajes de *T. cruzi* (Tc) fueron procesados como en (A). TcI: Dm28c; TcII: Y; TcV: HE; TcVI: CL-Brener; TcVI: Tulahuen.

En conjunto, estos resultados respaldan y validan la información derivada de nuestros análisis *in silico*, evidenciando que Tc323 es una proteína exclusiva de *T. cruzi* y algunos tripanosomas relacionados no patógenos, se expresa en los principales estadios de su ciclo de vida y se está codificada por un gen conservado en todas las cepas del parásito analizadas.

6.3 Localización subcelular de Tc323.

Dado que el Ag Tc323 está anotada como una proteína hipotética en la base de datos de TriTrypDB, se realizó un análisis de secuencia utilizando el servidor InterProScan. A través de él, se predijo la presencia de un péptido señal N-terminal, un dominio extracelular no citoplásmico central, un motivo transmembrana y una región citoplásmica C-terminal corta (**Figura 20A**)

Por otro lado, para determinar la ubicación de Tc323 en *T. cruzi*, se llevó a cabo un análisis de microscopía de inmunofluorescencia (IFI) y fraccionamiento subcelular seguido de WB, empleando el Ac scFv 6B6.

Los resultados del análisis por WB en la **Figura 20B**, revelaron la presencia de Tc323 en muestras que contenían tanto fracciones solubles como enriquecidas en membrana de extractos celulares de *T. cruzi*. Este hallazgo contrasta con la señal observada para la ciclofilina TcCyp19, una proteína citoplasmática utilizada como control de enriquecimiento de la fracción soluble (Dos Santos *et al.*, 2021). El Ac anti-BiP, que reconoce la chaperona BiP presente en el retículo endoplásmico (Bangs *et al.*, 1993), se utilizó como control de carga para evaluar para corroborar la presencia de similares cantidades de proteína, ya sea en la fracción soluble como la asociada a la membrana (**Figura 20C**).

Por otro lado, la IFI de células de *T. cruzi*, fijadas y permeabilizadas con Tritón X-100, reveló que Tc323 se localiza predominantemente en el espacio intracelular en las principales formas parasitarias (**Figura 20C**). No se observó señal en los parásitos no permeabilizados, indicando una ausencia de Tc323 en la membrana plasmática externa. Además, la señal detectada mediante el Ac scFv 6B6 mostró un patrón diferente de una proteína soluble citosólica, obtenida con el Ac anti-TcCyp19. Estos resultados sugieren que el patrón granular de la señal de Tc323 puede deberse a su presencia o asociación a estructuras o dominios intracelulares específicos.

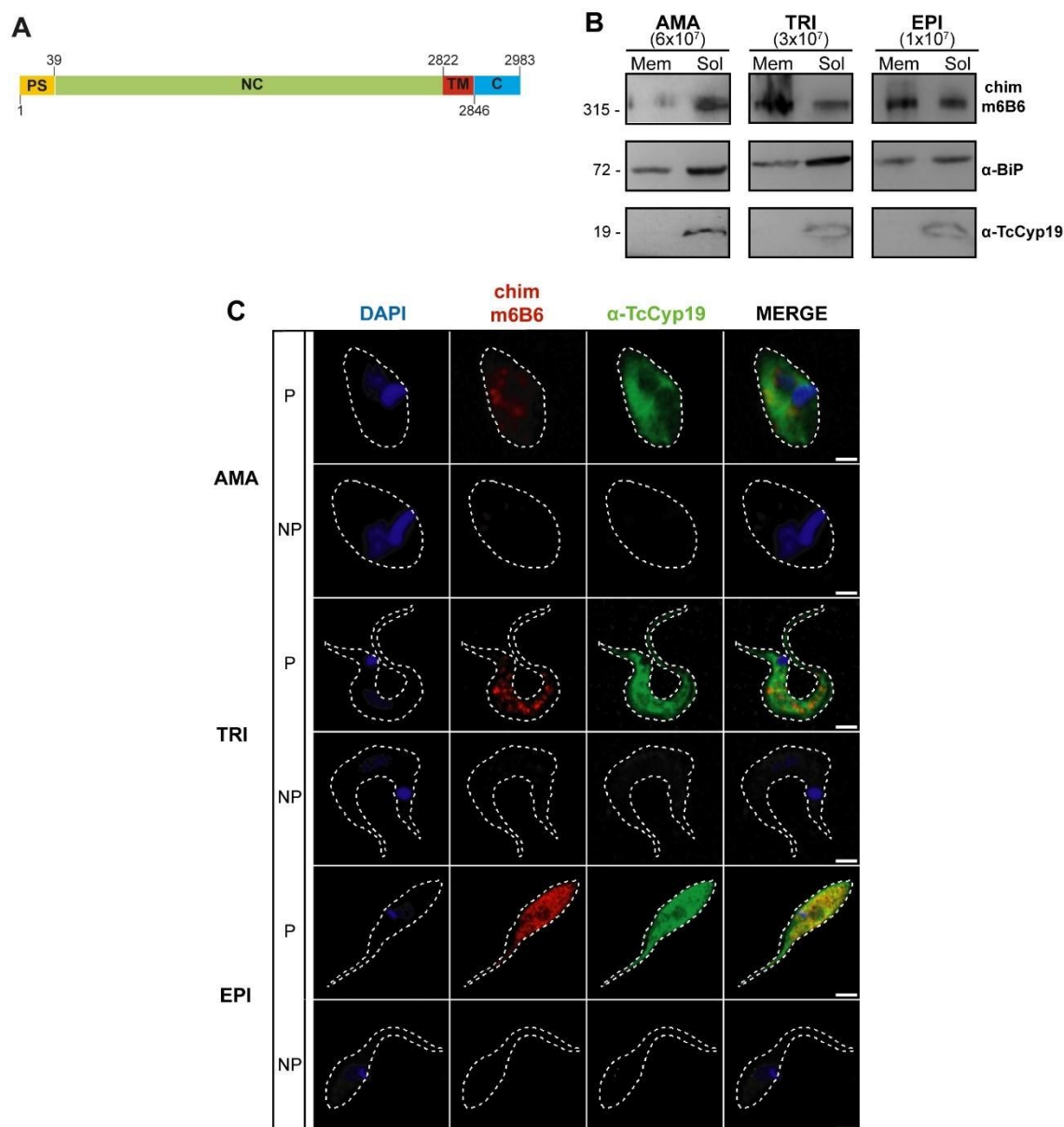


Figura 20. Localización subcelular de Tc323 en *T. cruzi*. (A) Representación esquemática de Tc323. Se indican las regiones del péptido señal (PS), no citosólica (NC), transmembrana (TM) y citosólica (C) predichas en el servidor InterProScan. (B) WB de la fracción soluble (Sol) y enriquecidas en membrana (Mem) de diferentes formas morfológicas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) reveladas con los Acs chim m6B6, anti-BiP y anti-TcCyp19, respectivamente. Los números entre paréntesis indican la cantidad de parásitos utilizados para obtener las muestras correspondientes. La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. Los marcadores de peso molecular (expresados en kDa) se indican a la izquierda. (C) Inmunofluorescencia indirecta de formas morfológicas de *T. cruzi* permeabilizadas (P) o no permeabilizadas (NP) utilizando los Acs chim m6B6 (rojo) y anti-TcCyp19 (verde). Los núcleos y kinetoplastos se tiñeron con DAPI (azul). Barras: 1 μ m para AMA, 2 μ m para TRI, 3 μ m para EPI. En (B) y (C): AMA, TRI y EPI indican formas amastigote, tripomastigote y epimastigote, respectivamente.

6.4 Modelado estructural de Tc323.

Debido a que la proteína Tc323 es una proteína no caracterizada que carece de una estructura definida por cristalografía, la predicción de su estructura tridimensional (3D) se realizó mediante el empleo del servidor RaptorX (Källberg *et al.*, 2014). Esta herramienta permite predecir las estructuras 3D de proteínas que comparten menos del 30% de identidad de secuencia con las estructuras resueltas en el *Protein Data Bank* (PDB) (Bernstein *et al.*, 1977). Así, este predictor recuperó y empleó las estructuras cristalinas de 3p11A (entrada UniProtKB P77774), 4a08A (entrada UniProtKB Q16531), 3n5eA (entrada UniProtKB P04818), 1z8gA (entrada UniProtKB P05981), 2ymuA (entrada UniProtKB B2J0I0) y 3hpdA (entrada UniProtKB O58877) de la base de datos PDB como plantillas para construir la estructura de Tc323. En consecuencia, se generó un modelo que integra las distintas plantillas (**Figura 21A**), proporcionando una visión completa de la estructura de Tc323, así como modelos individuales (o dominios) derivados de cada plantilla para complementar la predicción. Específicamente para Tc323, se predijeron seis dominios estructurales (**Figura 21B**), cuyas características se presentan en la **Tabla 12**:

Dominio	Residuos aminoácidos abarcados	Tamaño del fragmento	PM teórico
1	1-75	225	7,87 kDa
2	76-1368	3879	130,46 kDa
3	1369-1447	240	7,81 kDa
4	1448-1821	1022	40,36 kDa
5	1822-2638	2407	88,21 kDa
6	2639-2983	1179	48,29 kDa

Tabla 12. Dominios estructurales de Tc323. Para cada uno de ellos se indica los residuos aminoácidos abarcados de Tc323, el tamaño del producto génico (en pb) y el PM teórico (en kDa).

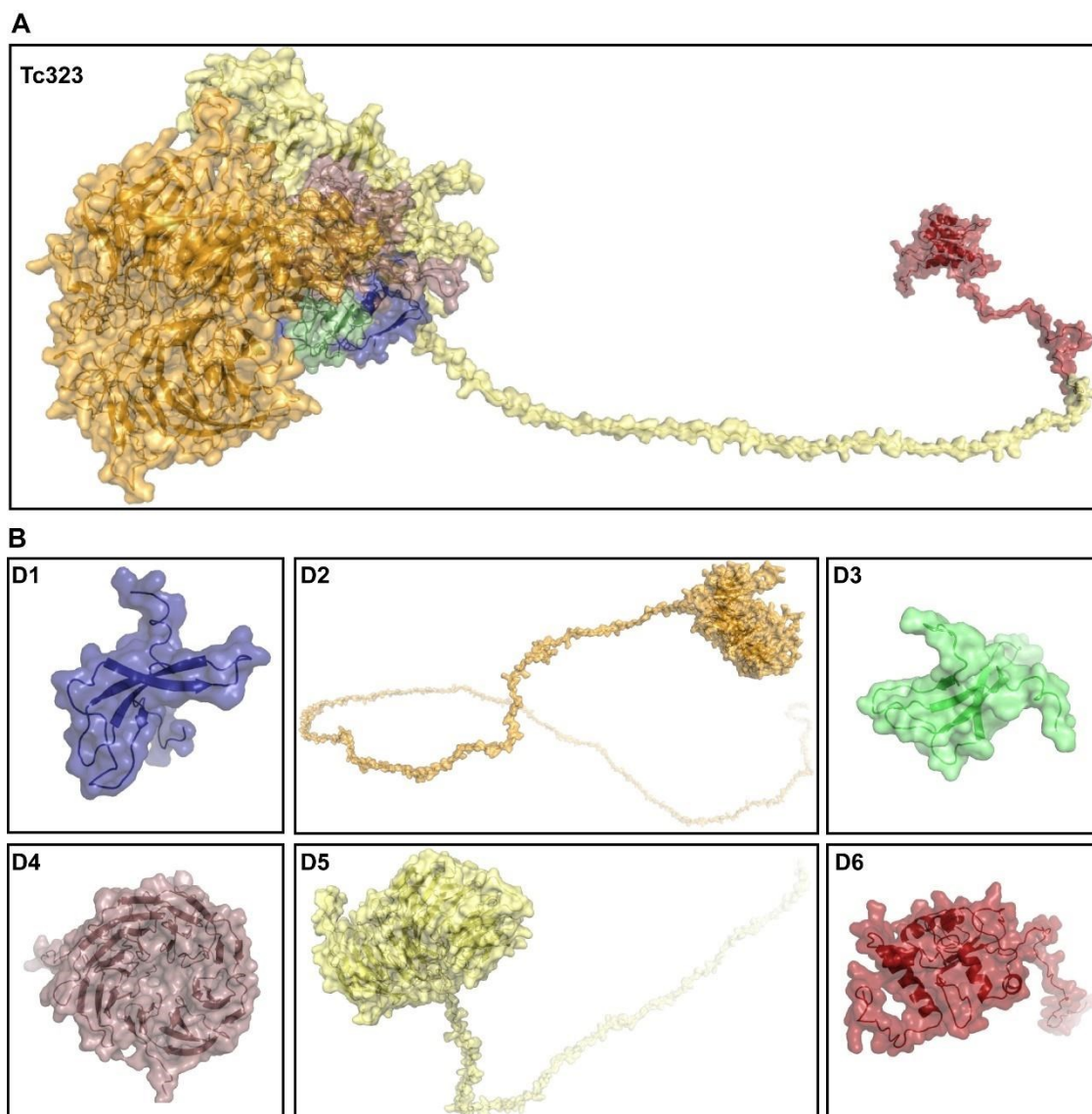


Figura 21. Predicción de la estructura de Tc323. Modelado molecular realizado utilizando la plataforma RaptorX; (A) estructura de longitud completa y (B) dominios estructurales (D1-D6).

La estructura secundaria de Tc323 predicha por RaptorX arrojó que esta proteína está compuesta por un 3% de α -hélice, un 42% de láminas β -plegada y un 54% de hélice superenrollada. Finalmente, la calidad estereométrica de las estructuras proteicas generadas se evaluó a través de la herramienta PROCHECK, empleando el análisis del gráfico de Ramachandran. Tal como se ilustra en la **Figura 22**, este gráfico indicó que el 80,5% de los residuos están en las regiones más favorecidas, el 14% en regiones permitidas adicionales, el 3,5% regiones generosamente permitidas y el 2,0% en regiones no permitidas.

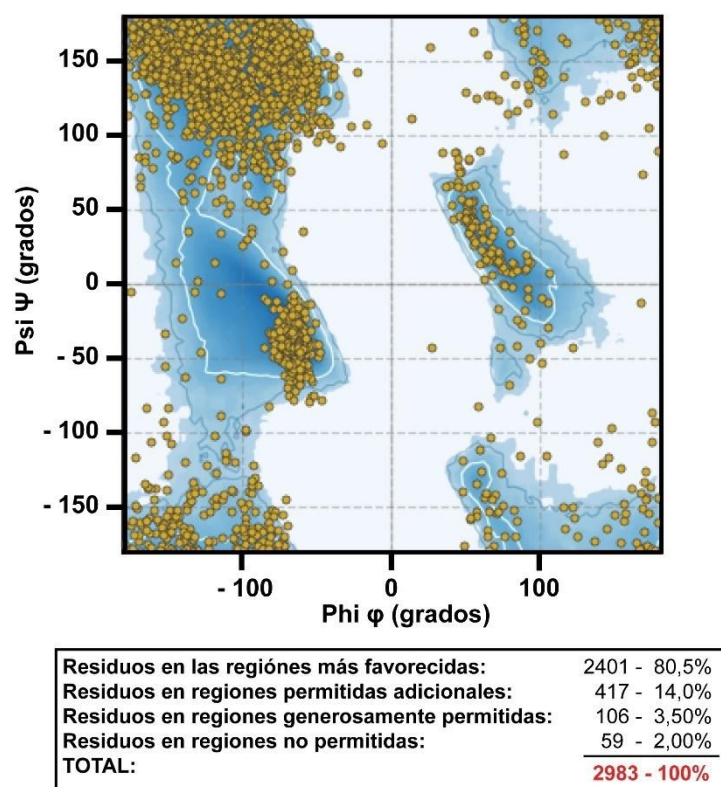


Figura 22. Gráfico de Ramachandrán con los ángulos diédricos (Psi) ψ versus (Phi) ϕ de todos los aminoácidos (puntos amarillos) para Tc323. Las zonas azules rodeadas por la línea blanca continua representan las regiones totalmente permitidas mientras que la línea celeste bordea las regiones adicionalmente permitidas. Las zonas sin bordes representan las regiones generosamente permitidas.

6.5 Clonado y expresión de los dominios estructurales de Tc323.

Dado el elevado peso molecular de Tc323, los esfuerzos por amplificar la secuencia en su longitud completa de manera recombinante resultaron infructuosos. Como alternativa, se optó por la estrategia de clonar y expresar individualmente cada dominio estructural predicho por el servidor RaptorX. Para ello, se amplificaron por PCR, las regiones codificantes para cada dominio, utilizando ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL Brener).

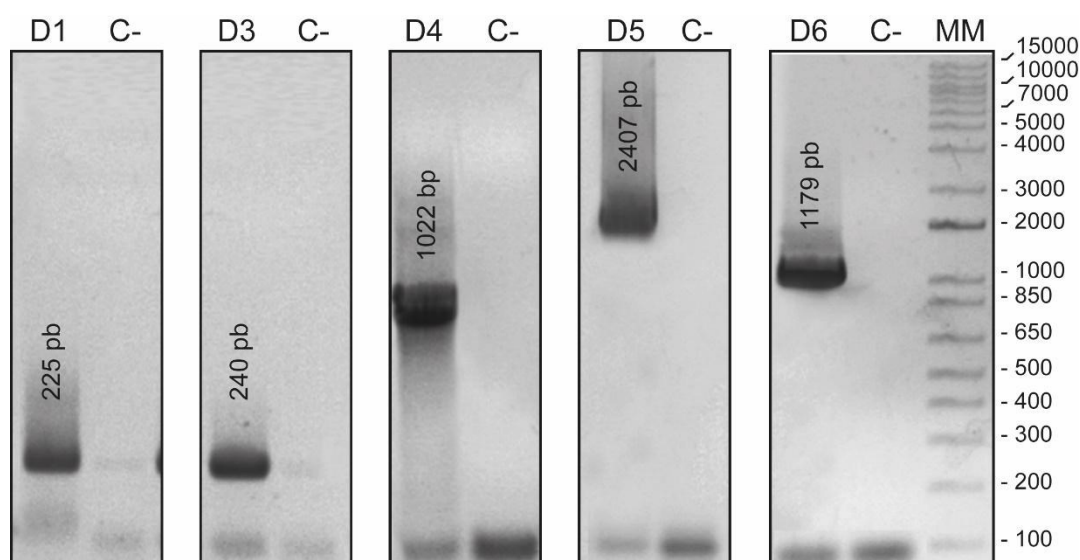


Figura 23. Productos de amplificación por PCR de los dominios estructurales de Tc323 a partir de ADN genómico de *T. cruzi* (cepa CL-Brener). D1: Dominio 1, D3: Dominio 3; D4: Dominio 4; D5: Dominio 5; D6: Dominio 6. Para todos los casos, la reacción sin ADN (C-) se utilizó como control negativo. El tamaño de cada fragmento amplificado (en pb) se muestra en la Figura. Los marcadores de pares de base (MM; expresados en pb) se indican a la derecha.

La **Figura 23** presenta los productos de amplificación, mostrando el tamaño acorde a lo estimado teóricamente para cada dominio y la falta de reacción en los controles negativos correspondientes. Hasta el momento, el dominio D2 no se logró amplificar, a pesar utilizar distintas condiciones de PCR. El clonado de los dominios restantes que pudieron ser amplificados se realizó en el vector comercial pGEM-T Easy. Como resultado, se obtuvieron los siguientes plásmidos: pGEM-T (**D1**), pGEM-T (**D3**), pGEM-T (**D4**), pGEM-T (**D5**) y pGEM-T (**D6**), cuya identidad se confirmó por secuenciación. Luego, cada uno de los fragmentos se sub-clonaron en el vector de expresión bacteriano pRSET-A, de manera tal de generar una proteína de fusión a un *tag* de 6 histidinas en su extremo N-terminal. El proceso de sub-clonado se llevó a cabo con enzimas de restricción específicas, cuyas secuencias de reconocimiento se incluyeron previamente en los oligonucleótidos utilizados durante las reacciones de amplificación por PCR (ver Apéndice). Los productos de ligación obtenidos fueron utilizados para transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3) pLysE, una cepa deficiente en proteasas que permite minimizar la degradación proteolítica durante la expresión recombinante (González y Fillat, 2018). La confirmación de la correcta inserción de cada dominio en el vector pRSET-A se determinó mediante la digestión del ADN plasmídico de los clones bacterianos (**Figura 24**), donde se observaron las bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados.

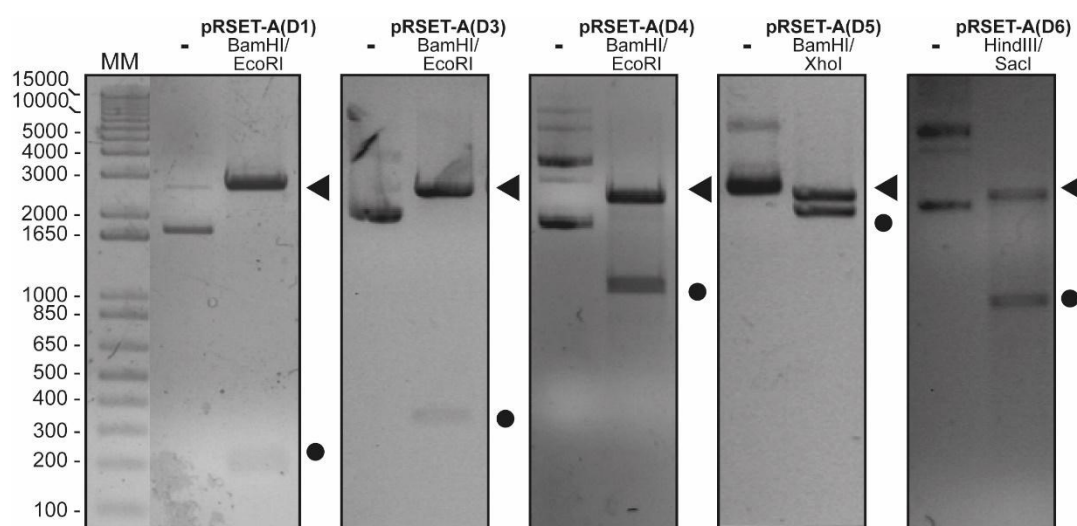


Figura 24. Confirmación de los plásmidos pRSET-A recombinantes mediante digestión con enzimas de restricción. Las construcciones pRSET-A (D1), pRSET-A (D3), pRSET-A (D4), pRSET-A (D5) y pRSET-A (D6) fueron doblemente digeridas con las enzimas de restricción detalladas en la Figura. Para todos los casos, las construcciones plasmídicas sin digerir (-) se utilizaron como control. Las flechas indican el vector pRSET-A sin inserto (2900 pb) mientras que los círculos señalan la posición de los fragmentos liberados tras la digestión. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en pb) se indican a la izquierda.

Posteriormente, los clones bacterianos que portaban los plásmidos pRSET-A recombinantes (pRSET-A(D1), pRSET-A(D3), pRSET-A(D4), pRSET-A(D5) y pRSET-A(D6)) se cultivaron en medio líquido hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,4-0,5 y, posteriormente, se agregó IPTG 1 mM para inducir la expresión de los distintos fragmentos recombinantes, evaluándose los niveles de expresión a distintos tiempos. Los extractos proteicos de estos cultivos se analizaron por SDS-PAGE y WB. En la **Figura 25** se evidencia la máxima expresión de los fragmentos D3 y D6 luego de 21 h y 4 h post-inducción con IPTG, respectivamente. Estos resultados sugieren que la expresión de estas proteínas está controlada por el promotor lac del plásmido ya que no se observó su expresión en ausencia del inductor.

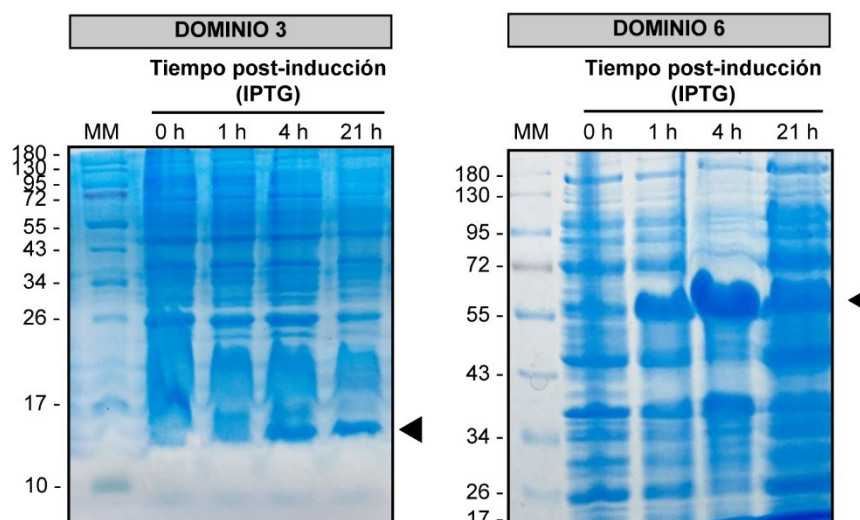


Figura 25. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de los dominios 3 y 6. Extractos celulares de bacterias BL21(DE3) pLysE transformadas con los vectores pRSET-A(D3) y pRSET-A(D6) fueron recogidos a 0, 1, 4 y 21 horas post-inducción con IPTG y analizados mediante SDS-PAGE seguido por tinción con *Coomassie Blue*. La cantidad de muestra sembrada por calle se ajustó según lo descrito en Materiales y Métodos. Las flechas indican la posición de las proteínas recombinantes. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en kDa) se indican a la izquierda.

A pesar de la implementación de variadas condiciones destinadas a optimizar la expresión proteica, no se logró la detección de los fragmentos D1, D4 y D5 por tinción con *Coomassie Blue* (**Figura 26**).

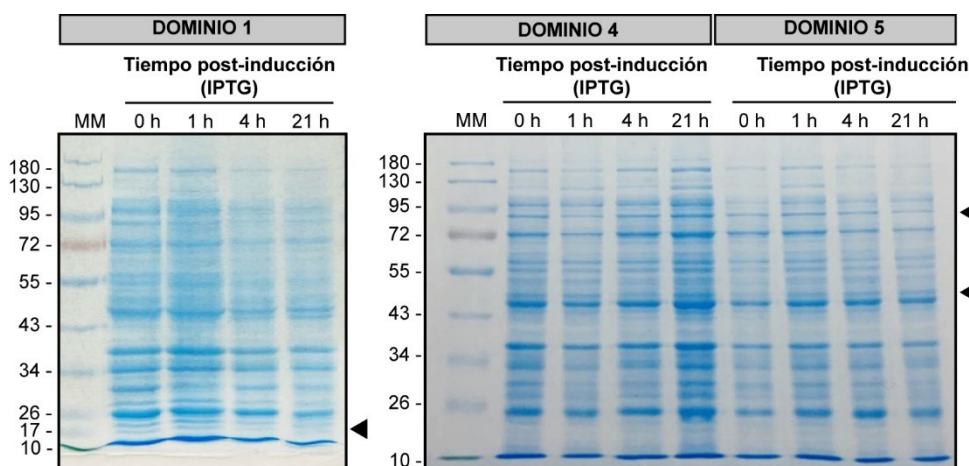


Figura 26. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de los dominios 1, 4 y 5. Extractos celulares de bacterias BL21(DE3) pLysE transformadas los vectores pRSET-A(D1), pRSET-A(D4) y pRSET-A(D5) fueron recogidos a 0, 1, 4 y 21 h post-inducción con IPTG y analizados mediante SDS-PAGE seguido por tinción con *Coomassie Blue*. La cantidad de muestra sembrada por calle se ajustó según lo descrito en Materiales y Métodos. Las flechas indican la posición de las proteínas recombinantes. Los marcadores de peso molecular (MM) (expresados en kDa) se indican a la izquierda.

No obstante, a pesar de no lograr discernir una banda específica para los dominios 1, 4 y 5 mediante la coloración del gel con azul de *Coomassie*, fue posible detectar su expresión a través de un ensayo de WB (**Figura 27**), utilizando un Ac dirigido contra su *tag* de fusión 6xHis. La banda identificada en los cultivos no inducidos se atribuye a una expresión basal (*leaky expression*). Además, el patrón de bandas al revelar los dominios recombinantes 4, 5 y 6 podría derivar de la presencia de múltiples proteasas o agregados proteicos en la muestra, los cuales pueden ser reconocidos por este Ac. Es importante destacar que el *tag* de histidinas aumenta el peso molecular estimado para cada una de las proteínas aproximadamente 5 kDa.

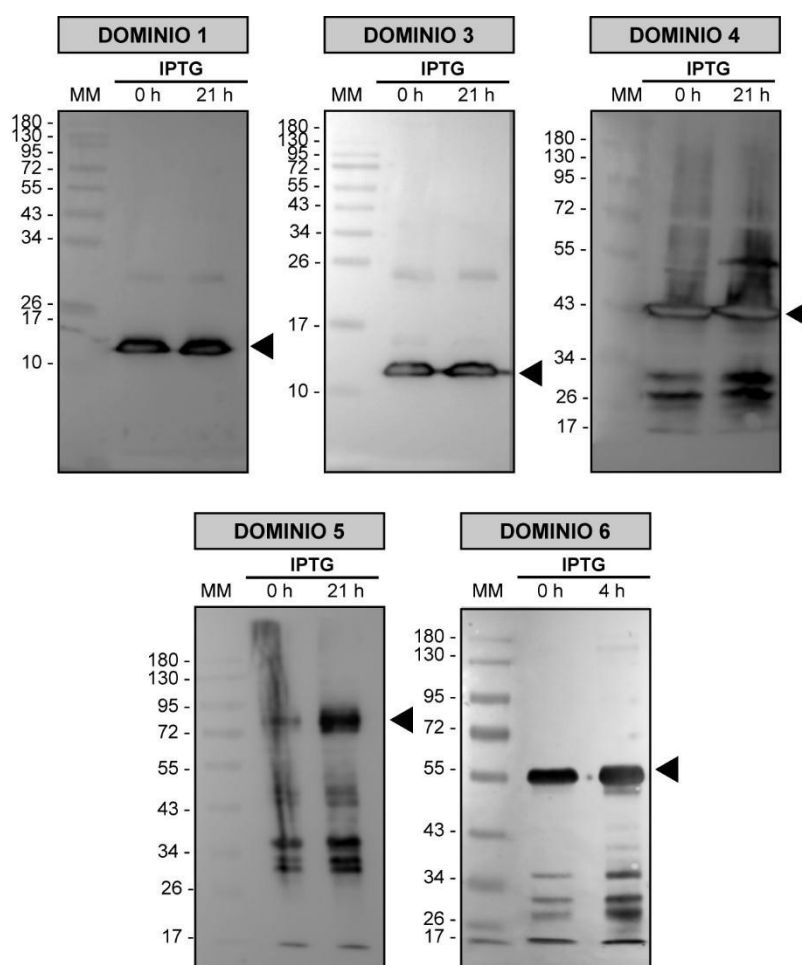


Figura 27. Expresión de los dominios 1, 3, 4, 5 y 6 por WB. Los extractos celulares de bacterias BL21(DE3) pLysE transformadas con los vectores pRSET-A(D1), pRSET-A(D3), pRSET-A(D4), pRSET-A(D5) y pRSET-A(D6) se obtuvieron a 0 h y 21 h post-inducción para todos los dominios (a excepción del dominio 6 en la que la recolección se realizó a las 4 h), y se sometieron a un SDS-PAGE (8-12%) y WB. La membrana se incubó con el Ac Anti-6XHis (Sigma-Aldrich). La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. Las flechas indican la posición de las proteínas recombinantes. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en kDa) se indican a la izquierda.

6.6 Predicción bioinformática de epítopes B en Tc323.

Como se mencionó en los Antecedentes, la reactividad contra Tc323 se observó sólo con plasmas de pacientes con EChc e infección mixta por *Leishmania spp.* y *T. cruzi*, estando ausente en plasmas de sujetos con Leishmaniasis cutánea e individuos no infectados. Estos resultados, junto con los hallazgos de la presente Tesis, que resaltan la ausencia de Tc323 en parásitos de relevancia clínica y filogenéticamente relacionados con *T. cruzi*, sustentan el estudio de esta proteína como potencial marcador diagnóstico. Para ello, y puesto que se logró expresar de forma recombinante sólo algunos dominios de Tc323 (no fue posible clonar el fragmento D2), se decidió indagar sobre su inmunogenicidad *in silico*. Utilizando la secuencia aminoacídica de Tc323 como entrada en la base de datos de inmunoepítopes (IEDB, <http://www.iedb.org>) se emplearon para el análisis los siguientes predictores: BepiPred 2.0 (Jespersen *et al.*, 2017), giros β (Chou y Fasman, 1974), flexibilidad (Karplus and Schulz, 1985), accesibilidad a la superficie (Emini *et al.*, 1985), hidrofiliidad (Parker *et al.*, 1986) y, por último, antigenicidad (Kolaskar and Tongaonkar, 1990). El resumen de los datos obtenidos de las herramientas de predicción se muestra en la **Figura 28**. Los resultados mostraron que las secuencias correspondientes a los dominios 3 y 6 (residuos 1369 a 1447 y 2635 a 2983) de Tc323, designadas de aquí en adelante como TcD3 y TcD6, respectivamente, exhiben las puntuaciones de predicción más elevadas para epítope de células B, sugiriendo mayor capacidad para inducir una respuesta inmune humoral.

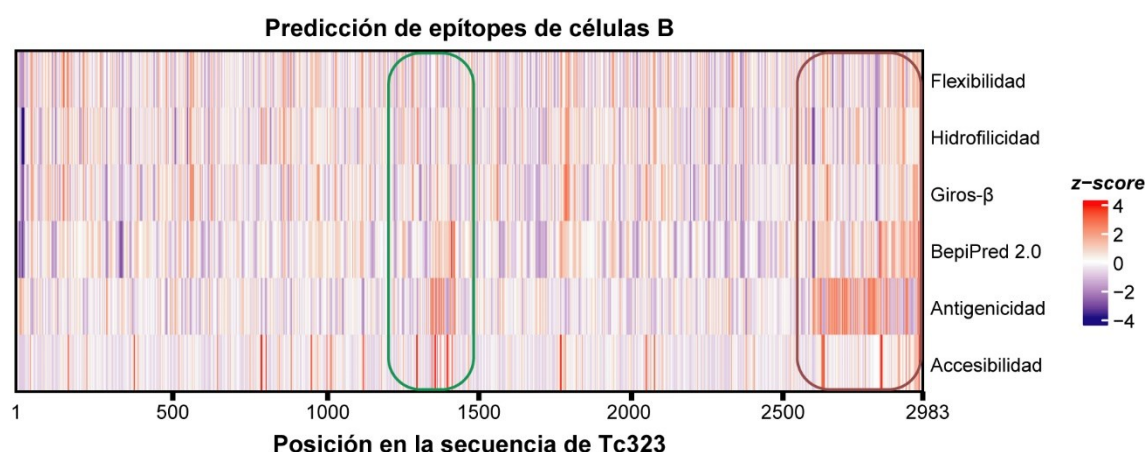


Figura 28. Predicción de epítopes de células B (ECB) para Tc323 utilizando el servidor *Immune Epitope Database (IEDB)*. Mapa de calor que representa la distribución de los epítopes de células B a lo largo de la secuencia proteica de Tc323 basándose en seis parámetros: flexibilidad de *Karplus y Schulz*, hidrofilicidad de *Parker*, giro- β de *Chou y Fasman*, epítopes lineales de BepiPred 2.0, antigenicidad de *Kolaskar y Tongaonkar* y accesibilidad a la superficie de *Emini*. En los ejes X se representan las posiciones de los residuos de la secuencia de la proteína Tc323, mientras que los ejes Y corresponden a la puntuación Z de cada residuo. Las líneas rojas y blancas indican regiones antigénicas fuertes (puntuación Z > 4) y débiles (puntuación Z > 0), respectivamente. Las líneas azules indican residuos que no se predijeron como epítopes. Cada fila encuadrada indica la región de Tc323 con la puntuación de unión más favorable como ECB, siendo verde para rTcD63 y rojo para rTcD6.

Las posiciones lineales de los dos epítopes inmunodominantes en Tc323 se muestran en la **Figura 29A**. Además, estas regiones se mapearon en la estructura 3D de Tc323 y se visualizaron utilizando el software PyMOL (**Figura 29B**).

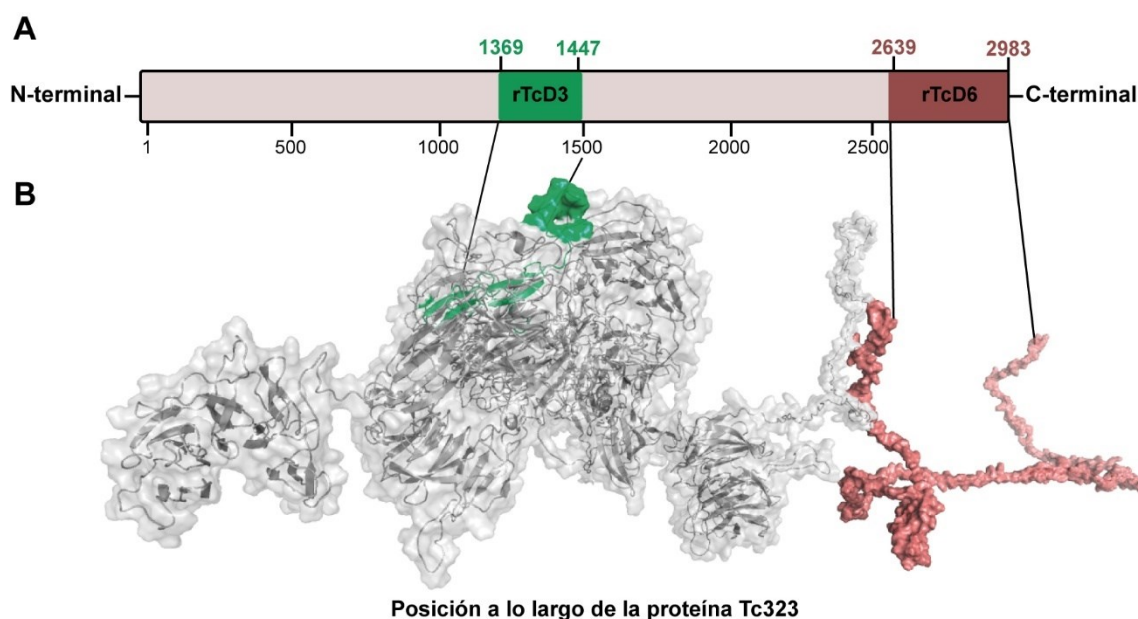


Figura 29. Ubicación de los epítopes inmunodominantes en Tc323. Diagrama esquemático (A) y representación 3D (B) de los dominios antigénicos predichos por el análisis del IEDB en la

proteína Tc323. Se empleó el mismo esquema de color: TcD3 (verde, residuos 1369 a 1447) y TcD6 (rojo, residuos 2639 a 2983). La superficie de la proteína se representó en gris.

6.7 Producción y purificación de los dominios recombinantes D3 y D6

En virtud de los resultados obtenidos anteriormente, la siguiente etapa implicó la expresión y purificación a gran escala de las proteínas recombinantes TcD3 y TcD6, con el objetivo de llevar a cabo los ensayos para evaluar su capacidad diagnóstica y determinar si constituían el epítipo del Ac 6B6. En un primer paso y para evaluar la solubilidad de las proteínas recombinantes, las bacterias BL21(DE3) pLysE transformadas con los plásmidos pRSET-A(D3) y pRSET-A(D6) se sometieron a inducciones a baja escala, utilizando pequeños volúmenes de cultivo.

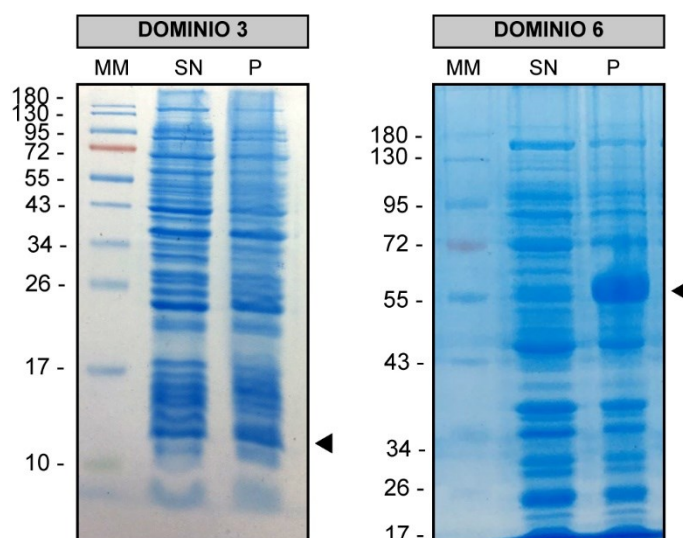


Figura 30. Análisis por SDS-PAGE de la solubilidad de las proteínas recombinantes rTcD3 y rTcD6. Los extractos celulares de bacterias BL21(DE3) pLysE transformadas los vectores pRSET-A(D3) y pRSET-A(D6) fueron separadas en sus fracciones solubles (SN) e insolubles (P) y analizadas por SDS-PAGE (8-10%), seguido por tinción con *Coomassie Blue*. La cantidad de muestra sembrada por calle se ajustó según lo descrito en Materiales y Métodos. Las flechas indican la posición de las proteínas recombinantes. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en kDa) se indican a la izquierda.

Tal como se visualiza en la **Figura 30**, ambos fragmentos se encontraron en mayor proporción en la fracción insoluble de los cultivos, indicando su expresión en cuerpos de inclusión. Por consiguiente, se procedió a la obtención de rTcD3 y rTcD6 bajo condiciones desnaturalizantes, siguiendo el protocolo detallado en la sección 9 de Materiales y Métodos, y ajustando los tiempos de inducción previamente especificados para cada una de las proteínas. Tras la fase de purificación, las proteínas rTcD3 y rTcD6

se analizaron mediante SDS-PAGE (**Figura 31A**) y WB (**Figura 31B**), para confirmar tanto el tamaño como la pureza de ambas proteínas.

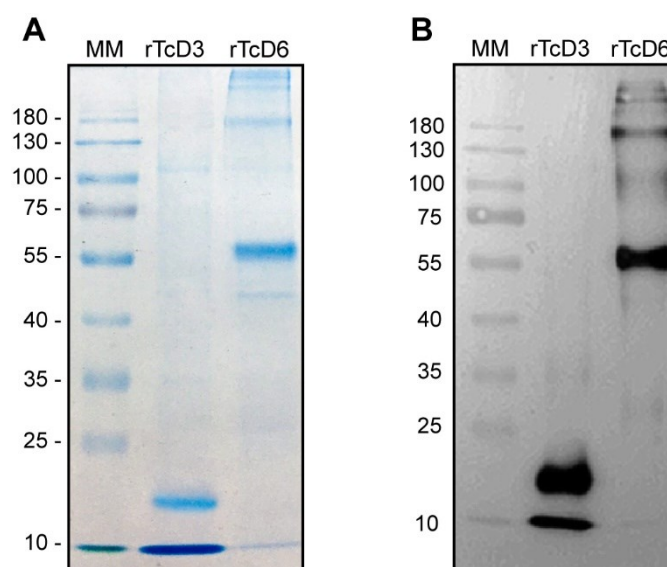


Figura 31. Purificación de rTcD3 y rTcD6. Las proteínas recombinantes purificadas se separaron mediante SDS-PAGE (10%), seguido por la tinción con *Coomassie blue* (**A**) o transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas con el Ac anti-His6X (Sigma-Aldrich) (**B**). La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en kDa) se indican a la izquierda. % de pureza estimado: 83,89% para rTcD3 y 78,64% para rTcD6.

6.8 Evaluación del potencial diagnóstico de rTcD3 y rTcD6.

6.8.1 Ensayo de WB.

Luego de confirmar su pureza, se realizó un ensayo de WB para evaluar si estas proteínas eran capaces de ser reconocidas exclusivamente por Acs generados como consecuencia de la infección por *T. cruzi*. En este análisis, las proteínas rTcD3 y rTcD6 se enfrentaron a tres *pools* de plasmas provenientes de individuos con EChc, cada uno compuesto por cinco muestras individuales: el primer *pool* incluía muestras de individuos con EChc, pero sin sintomatología declarada (**G0**); el segundo, muestras de individuos con EChc con sintomatología cardíaca declarada (**G1**); y el tercero, muestras de individuos no infectados por *T. cruzi* (**NI**). Como se evidencia en la **Figura 32**, tanto el *pool* G1 como el *pool* G0 reconocieron específicamente a las proteínas rTcD3 y rTcD6.

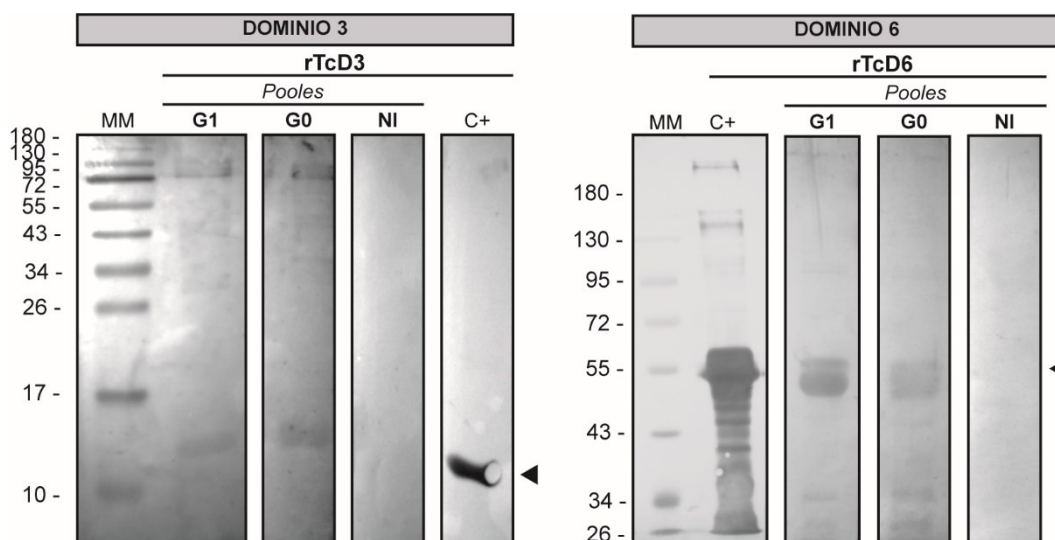


Figura 32. Reactividad de *pooles* de plasmas provenientes de individuos *T. cruzi*-positivos y negativos frente a rTcD3 y rTcD6. Las proteínas recombinantes purificadas se separaron mediante SDS-PAGE (10-12%) y luego de transferirlas a una membrana de nitrocelulosa, se incubaron con tres *pooles* distintos: uno que contenía muestras plasmáticas *T. cruzi*-positivas de pacientes con compromiso cardíaco (G1), otro con muestras plasmáticas *T. cruzi*-positivas de individuos sin alteraciones clínicas (G0) y un tercer *pool* con muestras plasmáticas de sujetos no infectados (NI). Como control positivo (C+), las proteínas se revelaron con el Ac anti-His6X (Sigma-Aldrich). La detección se llevó a cabo mediante la utilización del sustrato TMB. Las flechas indican la posición de las proteínas recombinantes. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en kDa) se indican a la izquierda.

Por el contrario, se observó ausencia de reactividad por parte del *pool* que incluía muestras de sujetos no infectados (NI) (**Figura 32**), evidenciando así que estas proteínas eran reconocidas específicamente por Acs contenidos en el plasma de los individuos *T. cruzi*-positivos.

6.9 Estudio de Fase I.

6.9.1 Población de estudio.

Las características clínicas y demográficas de los donantes provenientes de Argentina, Bolivia y Paraguay utilizados durante la Fase I se resumen en la **Tabla 13**.

Característica	NI (no infectados con <i>T. cruzi</i> , n = 82)	G0 (pacientes sin manifestaciones clínicas, n = 122)	G1 (pacientes con manifestaciones clínicas, n = 136)
Edad, mediana (rango intercuartílico)	37,5 (29 – 42)	57 (50 – 63)	57 (50 – 63)
Género, F/M	30/52	58/64	66/70
Estadio Kuschner, 0-1-2-3	NA	122-0-0-0	0-110-11-16
País de procedencia, Argentina/Bolivia/Paraguay	82/0/0	91/29/7	100/24/7

Tabla 13. Características clínicas y demográficas de los donantes. NA, no aplica.

6.10 Estandarización de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA

El estudio anterior tuvo como objetivo realizar una evaluación preliminar de la reactividad de rTcD3 y rTcD6 purificadas usando muestras de pacientes con EChc, independientemente de la forma clínica. Basándose en los resultados positivos obtenidos, la siguiente etapa se centró en determinar la capacidad de estos antígenos para discriminar entre muestras seropositivas y seronegativas de EChc, mediante el método de ELISA indirecto.

Inicialmente, se determinaron las condiciones óptimas del ensayo a través de un *checkerboard titration* (titulación en tablero de ajedrez). Para ello, se evaluaron distintas cantidades de TcD3 y TcD6 (10, 15, 20, 25, 30 y 40 ng por pocillo), diferentes diluciones del Ac conjugado (1/3.000 y 1/6.000) y de las muestras plasmáticas (1/50, 1/100, 1/200 y 1/400). A partir de los análisis de los valores medios de absorbancia, el valor máximo de relación señal/ruido (*S/N ratio*) fue de 4,04 para el antígeno rTcD3 (**Tabla 14**) y 6,55 para el antígeno rTcD6 (**Tabla 15**), alcanzándose al utilizar 40 ng de antígeno por pocillo sumada a una dilución del plasma 1/100 y del conjugado 1/3.000.

Ac conjugado	Cantidad de antígeno: ng/pocillo	OD a 450 nm	Dilución plasma			
			1/50	1/100	1/200	1/400
1/3.000	10	(P)	0,71	0,56	0,28	0,21
		(N)	0,34	0,23	0,16	0,14
		S/N ratio	2,08	2,37	1,68	1,46
	15	(P)	0,76	0,58	0,38	0,32
		(N)	0,30	0,29	0,20	0,16
		S/N ratio	2,54	1,99	1,90	1,92
	20	(P)	0,82	0,66	0,46	0,26
		(N)	0,29	0,28	0,18	0,15
		S/N ratio	2,82	2,37	2,43	1,69
	25	(P)	1,21	1,00	0,66	0,46
		(N)	0,43	0,38	0,22	0,17
		S/N ratio	2,77	2,64	3,00	2,56
	30	(P)	0,87	0,77	0,63	0,43
		(N)	0,41	0,33	0,23	0,17
		S/N ratio	2,12	2,33	2,70	2,48
	40	(P)	1,16	0,99	0,69	0,38
		(N)	0,31	0,24	0,25	0,16
		S/N ratio	3,71	4,04	2,78	2,32
1/6.000	10	(P)	0,63	0,55	0,33	0,21
		(N)	0,23	0,22	0,14	0,09
		S/N ratio	2,70	2,40	2,35	2,33
	15	(P)	0,88	0,66	0,48	0,35
		(N)	0,30	0,29	0,16	0,13
		S/N ratio	2,95	2,28	2,93	2,69
	20	(P)	0,52	0,55	0,48	0,18
		(N)	0,23	0,19	0,17	0,10
		S/N ratio	2,25	2,89	2,82	1,84
	25	(P)	1,20	1,00	0,66	0,46
		(N)	0,40	0,38	0,22	0,17
		S/N ratio	2,77	2,64	3,00	2,56
	30	(P)	0,66	0,77	0,53	0,43
		(N)	0,33	0,29	0,23	0,19
		S/N ratio	2,00	2,65	2,30	2,27
	40	(P)	0,96	0,73	0,49	0,35
		(N)	0,32	0,25	0,19	0,09
		S/N ratio	3,00	2,89	2,60	3,65

Tabla 14. Optimización del ensayo de ELISA indirecto durante la Fase I, utilizando la proteína recombinante TcD3. Se indica la dilución del Ac conjugado, la cantidad de proteína por pocillo, la DO a 450 nm de las muestras positivas (P), negativas (N) y la relación *signal to noise* entre ambos (S/N) junto con las diferentes diluciones del plasma. La relación S/N más alta es remarcada en color rojo.

Ac conjugado	Cantidad de antígeno: ng/pocillo	OD a 450 nm	Dilución plasma			
			1/50	1/100	1/200	1/400
1/3.000	10	(P)	0,74	0,42	0,27	0,09
		(N)	0,34	0,29	0,13	0,06
		S/N ratio	1,90	2,36	2,07	1,50
	15	(P)	1,03	0,79	0,87	0,45
		(N)	0,54	0,33	0,25	0,13
		S/N ratio	2,16	1,44	1,27	1,13
	20	(P)	0,90	0,75	0,57	0,36
		(N)	0,35	0,24	0,20	0,16
		S/N ratio	2,57	3,04	2,75	2,24
	25	(P)	1,22	0,95	0,64	0,51
		(N)	0,57	0,27	0,25	0,22
		S/N ratio	2,12	3,49	2,53	2,24
	30	(P)	1,25	0,97	0,40	0,32
		(N)	0,55	0,32	0,27	0,21
		S/N ratio	2,25	3,02	1,48	1,52
	40	(P)	1,94	1,32	0,91	0,78
		(N)	0,81	0,20	0,25	0,23
		S/N ratio	2,40	6,55	3,63	3,26
1/6.000	10	(P)	0,68	0,46	0,23	0,17
		(N)	0,20	0,15	0,10	0,08
		S/N ratio	3,35	3,07	2,19	2,05
	15	(P)	0,64	0,48	0,20	0,15
		(N)	0,21	0,15	0,10	0,08
		S/N ratio	3,07	3,02	1,86	1,81
	20	(P)	0,46	0,34	0,21	0,14
		(N)	0,15	0,10	0,09	0,07
		S/N ratio	3,07	3,25	2,33	1,84
	25	(P)	0,31	0,24	0,16	0,12
		(N)	0,14	0,10	0,08	0,07
		S/N ratio	2,19	2,33	1,82	1,55
	30	(P)	0,23	0,17	0,16	0,09
		(N)	0,12	0,09	0,09	0,08
		S/N ratio	1,85	1,80	1,78	1,78
	40	(P)	0,25	0,18	0,14	0,12
		(N)	0,11	0,08	0,08	0,07
		S/N ratio	2,19	2,08	1,70	1,67

Tabla 15. Optimización del ensayo de ELISA indirecto durante la Fase I, utilizando la proteína recombinante TcD6. Se indica la dilución del Ac conjugado, la cantidad de proteína por pocillo, la DO a 450 nm de las muestras positivas (P), negativas (N) y la relación *signal to noise* entre ambos (S/N) junto con las diferentes diluciones del plasma. La relación S/N más alta es remarcada en color rojo.

6.10.1 Caracterización de paneles serológicos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el ensayo de ELISA indirecto, se procedió a analizar un panel de 333 muestras *T. cruzi*-positivas, provenientes de zonas geográficas endémicas para la EChc junto con 144 muestras *T. cruzi*-negativas, procedentes de las mismas áreas. La distribución de donantes por país se detalla en la **Figura 33**.

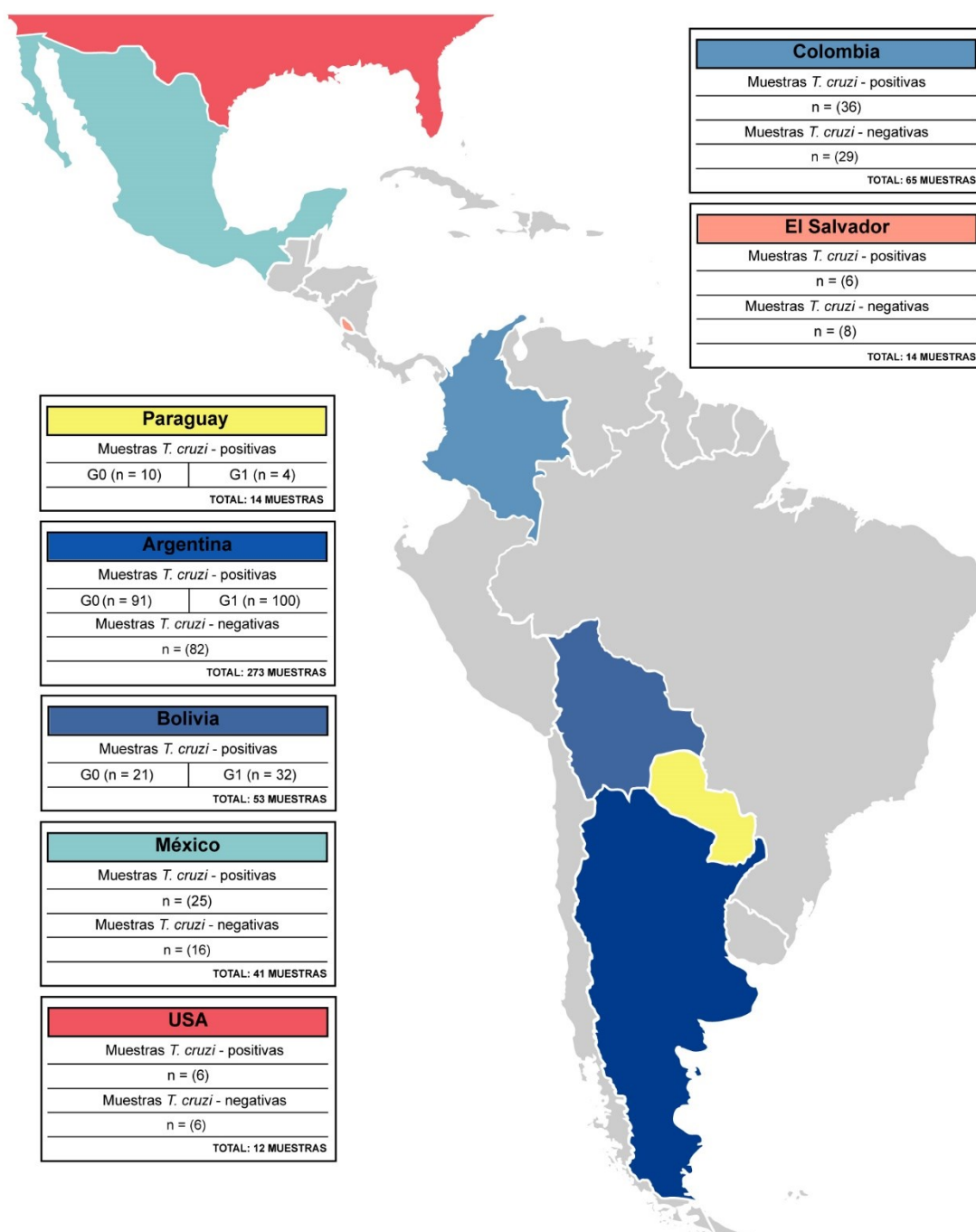


Figura 33. Distribución geográfica de las muestras analizadas durante la Fase I. Se detallan el número de muestras *T. cruzi*-positivas y negativas provenientes de individuos nacidos en las

zonas endémicas indicadas. En particular, para Paraguay, Argentina y Bolivia se detalla la proporción de individuos con EChc que manifiestan (G1) o no (G0) sintomatología clínica.

6.10.2 Rendimiento diagnóstico de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA.

Las muestras serológicas anteriormente descriptas fueron utilizadas para evaluar el rendimiento diagnóstico de rTcD3 y rTcD6 mediante ensayos de ELISA indirecto, utilizando las condiciones establecidas anteriormente. Los valores de AUC obtenidos por las curvas ROC (**Figura 34**, paneles derechos) fueron de 94,9% y 95,4% para rTcD3 y rTcD6, respectivamente. El análisis de los IR reveló diferencias estadísticamente significativas entre las muestras positivas en comparación con las muestras *T. cruzi*-negativas (**Figura 34**, paneles izquierdos; los datos individuales están disponibles en el Apéndice). En las muestras *T. cruzi*-positivas, rTcD3 mostró el IR más alto ($1,56 \pm 0,58$), seguido de rTcD6 ($1,51 \pm 0,95$). Para las muestras *T. cruzi*-negativas, los valores de IR fueron $0,66 (\pm 0,24)$ para rTcD3 y $0,61 (\pm 0,36)$ para rTcD6. Considerando la zona gris (valores de IR de $1,0 \pm 0,10$), relativamente pocas muestras resultaron no concluyentes: 36 (10,82%) para rTcD3 y 51 (15,31%) para rTcD6 en las muestras positivas, y 15 (10,63%) y 6 (4,25%) para rTcD3 y rTcD6, respectivamente, en las muestras negativas. Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos antígenos en cuanto a su capacidad diagnóstica.

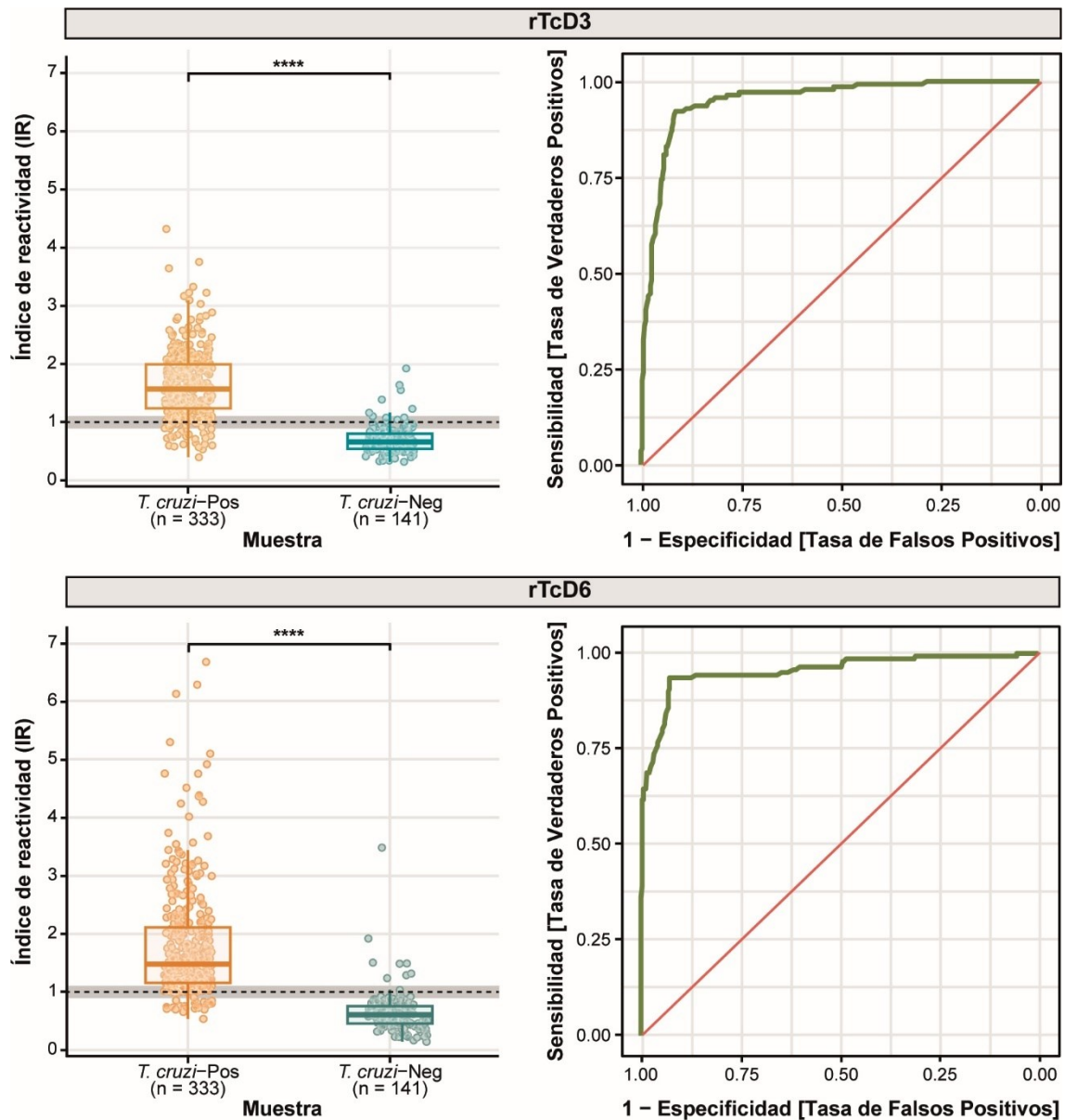


Figura 34. Representación gráfica de los índices de reactividad (IR) de los antígenos rTcD3 y rTcD6 en el estudio de Fase I (paneles izquierdos) junto con sus respectivas curvas ROC (paneles derechos). El valor de corte del IR se estableció en 1,00 (línea discontinua) y la zona de datos no concluyentes (valores de IR de $1,0 \pm 0,10$) se representó con un área gris. Cada punto en el gráfico representa el dato de un individuo. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney ($****p < 0,0001$). *T. cruzi*-Pos, muestras positivas para la EChc; *T. cruzi*-Neg, muestras negativas para la EChc.

Los parámetros de desempeño obtenidos individualmente para cada antígeno se encuentran resumidos en la **Tabla 16**. La proteína rTcD3 alcanzó una sensibilidad del 90,77% y especificidad del 92,20% mientras que rTcD6 exhibió sensibilidad del 92,79% y especificidad del 93,61%. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los antígenos cuando se compararon los valores de sensibilidad

y especificidad. La precisión máxima (93,04%) se alcanzó con rTcD6, mientras que rTcD3 obtuvo un valor ligeramente más bajo (90,77%). Según el índice de Youden (J), ambas moléculas presentaron una destacada capacidad discriminadora con valores superiores al 80,00%. El coeficiente *Kappa* de Cohen mostró concordancia sustancial (rTcD3) y casi perfecta (rTcD6) con las pruebas de referencia. El índice *diagnosis odds ratio* fue de 111,16 para TcD3 y 242,37 para rTcD6.

Parámetros de desempeño	rTcD3	rTcD6
AUC (%)	94,90 IC 95% [92,79 – 96,92]	95,40 IC 95% [93,12 – 97,69]
SEN (%)	90,77 IC 95% [87,05 – 93,59]	93,10 IC 95% [89,85 – 93,35]
ESP (%)	92,20 IC 95% [86,47 – 96,04]	93,60 IC 95% [88,23 – 97,04]
ACC (%)	90,77 IC 95% [87,73 – 93,13]	93,04 IC 95% [92,72 – 95,36]
J	82,67	86,64
Kappa	80,52 IC 95% [74,82 – 86,29]	86,14 IC 95% [78,52 – 88,92]
DOR	111,63 IC 95% [54,37 – 227,30]	242,37 IC 95% [106,89 – 549,65]

Tabla 16. Parámetros de rendimiento obtenidos para rTcD3 y rTcD6 en la Fase I de estudio. AUC, área bajo la curva; SEN, sensibilidad; ESP, especificidad; ACC, precisión; J, índice de Youden; DOR: *diagnosis odds ratio*; Kappa, coeficiente *Kappa* de Cohen; IC 95%, intervalo de confianza de 95%.

En resumen, tanto rTcD3 como rTcD6 demostraron ser eficaces para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, con ligeras diferencias en sus parámetros de rendimiento.

Por otro lado, además del desempeño individual de cada molécula, se analizó el desempeño diagnóstico en serie y en paralelo, empleando los resultados individuales obtenidos de las pruebas de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA. Según el esquema en serie, la sensibilidad fue menor a 85,00% mientras que la especificidad alcanzó valores del casi 100%. Nuevamente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los antígenos cuando se compararon los valores de sensibilidad y especificidad. En lo que respecta a la precisión, el valor alcanzado fue del 92,76%. Por otro lado, los valores de sensibilidad aumentaron a 99,00% cuando se utilizó un

esquema en paralelo, aunque esto se acompañó de una disminución en el valor de especificidad. La precisión obtuvo un valor de 91,60%.

Aproximación	SEN	ESP	ACC
INDIVIDUAL	%	%	%
rTcd3	90,77 IC 95% [87,05 – 93,59]	92,20 IC 95% [86,47 – 96,04]	90,77 IC 95% [87,73 – 93,13]
rTcd6	92,79 IC 95% [89,47 – 95,33]	93,62 IC 95% [88,23 – 97,04]	93,04 IC 95% [92,72 – 95,36]
SERIE	%	%	%
rTcd3 + rTcd6	84,23 IC 95% [79,95 – 92,62]	99,39 IC 95% [98,81 – 99,76]	92,76 IC 95% [90,09 – 94,96]
PARALELO	%	%	%
rTcd3 + rTcd6	99,50 IC 95% [98,70 – 99,90]	85,70 IC 95% [79,30 – 90,30]	91,60 IC 95% [87,7 – 94,5]

Tabla 17. Análisis del rendimiento diagnóstico de rTcd3 y rTcd6 considerando una aproximación individual, en serie y en paralelo. SEN, sensibilidad; ESP, especificidad; ACC, precisión; IC 95%, intervalo de confianza de 95%.

6.10.3 Rendimiento diagnóstico de rTcd3/rTcd6 IgG-ELISA según diferentes regiones endémicas para la EChc.

Una limitación crucial que exhiben las pruebas actualmente disponibles para el diagnóstico serológico de la EChc es la dificultad para mantener un rendimiento diagnóstico consistente en las diversas regiones geográficas donde esta afección es endémica. Esto se debe principalmente al elevado polimorfismo existente entre las cepas de *T. cruzi* en diversas regiones de América Latina y la diversidad de Acs desarrollados por los individuos infectados (Truyens *et al.*, 2021). Por lo tanto, para evaluar la heterogeneidad en el reconocimiento de rTcd3 y rTcd6, se compararon los valores de IR y sensibilidad al separar las muestras de individuos *T. cruzi*-positivos según su procedencia, a saber: Argentina (n = 191), Bolivia (n = 53), Colombia (n = 36), El Salvador (n = 8), México (n = 25), Paraguay (n = 14) y EE. UU. (n = 6). Los resultados revelaron diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad y los valores de IR de rTcd3 cuando se comparó Argentina con México. Al mismo tiempo, se encontró una comparación estadísticamente significativa de Argentina y Bolivia con El Salvador (**Figura 35**). En cambio, no se hallaron diferencias para rTcd6 (**Figura 35**).

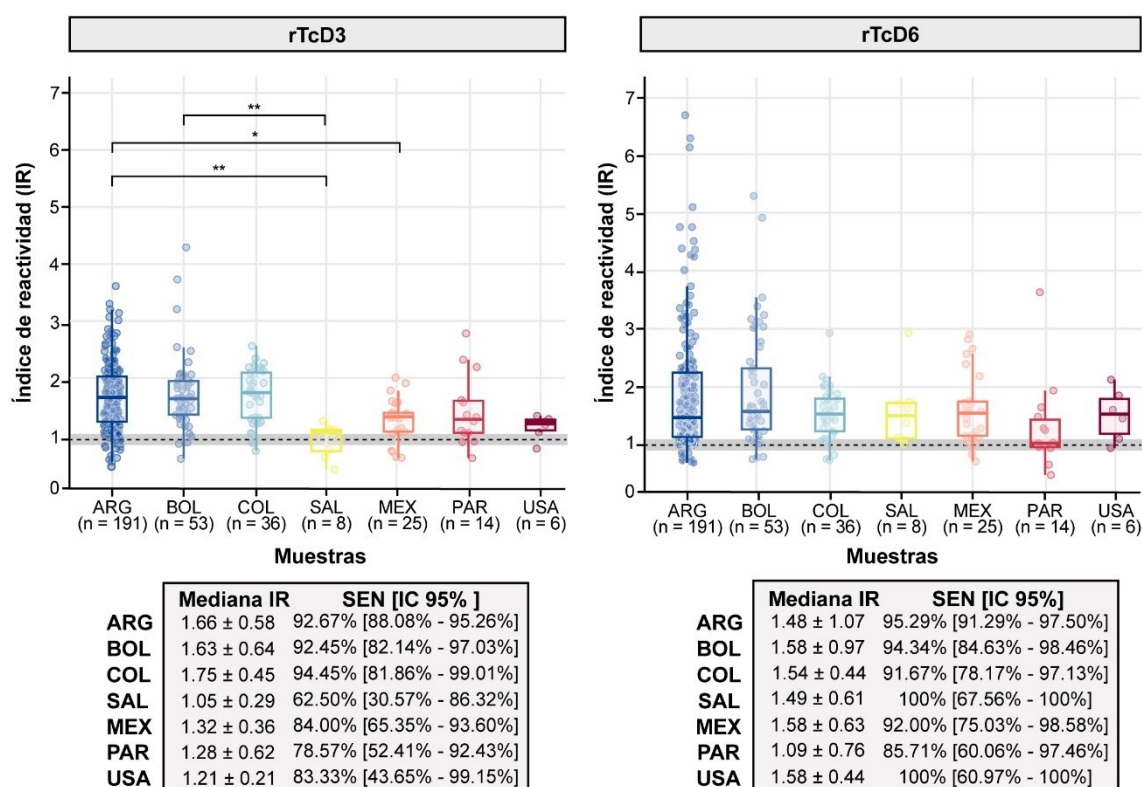


Figura 35. Evaluación del desempeño diagnóstico de las proteínas rTcd3 y rTcd6 según país de origen de las muestras de plasma. El valor de corte del IR se estableció en 1,00 (línea discontinua) y la zona de datos no concluyentes (valores de IR de $1,0 \pm 0,10$) se representó con un área gris. Cada punto en el gráfico representa el dato de un individuo. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Los paneles inferiores detallan la mediana del IR y la sensibilidad según país. ARG, Argentina; BOL, Bolivia; COL, Colombia; MÉX, México; PAR, Paraguay; SAL, El Salvador; EE. UU., Estados Unidos; IR, índice de reactividad; SEN, sensibilidad; IC 95%, intervalo de confianza de 95%.

6.10.4 Rendimiento diagnóstico de rTcd3/rTcd6 IgG-ELISA en pacientes con distintas formas clínicas de la EChc.

La utilización de antígenos recombinantes es recomendada en el contexto del serodiagnóstico de la EChc ya que incrementa la sensibilidad y especificidad pruebas serológicas (Santos *et al.*, 2016b; Candia-Puma *et al.*, 2022; Serrano *et al.*, 2024). No obstante, el perfil de reactividad puede fluctuar con la progresión y la sintomatología de la enfermedad (Longhi *et al.*, 2012). Teniendo esto en consideración, se ampliaron los estudios para determinar si los valores de IR y sensibilidad variaban en función del perfil clínico de los pacientes con EChc. Para ello, las muestras de plasmas de pacientes con EChc originarios de Argentina,

Bolivia y Paraguay se agruparon según si los individuos presentaban (G1, n = 136) o no (G0, n = 122) manifestaciones clínicas de la enfermedad. Cabe aclarar que sólo se emplearon las muestras provenientes de los países mencionados anteriormente debido a que presentaban una mejor caracterización clínica y epidemiológica. Los resultados mostraron que los plasmas de pacientes pertenecientes al grupo G1 arrojaron un valor de IR más alto en comparación con aquellos del grupo G0 para ambas proteínas (**Figura 36**). A pesar de esta tendencia, los hallazgos no fueron estadísticamente significativos.

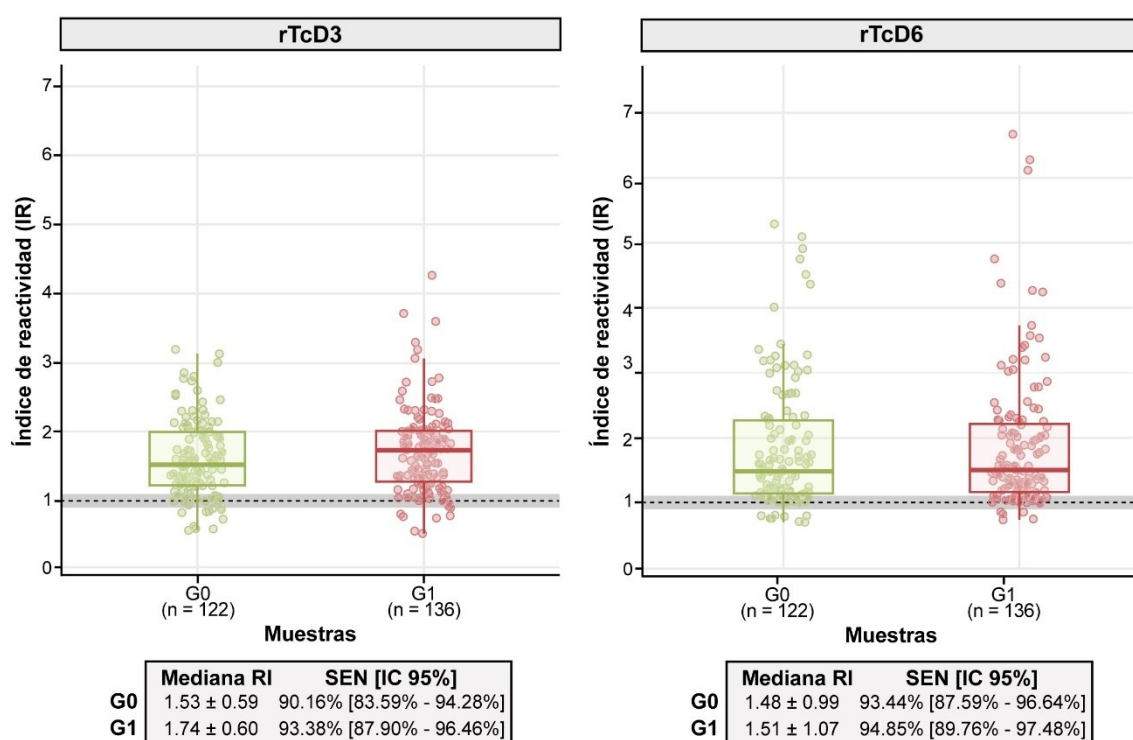


Figura 36. Evaluación del desempeño diagnóstico de rTcD3 y rTcD6 según las diferentes formas clínicas de la EChc. El valor de corte del IR se estableció en 1,00 (línea discontinua) y la zona de datos no concluyentes (valores de IR de $1,0 \pm 0,10$) se representó con un área gris. Cada punto en el gráfico representa el dato de un individuo. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. G0, pacientes con EChc sin sintomatología clínica; G1, pacientes con EChc con trastornos cardíacos o gastrointestinales. Los paneles inferiores detallan la mediana del IR y la sensibilidad según forma clínica de la enfermedad. RI, índice de reactividad; SEN, sensibilidad; IC 95%, intervalo de confianza de 95%.

6.10.5 Análisis combinatorio de resultados positivos.

De las 333 muestras plasmáticas positivas para la EChc, 42 (12,61%) mostraron resultados discordantes, 4 (1,20%) fueron falsos negativos tanto para rTcD3 como para rTcD6 y 287 (86,16%) fueron verdaderamente positivos para ambas proteínas durante el estudio de la Fase I. Entre los resultados discordantes, 27 muestras fueron positivas sólo para rTcD3 y 15 sólo para rTcD6 (**Figura 37**).

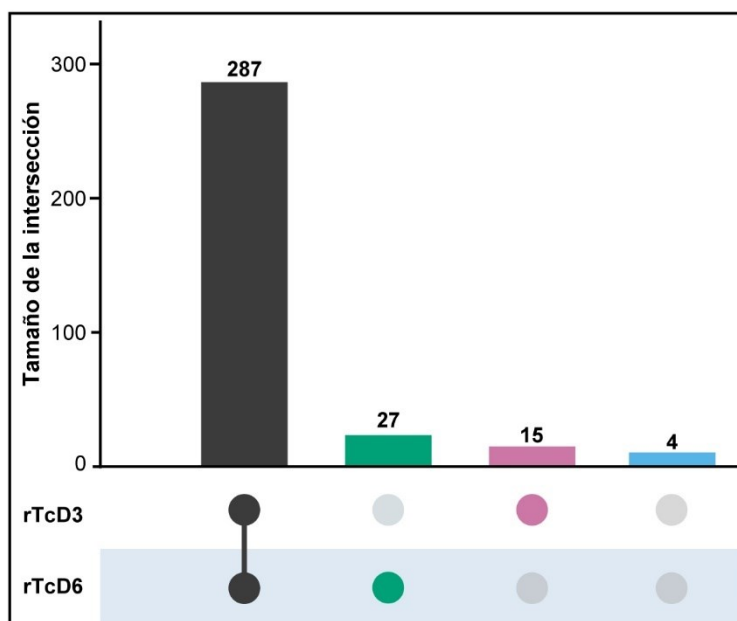


Figura 37. Análisis gráfico de la evaluación combinatoria utilizando los antígenos recombinantes TcD3 (rTcD3) y TcD6 (rTcD6) para muestras *T. cruzi* positivas durante la Fase I.

6.11 Ensayo de ELISA indirecto - Fase II

6.11.1 Estandarización de los componentes del ELISA indirecto.

Los estudios de Fase II presentados durante este trabajo de Tesis fueron realizados en colaboración con el Dr. Fred Luciano Neves Santos en el Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), Salvador de Bahía, Brasil. Para llevar a cabo los ensayos posteriores, fue necesario estandarizar nuevamente las condiciones del ELISA indirecto. Por lo tanto, el experimento de optimización se realizó utilizando 5, 10, 20, 40, 80 y 160 ng de ambas proteínas (rTcD3 y rTcD6) por pocillo y diluyendo las muestras de plasma 100 y 200 veces. En estas condiciones, el Ac conjugado se utilizó diluido 20.000, 40.000 y 80.000 veces.

La estandarización comenzó con el antígeno rTcD3. Conforme lo demostrado en la **Tabla 18**, la mejor diferencia entre muestras negativas y positivas se obtuvo con 10 ng de antígeno por pocillo, muestras de plasma diluidos 1/100 y Ac conjugado en una dilución 1/:80.000. En estas condiciones, la molécula fue capaz de distinguir entre *pooles* negativos y positivos con un valor de S/N mayor a 5,00.

Ac conjugado	Cantidad de antígeno: ng/pocillo	OD a 450 nm	Dilución plasma	
			1/100	1/200
1/20.000	5	(P)	2,04	1,51
		(N)	0,59	0,45
		S/N ratio	3,45	3,34
	10	(P)	2,31	1,47
		(N)	0,71	0,35
		S/N ratio	3,28	4,26
	20	(P)	2,30	1,55
		(N)	0,71	0,38
		S/N ratio	3,24	4,12
	40	(P)	2,23	1,14
		(N)	0,82	0,50
		S/N ratio	2,73	2,29
	80	(P)	2,29	1,43
		(N)	0,81	0,75
		S/N ratio	2,83	1,91
	160	(P)	2,44	1,48
		(N)	1,13	0,72
		S/N ratio	2,16	2,04
1/40.000	5	(P)	1,10	0,66
		(N)	0,22	0,14
		S/N ratio	5,02	4,68
	10	(P)	1,03	0,56
		(N)	0,21	0,15
		S/N ratio	4,85	3,82
	20	(P)	0,75	0,60
		(N)	0,20	0,16
		S/N ratio	3,83	3,66
	40	(P)	1,21	0,55
		(N)	0,46	0,28
		S/N ratio	2,63	1,98
	80	(P)	1,14	0,51
		(N)	0,51	0,32
		S/N ratio	2,22	1,57
	160	(P)	1,12	0,43
		(N)	0,56	0,39
		S/N ratio	1,99	1,12
1/80.000	5	(P)	1,00	0,64
		(N)	0,21	0,14
		S/N ratio	4,68	4,68
	10	(P)	1,16	0,53

		(N)	0,22	0,13
		S/N ratio	5,31	4,19
		(P)	1,06	0,69
	20	(N)	0,24	0,19
		S/N ratio	4,40	3,66
		(P)	0,73	0,37
	40	(N)	0,23	0,11
		S/N ratio	3,26	3,46
		(P)	0,65	0,49
	80	(N)	0,25	0,15
		S/N ratio	2,57	3,30
		(P)	0,72	0,46
	160	(N)	0,29	0,16
		S/N ratio	2,46	2,87

Tabla 18. Optimización del ensayo de ELISA indirecto con rTcd3 durante la Fase II. Se indica la dilución del Ac conjugado, la cantidad de proteína por pocillo, la DO a 450 nm de las muestras positivas (P), negativas (N) y la relación *signal to noise* entre ambos (S/N) junto con las diferentes diluciones del plasma. La relación S/N más alta es remarcada en color rojo.

A continuación, la proteína rTcd6 fue estandarizada bajo las mismas condiciones (**Tabla 19**).

Ac conjugado	Cantidad de antígeno: ng/pocillo	OD a 450 nm	Dilución plasma	
			1/100	1/200
1/20.000	5	(P)	2,57	2,22
		(N)	0,80	0,31
		S/N ratio	3,21	7,17
	10	(P)	2,57	2,19
		(N)	0,61	0,32
		S/N ratio	4,19	6,85
	20	(P)	2,56	2,05
		(N)	0,69	0,30
		S/N ratio	3,72	6,93
	40	(P)	2,18	1,44
		(N)	0,76	0,52
		S/N ratio	2,86	2,76
	80	(P)	2,33	1,69
		(N)	0,76	0,59
		S/N ratio	3,08	2,84
	160	(P)	2,49	1,42
		(N)	0,69	0,46
		S/N ratio	3,60	3,10
1/40.000	5	(P)	1,84	1,06
		(N)	0,44	0,22
		S/N ratio	4,20	4,85

	10	(P)	1,71	1,31
		(N)	0,39	0,31
		S/N ratio	4,37	4,17
	20	(P)	1,68	1,25
		(N)	0,43	0,28
		S/N ratio	3,90	5,10
	40	(P)	1,65	1,10
		(N)	0,42	0,27
		S/N ratio	3,90	4,09
	80	(P)	1,35	0,92
		(N)	0,43	0,30
		S/N ratio	3,12	3,03
	160	(P)	1,42	0,96
		(N)	0,51	0,29
		S/N ratio	2,78	3,27
1/80.000	5	(P)	1,00	0,64
		(N)	0,21	0,11
		S/N ratio	4,69	5,99
	10	(P)	1,12	0,53
		(N)	0,21	0,10
		S/N ratio	5,46	5,32
	20	(P)	1,07	0,69
		(N)	0,25	0,19
		S/N ratio	4,30	3,66
	40	(P)	0,94	0,69
		(N)	0,22	0,22
		S/N ratio	4,22	3,20
	80	(P)	1,02	0,68
		(N)	0,32	0,24
		S/N ratio	3,15	2,89
	160	(P)	0,90	0,71
		(N)	0,33	0,23
		S/N ratio	2,78	3,15

Tabla 19. Optimización del ensayo de ELISA indirecto de rTcD6 durante la Fase II. Se indica la dilución del Ac conjugado, la cantidad de proteína por pocillo, la media aritmética de la DO a 450 nm de las muestras positivas (P), negativas (N) y la relación *signal to noise* entre ambos (S/N) junto con las diferentes diluciones del plasma. La relación S/N más alta es remarcada en color rojo.

Según se desprende de la Tabla anterior, las condiciones consideradas satisfactorias se alcanzaron con una concentración de antígeno de 10 ng, una dilución de plasma de 1/100 y del conjugado de 1/80000. En estas circunstancias, la proteína rTcD6 también logró diferenciar de manera precisa los *pools* negativos y positivos, con un valor superior a 5,00. Es esencial destacar que, aunque para rTcD6

se observan condiciones en las cuales el valor de la relación señal/ruido (S/N ratio) supera los considerados óptimos (por ejemplo, en la condición de antígeno de 5 ng, una dilución de plasma de 1/200 y del conjugado de 1:20.000), estos no cumplen con el criterio de que la media aritmética de los *pooles* negativos sea menor a 0,250 y/o la media arimétrica de los *pooles* positivos sea mayor a 1,00; por lo tanto, no fue la condición de elección.

6.11.2 Cálculo del tamaño muestral y caracterización de paneles serológicos.

Las muestras de plasmas que constituyeron el panel serológico de la Fase II se obtuvieron tal como se describe en la sección 5.29.1 de Materiales y Métodos. El diseño muestral determinó un mínimo de 319 muestras positivas y 319 negativas para la EChc para obtener resultados estadísticamente significativos (**Figura 38**).

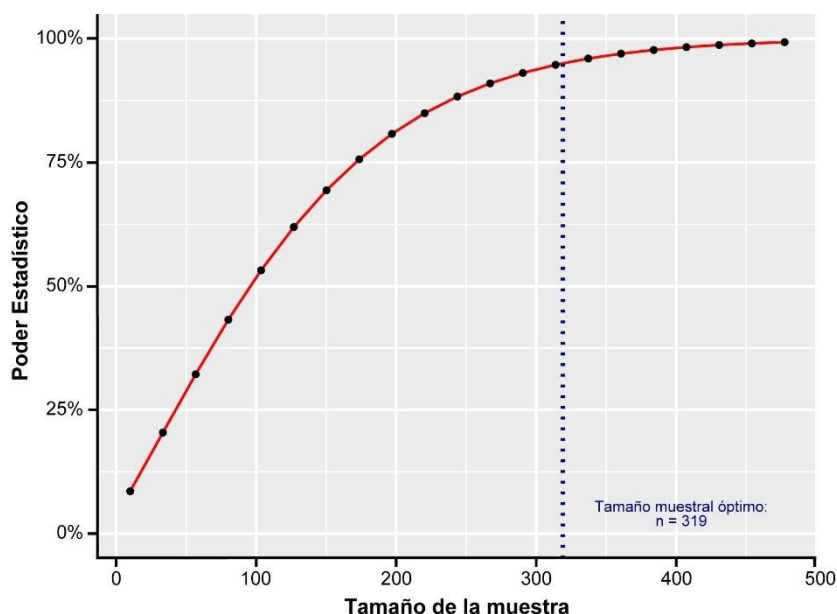


Figura 38. Asociación entre el tamaño de la muestra y el poder estadístico para una correlación de 0,2, con un α 0,05. Se detalla el número muestral (n) sugerido para alcanzar un poder del 0,99 (99%).

En esta instancia, se incluyeron un total de 405 muestras *T. cruzi*-positivas de áreas endémicas y no endémicas de Brasil, junto con 530 muestras *T. cruzi*-negativas provenientes de las mismas. La distribución de donantes por estados se detalla en la **Figura 39**.

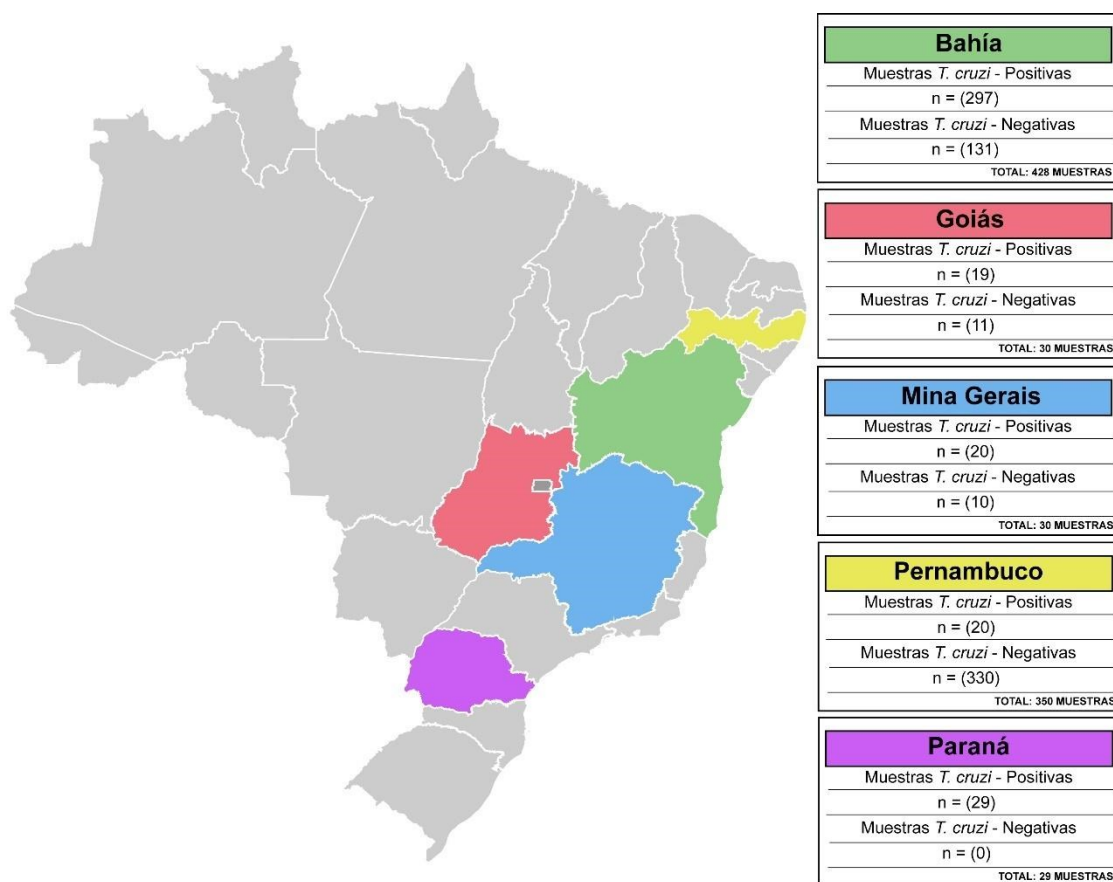


Figura 39. Distribución geográfica de las muestras analizadas durante la Fase II oriundas de Brasil. Se detalla el número de muestras *T. cruzi*-positivas y negativas provenientes de individuos nacidos en los estados indicados.

6.11.3 Rendimiento diagnóstico de rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA – Fase II.

El panel serológico descrito anteriormente fue utilizado para determinar si estos antígenos conservaban su rendimiento diagnóstico al ser sometidos a una cohorte más extensa de pacientes proveniente de otra región geográfica, empleando las condiciones definidas en la sección 7.3.1. El AUC en las curvas de ROC para rTcD3 fue 92,89% y para rTcD6 de 92,11% (**Figura 40**, paneles derechos), lo cual indica que estos antígenos presentaron un excelente potencial diagnóstico. Por otro lado, se hallaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores de IR obtenidos de las muestras positivas con aquellos derivados de las muestras negativas (**Figura 40**, paneles izquierdos; los datos individuales están disponibles en el Apéndice). Al analizar las muestras positivas para *T. cruzi*, si bien rTcD3 presentó el valor de IR ($1,61 \pm 0,52$) más alto en comparación a rTcD6 ($1,51 \pm 0,73$), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Con respecto a las

muestras negativas para *T. cruzi*, los valores de IR estuvieron por debajo de 0,5 para ambos antígenos ($0,45 \pm 0,23$ para rTcD3 y $0,45 \pm 0,22$ para rTcD6). Teniendo en cuenta la zona gris (valores de IR de $1,0 \pm 0,10$), se observó que 13 (3,95%) y 16 (4,86%) muestras *T. cruzi*-positivas fueron caracterizadas como no concluyentes cuando se utilizaron las proteínas rTcD3 y rTcD6, respectivamente. Asimismo, sólo 1 (0,18%) muestra *T. cruzi*-negativa ensayada con estas proteínas presentó resultados dentro del margen inconcluso. Al igual que lo observado en Fase I, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad diagnóstica entre ambas proteínas.

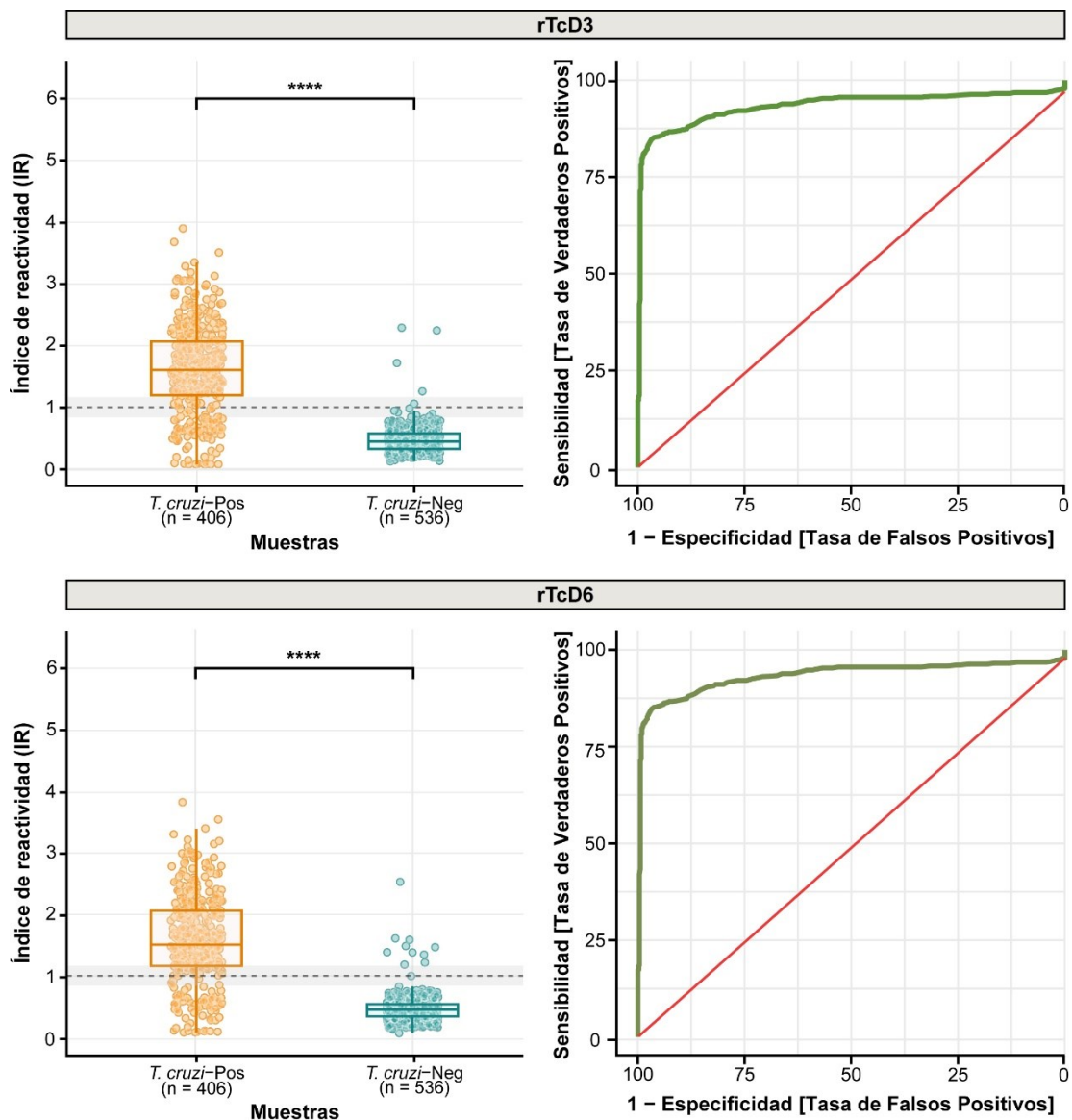


Figura 40. Representación gráfica de los índices de reactividad (IR) de los antígenos rTcD3 y rTcD6 en el estudio de Fase II (paneles izquierdos) junto con sus respectivas curvas ROC (paneles derechos). El valor de corte del IR se estableció en 1,00 (línea discontinua) y la zona de datos no concluyentes (valores de IR de $1,0 \pm 0,10$) se representó con un área gris. Cada punto en

el gráfico representa el dato de un individuo. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney ($****p < 0,0001$). *T. cruzi*-Pos, muestras positivas para la EChc; *T. cruzi*-Neg, muestras negativas para la EChc.

Los parámetros de rendimiento para cada antígeno se detallan en la **Tabla 20**. La sensibilidad exhibió valores de 79,51% y 81,48% para rTcD3 y rTcD6, respectivamente. En referencia a la especificidad, ambas moléculas mostraron un valor de 97,92%. Finalmente, la precisión arrojó un valor de 89,95% para rTcD3 y del 90,80% para rTcD6. En lo que respecta al índice de J, ambas moléculas exhibieron valores más moderados en comparación con la Fase I. No obstante, ambos antígenos mantienen una destacada capacidad discriminatoria con valores mayores al 77,00%.

Parámetros de desempeño	rTcD3	rTcD6
AUC (%)	92,89 IC 95% [90,82 – 94,95]	92,11 IC 95% [89,97 – 94,26]
SEN (%)	79,51 IC 95% [75,31 – 83,15]	81,84 IC 95% [77,41 – 84,96]
ESP (%)	97,92 IC 95% [96,32 – 98,84]	97,92 IC 95% [96,32 – 98,84]
ACC (%)	89,95 IC 95% [87,85 – 91,71]	90,80 IC 95% [88,78 – 92,49]
J (%)	77,43	79,41
RV +	38,30 IC 95% [21,30 – 68,89]	39,25 IC 95% [21,83 – 70,58]
RV -	0,209 IC 95% [0,173 – 0,254]	0,189 IC 95% [0,154 – 0,232]
Kappa	80,52 IC 95% [74,82 – 86,29]	80,91 IC 95% [77,06 – 84,75]
DOR	183,04 IC 95% [96,12 – 348,56]	207,60 IC 95% [108,62 – 396,74]

Tabla 20. Parámetros de rendimiento obtenidos para cada una de las proteínas recombinantes durante la Fase II de estudio. AUC, área bajo la curva; SEN, sensibilidad; ESP, especificidad; ACC, precisión; J, índice de Youden; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; RV+, razón de verosimilitud positiva; RV-, razón de verosimilitud negativa; DOR, *diagnosis odds ratio*; Kappa, coeficiente *Kappa* de Cohen; IC 95%, intervalo de confianza de 95%.

Para determinar de forma más precisa la probabilidad de los antígenos para diagnosticar la EChc, se calcularon las razones de verosimilitud positivas (RV+) y negativas (RV-). La proteína rTcD6 presenta una mayor probabilidad positiva con una RV+ estimada de 39,34 seguida por rTcD3 con una probabilidad positiva estimada de 38,22. En relación a la RV-, la más baja fue para rTcD6 (RV-: 0,185) seguido por rTcD3 (RV-: 0,209). Asimismo, al igual que en la Fase I, el coeficiente *Kappa* de Cohen reveló

una concordancia sustancial (rTcd3) y casi perfecta (rTcd6) con las pruebas de referencia. Por último, el índice DOR de las proteínas rTcd3 y rTcd6 fueron 183,7 y 208,8, respectivamente.

Por otro lado, además de evaluar el rendimiento individual de cada molécula, tal como se hizo durante la Fase I, se examinó su capacidad diagnóstica tanto en un enfoque en serie como en paralelo, utilizando los resultados individuales de las pruebas de rTcd3/rTcd6 IgG-ELISA obtenidos en la Fase II. Bajo el enfoque en serie, la sensibilidad disminuyó al 65,00%, mientras que la especificidad alcanzó el 100%. En cuanto a la precisión, se obtuvo un valor del 84,72%. Por otro lado, bajo un enfoque en paralelo, la sensibilidad se elevó al 99,00%, aunque esto conllevó una reducción en la especificidad. Respecto a la precisión, se registró un valor del 96,00%, superando lo observado en la Fase I.

Aproximación	SEN	ESP	ACC
INDIVIDUAL	%	%	%
rTcd3	79,51 IC 95% [75,31 – 83,15]	97,92 IC 95% [96,32 – 98,84]	89,95 IC 95% [87,85 – 91,71]
rTcd6	81,48 IC 95% [77,41 – 84,96]	97,92 IC 95% [96,32 – 98,84]	90,80 IC 95% [88,78 – 92,49]
SERIE	%	%	%
rTcd3 + rTcd6	64,78 IC 95% [58,29 – 70,65]	99,96 IC 95% [99,86 – 99,99]	84,72 IC 95% [81,86 – 87,28]
PARALELO	%	%	%
rTcd3 + rTcd6	99,50 IC 95% [98,70 – 99,90]	84,90 IC 95% [79,30 – 90,30]	96,00 IC 95% [93,50 – 97,60]

Tabla 21. Análisis del rendimiento diagnóstico de las proteínas rTcd3 y rTcd6 considerando una aproximación individual, en serie y en paralelo. SEN, sensibilidad; ESP, especificidad; ACC, precisión.

En conjunto estos datos respaldaron los resultados obtenidos durante la Fase I, confirmando que ambos antígenos derivados de Tc323 mantienen su eficacia diagnóstica para distinguir entre muestras positivas y negativas para la EChc con elevados parámetros de desempeño.

6.11.4 Análisis combinatorio de resultados positivos.

De las 406 muestras plasmáticas positivas para la EChc, 46 (11,33%) mostraron resultados discordantes, 54 (13,30%) fueron falsos negativos y 305 (75,12%) fueron

verdaderamente positivos durante el estudio de la Fase II. Entre los resultados discordantes, 18 muestras fueron positivas sólo para rTcD3 y 28 sólo para rTcD6 (**Figura 41**).

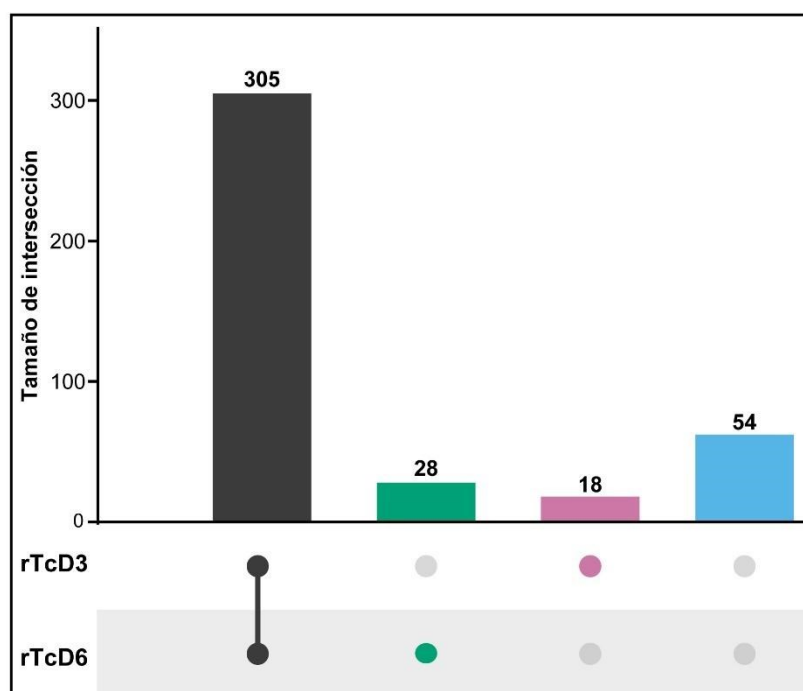


Figura 41. Análisis gráfico de la evaluación combinatoria utilizando los antígenos recombinantes TcD3 (rTcD3) y TcD6 (rTcD6) para muestras *T. cruzi*-positivas durante la Fase II.

6.11.5 Análisis de reactividad cruzada.

La probabilidad de reactividad cruzada con otros patógenos, especialmente *Leishmania spp.*, plantea un desafío importante para la especificidad de los ensayos serológicos que se utilizan actualmente para el diagnóstico de la EChc (Tavares Daltro *et al.*, 2019). En consecuencia, se incluyeron 804 muestras de plasma de donantes portadores de otras enfermedades infecciosas, definidas por sus diagnósticos serológicos, para evaluar la reactividad cruzada: COVID-19 (n = 10), dengue (n = 21), esquistosomiasis (n = 45), filariosis (n = 50), lepra (n = 15), virus de la hepatitis B (VHB; n = 78), virus de la hepatitis C (VHC; n = 49), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH; n = 76), virus linfotrópico de células T humanas I/II (VTLH; n = 43), leishmaniasis cutánea (n = 65), leishmaniasis visceral (n = 95), leptospirosis (n = 97), rubeola (n = 16), sífilis (n = 110), toxoplasmosis (n = 31), estrongiloidiasis (n = 3). Se detectó reactividad contra rTcD3 en el 0,62% (5/804) de las muestras analizadas (leishmaniasis visceral: 2; leptospirosis: 1; toxoplasmosis: 2), mientras que con rTcD6 fueron reactivas el 0,87%

(7/804) de las muestras analizadas (leishmaniasis visceral: 4; leptospirosis: 1; toxoplasmosis: 2), tal como se representa en la **Figura 42** (los datos individuales están disponibles en el Apéndice). Al considerar la zona gris (valores de IR de $1,0 \pm 0,10$), se observó que sólo el 0,12% (1/804) presentó un resultado no concluyente para rTcD3.

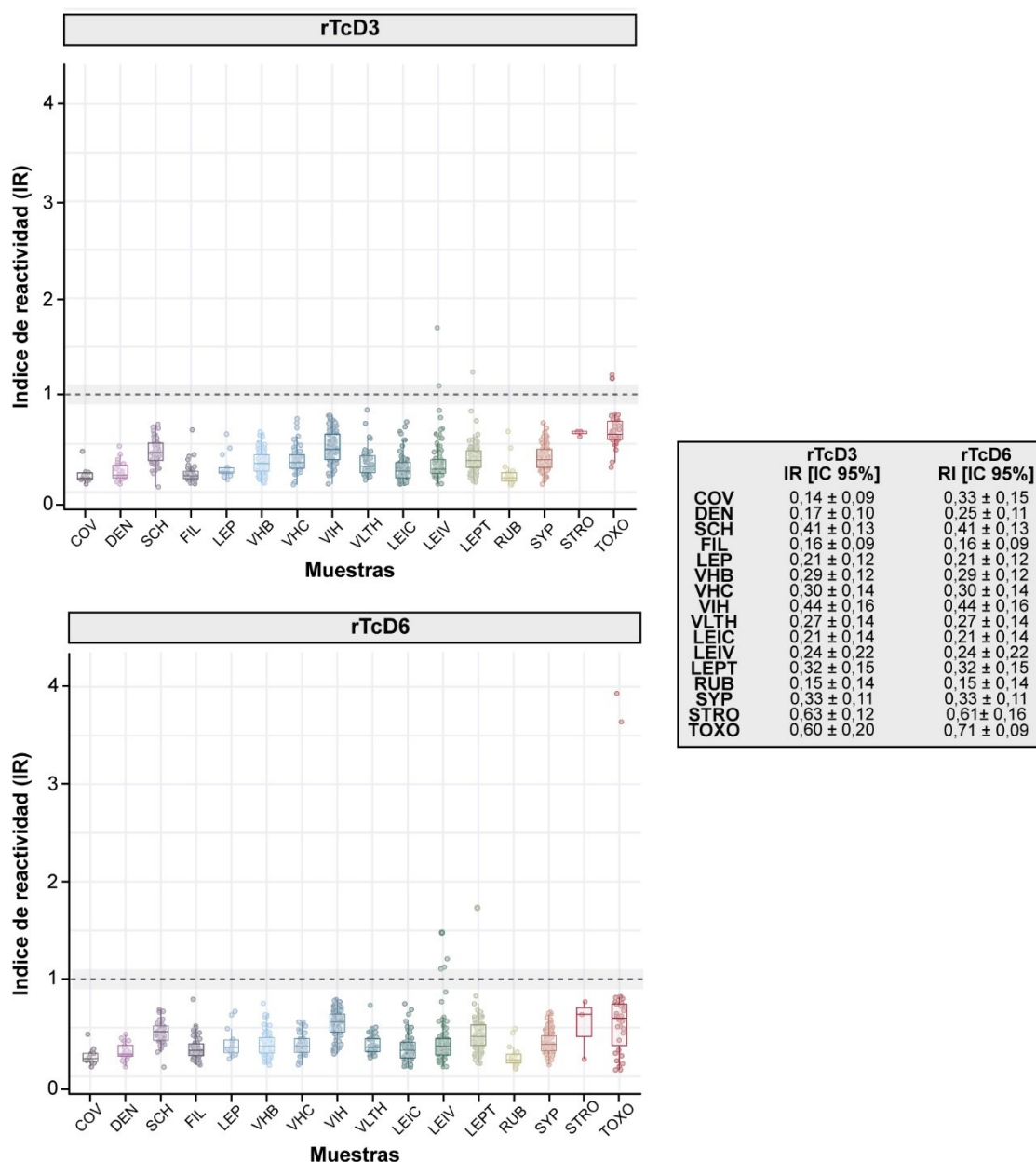


Figura 42. Representación gráfica de la reactividad cruzada de rTcD3 y rTcD6 con plasma de individuos portadores de diversas enfermedades infecciosas. El valor de corte del IR se estableció en 1,00 (línea discontinua) y la zona de datos no concluyentes (valores de IR de $1,0 \pm 0,10$) se representó con un área gris. Cada punto en el gráfico representa el dato de un individuo. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. El panel lateral derecho detalla la mediana del IR de ambas proteínas según las distintas enfermedades. IR, índice de reactividad; COV, COVID-19; DEN, dengue; SCH, esquistosomiasis; FIL, filariasis; LEP, lepra; VHB, infección por virus de la hepatitis B; VHC, infección por virus de la hepatitis C; VIH, infección por virus de la inmunodeficiencia humana; VLTH, infección por virus linfotrópico T humano; LEIC, leishmaniasis cutánea; LEIV, leishmaniasis visceral;

6.12 Determinación del epítipo de reconocimiento del Ac scFv 6B6.

Puesto que D3 y D6 fueron las regiones más inmunogénicas por predicción, la siguiente fase se enfocó en determinar si alguno de estos dominios era reconocido por el Ac scFv 6B6. Los resultados mostraron que el Ac no reconoció a rTcD3 ni rTcD6, mientras que si se detectó reactividad contra Tc323 presente en el lisado de *T. cruzi* utilizado como control positivo (**Figura 43A y B**).

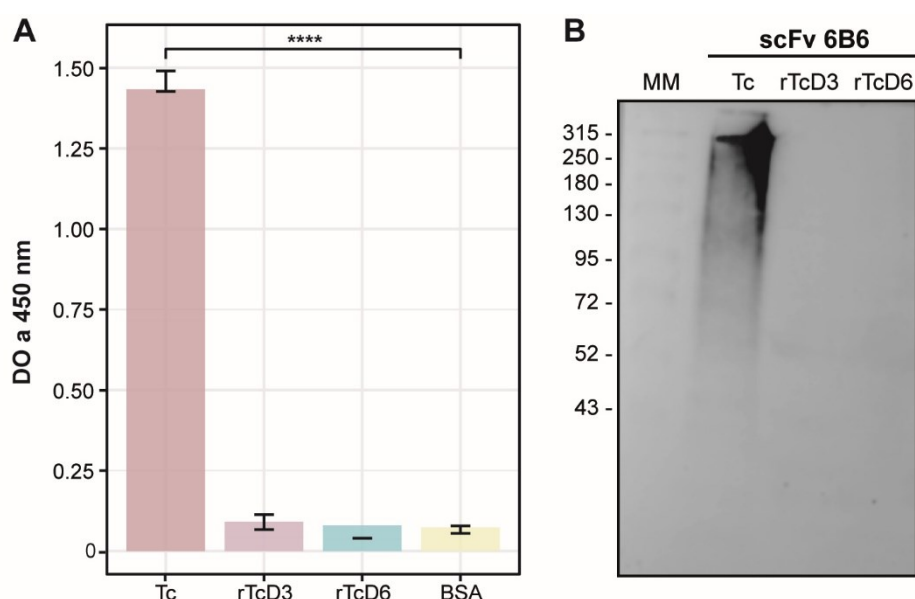


Figura 43. Reactividad del Ac scFv 6B6 frente a rTcD3 y rTcD6 mediante ensayo de ELISA y WB. (A) ELISA del Ac scFv 6B6 contra extracto celular total de epimastigotes de *T. cruzi* (Tc; cepa Dm28c) (20 µg/mL), rTcD3 (40 ng), rTcD6 (40 ng) y BSA como proteína no relacionada (5 µg/mL). Los datos se expresan como la DO a 450 nm [media ± DS, n = 2]. Las diferencias entre las medias de unión del scFv 6B6 a Tc, rTcD3 o rTcD6 *versus* BSA fueron evaluadas mediante ANOVA de un factor, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (**** $p < 0,0001$). Las barras representan el DS. (B) Un total de 30 µg de lisado total de epimastigotes de *T. cruzi* (Tc; cepa Dm28c) y 2 µg de las proteínas rTcD3 y rTcD6 fueron separados por SDS-PAGE (8%), transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con el Ac scFv 6B6. La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en kDa) se indican a la izquierda.

En función de los resultados obtenidos, se realizó una simulación *in silico* de la interacción nativa entre scFv 6B6 y Tc323 a fin de identificar los sitios de unión entre ambos. Para ello, las estructuras aminoacídicas de ambas proteínas fueron sometidas al servidor en línea HADDOCK v2.0 para su acoplamiento. Como resultado, se identificaron dos sitios de interacción predichos entre scFv 6B6 y Tc323

(clústeres). El *clúster* N°1 mostró valores positivos de HADDOCK y Z-score, por lo que fue descartado, mientras que el *clúster* N°2 presentó valores negativos para estos parámetros y fue seleccionado para un análisis más detallado. El puntaje HADDOCK se calculó como una combinación de las fuerzas de *van der Waals*, electrostáticas, de desolvatación empírica y de restricción, junto con el *buried surface area* (bsa). El Z-score general de calidad del modelo se representa por el número de desviaciones estándar del promedio hacia un *clúster* particular. Adicionalmente, el parámetro bsa, que mide la cantidad de la superficie de la proteína sin contacto con el agua, mostró un valor positivo elevado para este *clúster*, indicando que el complejo estructural es compacto. El mejor complejo estructural de este *clúster* se descargó como un archivo PDB y se visualizó utilizando el software PyMOL v2.5.7. Como se esquematiza en la **Figura 44**, los residuos A165, D204, E223, F193, G212, K229, R186, S189 y S214 del Ac scFv 6B6, así como G2252, G2307, K2262, N2266, N2183, N2271, P2275, Q2104 y S2144 de Tc323 (correspondientes al D5), se identificaron como responsables de la interacción Ag-Ac, respectivamente.

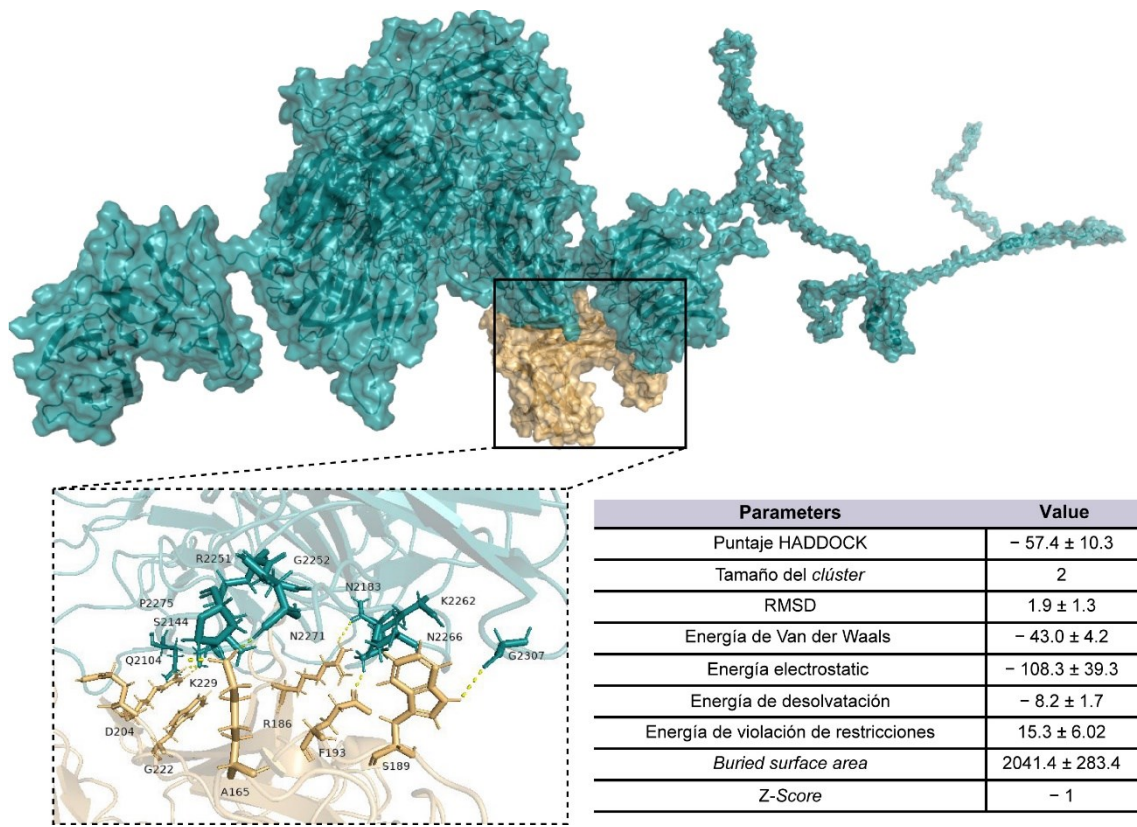


Figura 44. Análisis de acoplamiento molecular entre el Ac scFv 6B6 y Tc323. La tabla presenta las puntuaciones obtenidas en la simulación de la interacción entre Tc323 y el Ac scFv 6B6 mediante el programa HADDOCK (panel derecho). El complejo proteína-proteína reveló interacciones superficiales entre Tc323 (en azul) y scFv 6B6 (en marrón claro), visualizadas a

través del software PyMOL. Los residuos clave involucrados en las interacciones ligando-proteína se destacan en un diagrama de cinta en una vista detallada en el recuadro (panel izquierdo).

El siguiente paso consistió en evaluar experimentalmente la información obtenida de la simulación *in silico* anterior. Para ello, nuevamente se utilizó el ensayo de WB, empleando un lisado bacteriano que expresaba a la proteína recombinante D5 (ver **Figura 25**) dado que no fue posible su purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando su *tag* de histidinas. Los resultados mostraron sólo reactividad del Ac scFv 6B6 contra Tc323 presente en el lisado de *T. cruzi* utilizado como control positivo (**Figura 45**).

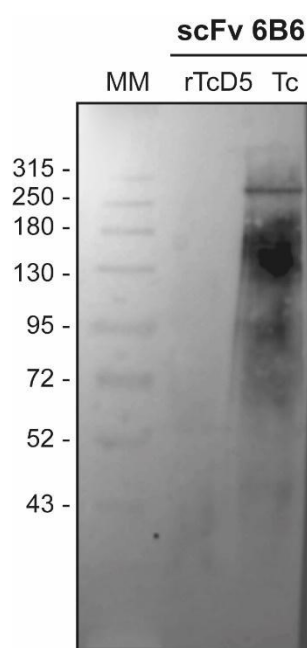


Figura 45. Reactividad del Ac scFv 6B6 frente a rTcD5 mediante ensayo de WB. Un total de 30 µg de lisado de epimastigotes de *T. cruzi* (Tc; cepa CL-Brener) y 10 µL de extracto celular inducido de bacterias BL21(DE3) pLysE transformadas el vector pRSET-A(D5) (rTcD5) fueron separados por SDS-PAGE (8%), transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con el Ac scFv m6B6. La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL. Los marcadores de peso molecular (MM; expresados en kDa) se indican a la izquierda.

A partir de estos resultados, se hipotetizó que el epítipo reconocido por el Ac 6B6 podría requerir modificaciones postraduccionales (MPTs) generadas por el parásito. Para confirmar esta hipótesis, el dominio 5 se expresó de manera recombinante en el citoplasma del kinetoplástido *L. tarentolae*. Así, inicialmente se generó la construcción pLEXSY-Ible3-D5 mediante la amplificación de dicho fragmento a partir de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c), la cual fue confirmada

por digestión con enzimas de restricción (**Figura 46**) y su identidad por secuenciación.

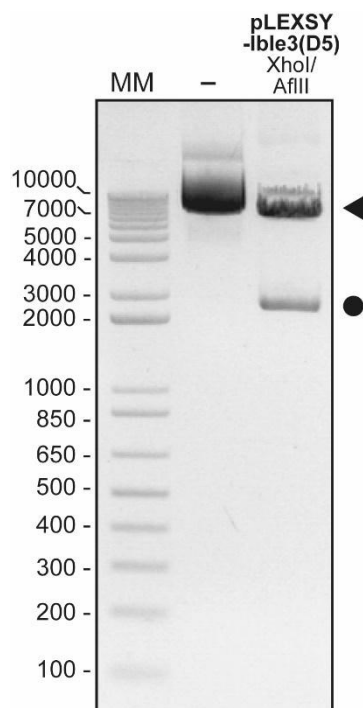


Figura 46. Confirmación del plásmido pLEXSY-Ible3 recombinante mediante digestión con enzimas de restricción. La construcción pLEXSY-Ible3-D5 fue doblemente digerida con las enzimas de restricción detalladas en la Figura. Una muestra de construcción plasmídica sin digerir (-) fue utilizada como control. La flecha indica el vector pLEXSY-Ible3 sin inserto (~7300 pb) mientras que el círculo señala la posición del fragmento D5 liberado tras la digestión. Los marcadores de pares de bases (MM) (expresados en pb) se indican a la izquierda

Una vez confirmada su obtención, el vector recombinante pLEXSY-Ible3(D5) se aisló mediante midipreparaciones y luego se digirió con la enzima *SwaI*. Este proceso favorece la integración de la construcción por recombinación homóloga en el genoma de *L. tarentolae*, además de descartar los elementos del plásmido que sólo son necesarios para su replicación en *E. coli* (**Figura 47**).

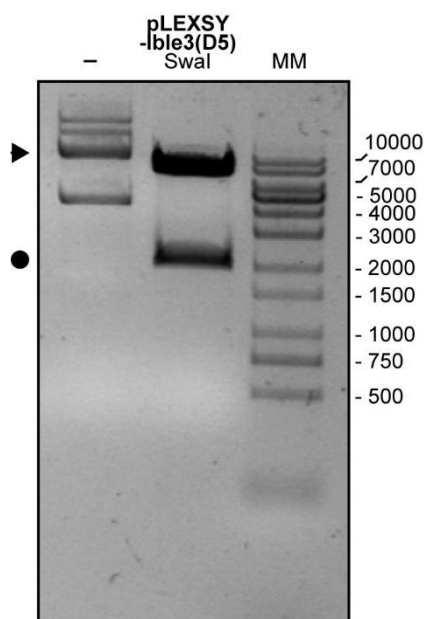


Figura 47. Linealización del plásmido recombinante pLEXSY-Ible3(D5). La construcción pLEXSY-Ible3-D5 se digirió con la enzima de restricción detallada en la Figura. Una muestra de construcción plasmídica sin digerir (-) fue utilizada como control. Para el caso particular del carril “pLEXSY-Ible3(D5)”, la flecha indica el plásmido linealizado luego de la digestión (~8400 pb) mientras y el círculo la liberación de los elementos de replicación en *E. coli* (~2000 pb). Los marcadores de peso molecular (MM) (expresados en pb) se indican a la derecha.

Luego de obtener el vector linealizado, el siguiente paso consistió en utilizar el mismo para transfectar a la cepa T7TR de *L. tarentolae*. Los parásitos transfectados se cultivaron con el antibiótico de selección Bleomicina (o su análogo Zeocina), hasta lograr la ausencia de crecimiento de los cultivos controles. El análisis de expresión heteróloga del dominio D5 se realizó por ensayos de WB, tomando una muestra del cultivo recombinante tras el agregado de Tetraciclina como agente inductor e incluyendo el correspondiente cultivo sin inducir. A pesar de múltiples intentos, no fue posible confirmar, mediante ensayos de WB, la expresión del dominio proteico utilizando un Ac dirigido contra su *tag* de fusión 6xHis. Sin embargo, se corroboró la transfección exitosa de los promastigotes de *L. tarentolae* mediante la amplificación del D5 por PCR a partir de ADN genómico (**Figura 48A**) e inmunofluorescencia (**Figura 48B**).

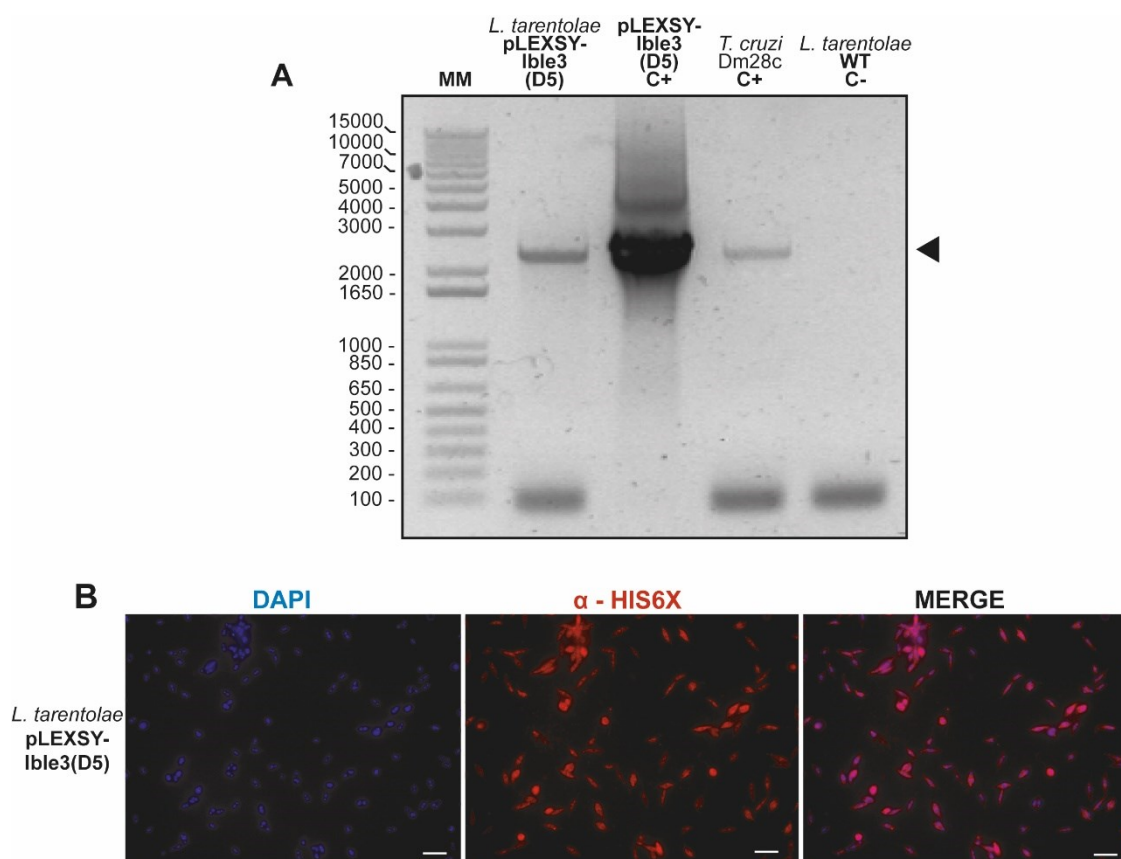


Figura 48. Confirmación de la transfección de promastigotes de *L. tarentolae* con la construcción pLEXSY-Ible3(D5). (A) PCR confirmatoria de la inserción de la construcción pLEXSY-Ible3(D5) en el genoma de *L. tarentolae*. La midipreparación utilizada para la transfección (pLEXSY-Ible3(D5)) y ADN genómico de *T. cruzi* (cepa Dm28c) fueron utilizados como control positivo (C+) de la amplificación. Como control negativo (C-) se empleó para la amplificación ADN genómico de promastigotes silvestres de *L. tarentolae* (*L. tarentolae* WT). La flecha indica la posición de la amplificación del D5. Los marcadores de peso molecular (MM) (expresados en pb) se indican a la izquierda. (B) Inmunofluorescencia indirecta de promastigotes de *L. tarentolae* transfectados con la construcción pLEXSY-Ible3(D5) utilizando el Ac anti-His6X (Invitrogen) (rojo). Los núcleos y kinetoplastos se tiñeron con DAPI (azul). Barras: 10 μ m.

Una vez confirmada la expresión del D5 en los cultivos de *L. tarentolae*, el siguiente paso consistió en verificar, mediante IFI, si efectivamente el Ac 6B6 reconocía al D5 cuando éste era expresado en un organismo eucariota. Tal como se muestra en la **Figura 49** sólo hubo reacción positiva cuando el Ac chim m6B6 se enfrentó a epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c), concluyendo que el D5 no sería el epítipo de dicho Ac.

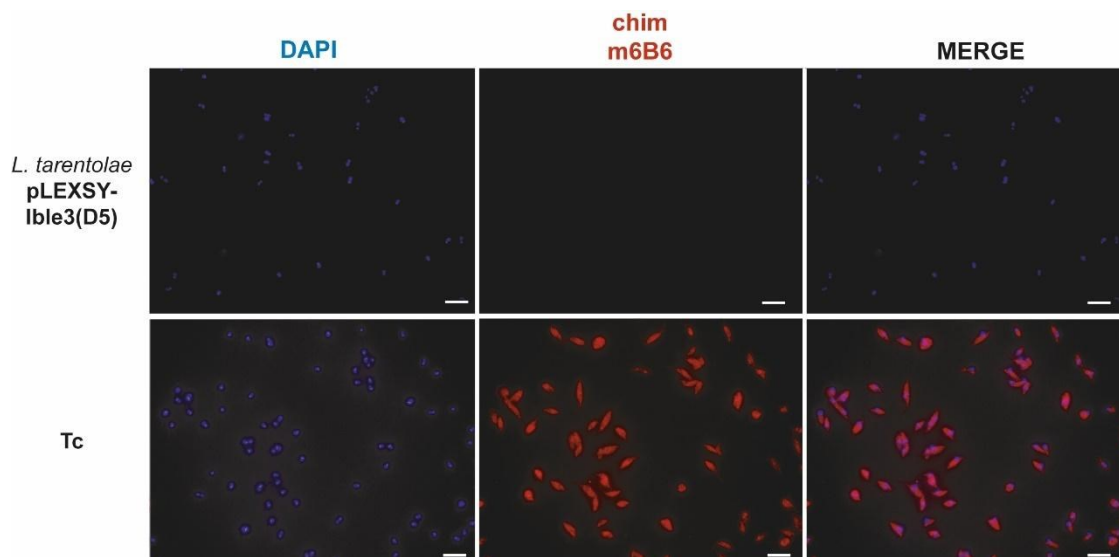


Figura 49. Inmunofluorescencia indirecta de parásitos recombinantes de *L. tarentolae* (*L. tarentolae* pLEXY-Ible3(D5) y epimastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28c (Tc). Se utilizó el Ac anti-His6X (Invitrogen) (rojo). Los núcleos y kinetoplastos se tiñeron con DAPI (azul). Barras: 10 μ m.

En última instancia se evaluó si, el dominio 5 de manera individual, presentaba regiones capaces de ser reconocidas por el Ac 6B6 utilizando un enfoque *in silico* a través del servidor HADDOCK v2.2. Tal como se observa en la Tabla 11, el único *clúster* predicho mostró valores positivos de HADDOCK y Z-score. Este resultado permitió concluir que no existe interacción entre ambos, sugiriendo que se requeriría a Tc323 completa para una unión adecuada con el Ac 6B6 con el dominio D5.

Parámetros	Valor
Puntaje HADDOCK	45.7 ± 3.3
Tamaño del <i>clúster</i>	1
RMSD	13.4 ± 0.5
Energía de <i>Van der Waals</i>	-21.3 ± 1.3
Energía electrostática	-101.0 ± 3.0
Energía de desolvatación	-4.2 ± 1.5
Energía de violación de restricciones	0.0 ± 0.0
<i>Buried surface area</i>	713.6 ± 10.5
<i>Z-score</i>	1

Tabla 11. Análisis de acoplamiento molecular entre el Ac scFv 6B6 y D5. Puntuaciones obtenidas en la simulación de la interacción entre Tc323 y el dominio 5 mediante el programa HADDOCK.

7. Discusión

La caracterización de proteínas de patógenos de importancia médica, como *T. cruzi*, es relevante porque proporciona información sobre diferentes aspectos biológicos del parásito, y permite evaluar sus propiedades para definirlos como blancos estratégicos de intervención diagnóstica y terapéutica (Lobo *et al.*, 2018). Con base en este razonamiento, uno de los objetivos principales de este trabajo de Tesis Doctoral fue la caracterización molecular y utilidad diagnóstica de una proteína hipotética de *T. cruzi*, a la cual se denominó Tc323 en referencia a su peso molecular. Esta proteína constituye el Ag diana del Ac scFv 6B6, el cual se obtuvo utilizando bibliotecas de fagos presentadores de fragmentos de las regiones variables de Acs (scFv), construidas a partir del ADNc de células B de pacientes con EChc (Niborski *et al.*, 2021)

En una primera etapa de investigación, mediante la utilización de un enfoque de IP seguido de MS, se logró identificar a Tc323 como la proteína diana del Ac 6B6. Los ensayos de WB demostraron que esta proteína se encuentra con mayor abundancia en la etapa de epimastigote en comparación con las otras dos formas de desarrollo de *T. cruzi* presentes en los mamíferos. Considerando el complejo ciclo de vida de este parásito, es esperable que, en el curso de su diferenciación, cada estadio exprese un patrón de proteínas específicas de fase, responsables de sus características morfológicas, bioquímicas y biológicas, que pudieran tener un rol importante en la capacidad infecciosa, virulencia y en su supervivencia (Telleria *et al.*, 2023). En ese sentido, Díaz *et al.*, (2011) utilizando ensayos de electroforesis en gel bidimensional (2D) acoplada con MS, determinaron que ciertas proteínas de *T. cruzi*, relacionadas principalmente con metabolismo glucolítico y ensamble del citoesqueleto, presentaban una expresión diferencial entre los estadios de mamíferos. Además de lo mencionado anteriormente, también se observaron niveles de Tc323 variables entre los diferentes linajes estudiados (TcI, TcII, TcV y TcVI), tal como se ha demostrado en otros trabajos de asociación entre la expresión proteómica y las diferentes UDTs (Telleria *et al.*, 2010).

Como aproximación para dilucidar los aspectos funcionales de Tc323, se determinó su ubicación subcelular en los tres estadios de vida principales de *T. cruzi*, la cual influye en la función de las proteínas al tiempo que determina su microambiente y las asociaciones con otras moléculas (Scott *et al.*, 2005). En este sentido, se pudo establecer que Tc323 es una proteína que se localiza en el espacio intracelular del parásito, exhibiendo un patrón asociado y unido a la membrana. En línea con este hallazgo, los estudios proteómicos identificaron péptidos de Tc323 en vesículas intracelulares de *T. cruzi*, como los reservosomas o la vacuola contráctil (Sant'Anna *et al.*, 2009; Ulrich *et al.*, 2011). La presencia de una secuencia consenso para un péptido señal en el extremo N-terminal, su patrón de localización y la identificación de esta proteína en el secretoma de *T. cruzi* (Brossas *et al.*, 2017), han permitido plantear la hipótesis de que Tc323 podría transportarse a través de la vía secretora del parásito, promoviendo una respuesta humoral durante la infección. A pesar de que un estudio anterior identificó péptidos de Tc323 en la plasmalema de epimastigotes, prediciendo una localización extracelular (Queiroz *et al.*, 2013), durante este trabajo no se observó señal de Tc323 en la superficie de los parásitos no permeabilizados mediante microscopia. Esta discrepancia podría ser el resultado de limitaciones intrínsecas y/o diferente sensibilidad metodológica de estas herramientas de investigación que requieren estudios adicionales.

Por otro lado, el análisis filogenético demostró que Tc323 carece de homólogos en otros eucariotas fuera de los kinetoplastidos. La presencia de homólogos de esta proteína sólo se restringe a cinco especies de tripanosomas de clados estercorarios, así como a *T. rangeli* y *P. confusum* de ramificación temprana. A la luz de estos resultados, se puede inferir que los homólogos de Tc323 son prescindibles para la mayoría de los tripanosomátidos, pero no para *T. cruzi* y unas pocas especies estrechamente relacionadas, no patógenas. Esta observación plantea la pregunta sobre qué característica común a *T. cruzi*, *T. grayi*, *T. rangeli* y *T. conorhini* podría explicar una ventaja funcional de Tc323 y sus secuencias homólogas. Aunque estos organismos están filogenéticamente relacionados, *T. rangeli*, una especie digenética no patógena con capacidad para infectar diversos mamíferos, tiene un ciclo de vida que incluye la invasión de las glándulas salivales del insecto vector y se transmite a través de la saliva (Dario *et al.*, 2021), mientras que *T. conorhini*, *T. grayi*, *T. theileri* y

T. cruzi colonizan exclusivamente el sistema intestinal de los vectores y son transmitidos por las heces (Kelly *et al.*, 2017; Bradwell *et al.*, 2018). Además, *T. grayi*, a diferencia de los otros tripanosomas que infectan mamíferos, tiene como hospedador vertebrado a los cocodrilos (Kelly *et al.*, 2014). En estas observaciones, no es evidente una ventaja evolutiva común a Tc323 y sus homólogos y, son necesarios análisis que ayuden a determinar cuál es el rol de esta proteína en el ciclo de vida de estos parásitos y en la biología de *T. cruzi* en particular.

La ausencia de Tc323 en otros protozoarios de importancia sanitaria como *T. brucei* y *Leishmania spp.* respaldada por evidencia experimental, junto con el elevado porcentaje de identidad de secuencia entre los distintos linajes de *T. cruzi*, permitieron posicionar a esta proteína como un candidato prometedor para el diagnóstico de la EChc. Para este fin, y luego de intentos fallidos de clonado del gen completo (~9000 pb), se procedió a identificar dominios estructurales de Tc323 a través del servidor RaptorX que predijo seis dominios estructurales (denominados D1 a D6) que abarcan en su totalidad a Tc323 con buena calidad de predicción. En consecuencia, se procedió a clonar y expresar cada dominio de forma individual, a excepción del D2 debido a la longitud del fragmento. No obstante, sólo se logró expresar de manera exitosa los dominios D3 y D6. Para los dominios restantes, a pesar de la implementación de variadas condiciones de inducción y temperatura, del uso optimizado de codones y de una cepa de *E. coli* deficiente en la expresión de endonucleasas, no se logró obtener cantidades de proteína que pudieran ser detectadas con la tinción de *Coomassie Blue*. Sólo fue posible visualizar una mínima expresión de estos dominios (visualización atribuible a “fugas” de expresión) por WB, pero donde no se logró distinguir diferencias entre cultivos inducidos y sin inducir. Este hecho podría explicarse como consecuencia de la toxicidad de D1, D4 y D5, en donde la sobreexpresión de estas regiones podría ser perjudicial para la proliferación de las bacterias (Doherty, Connolly y Worrall, 1993; Dong, Nilsson y Kurland, 1995). Contrariamente, una sobreexpresión heteróloga de los dominios D3 y D6 no supondría un impacto negativo durante el crecimiento de las células huésped (Pouresmaeil y Azizi-Dargahlou, 2023), lo que explica los altos niveles de expresión luego del agregado del inductor. En paralelo, se realizó un análisis *in silico* para identificar los dominios más inmunogénicos de Tc323. Actualmente, existen

numerosos métodos y herramientas para predecir epítomos lineales de células B (Greenbaum *et al.*, 2007; Sanchez-Trincado *et al.*, 2017). Sin embargo, dado que los análisis individuales demuestran limitaciones debido a su falta de precisión y predicciones deficientes (Sanchez-Trincado *et al.*, 2017; Galanis *et al.*, 2019, 2021), se optó por un enfoque multiparamétrico que combinara diferentes algoritmos disponibles en IEDB, para obtener resultados más precisos. De esta manera, se predijo en Tc323 diferentes propiedades: accesibilidad a la superficie, antigenicidad, giro beta, flexibilidad e hidrofiliidad. Como resultado, se identificaron regiones altamente inmunogénicas de Tc323 en las posiciones de aminoácidos 1369-1447 y 2635-2983, que corresponden a los dominios D3 y D6, respectivamente. Esto llevó a la producción recombinante de estos dominios en un sistema procariota. En ambos casos, se obtuvieron rendimientos proteicos elevados, con valores mayores a 1,5 mg/mL. En el caso de rTcD6 se observó una banda indicativa de la proteína (55 kDa) y otra de baja intensidad con un peso molecular aproximado de 150 kDa, que podría corresponder a la trimerización de la proteína en las etapas previas de expresión, purificación o almacenamiento. Sin embargo, esta agregación podría ser beneficiosa en términos de sensibilidad y especificidad de un ensayo diagnóstico, potenciando la unión Ag-Ac como ya sido demostrado (Khan *et al.*, 2022), pudiendo capturar una mayor cantidad de Acs de cada muestra.

La validación inicial para determinar la capacidad de estos antígenos en ser reconocidas específicamente por los anticuerpos anti-*T. cruzi* desarrollados en pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* se llevó a cabo mediante el ensayo de WB. Esto fue motivado por el hecho de que esta técnica permite identificar la interacción de Acs específicos contra el Ag de interés a través de la visualización de una banda determinada (Riera *et al.*, 2012; Cervantes-Landín *et al.*, 2014). En lo respectivo a la condición del ensayo, la literatura científica demuestra una amplia variabilidad en cuanto a la cantidad de Ag empleado (0,2 µg y 500 µg por calle), así como en las diluciones de las muestras de suero y el conjugado (1/200 a 1/4000) (Umezawa *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 2014; Espinoza, Martínez y Schabib-Hany, 2019). En el caso de la dilución del suero o plasma, la mayoría de las investigaciones que evaluaron el uso de WB para el diagnóstico de la EChc utilizaron diluciones séricas oscilando entre 1/50 y 1/200 (Gruber and Zingales, 1993; Umezawa *et al.*,

1996; Frade *et al.*, 2011; Bautista-López *et al.*, 2017; Tavares Daltro *et al.*, 2019). Bajo estas condiciones, se lograron resultados satisfactorios que demostraron la alta capacidad discriminadora de los dos Ags para diferenciar entre muestras positivas y negativas para *T. cruzi*. Es importante aclarar que durante esta validación diagnóstica inicial se utilizaron *pooles* de plasmas conformados por pacientes con las diferentes manifestaciones clínicas de la EChc, así como también sujetos no infectados dado que este enfoque aumenta la eficacia analítica, reduciendo costos e incrementando la sensibilidad (Baruch *et al.*, 2020). En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio establecieron una base sólida para avanzar con la validación diagnóstica de estas proteínas, iniciándose así la Fase I del estudio.

Previo a evaluar la capacidad de estas moléculas para diferenciar entre muestras positivas y negativas para la EChc, se realizó una estandarización de los componentes del ELISA indirecto tanto para la Fase I como para la Fase II mediante una matriz de decisión (titulación en tablero de ajedrez o *checkboard titration*). Las mejores condiciones determinadas en el proceso de optimización para rTcD3 y rTcD6 fueron considerablemente menor en comparación con otras investigaciones similares; estudios previos que emplearon proteínas recombinantes o quiméricas utilizaron concentraciones por pocillo que variaron entre 100 ng y 2.5 µg (Meira *et al.*, 2002; Telles *et al.*, 2003; Umezawa *et al.*, 2003; Camussone *et al.*, 2009; Peverengo *et al.*, 2018; Ruiz-Márvez *et al.*, 2020). Esto supone una cantidad de 10 a 250 veces mayor que lo establecido para el ensayo rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA. Asimismo, la mayoría de las pruebas (Briceño *et al.*, 2010; Berrizbeitia *et al.*, 2012; Mucci *et al.*, 2017; Peverengo *et al.*, 2018; Caballero E. *et al.*, 2019) utilizan agentes bloqueantes como SFB, BSA o leche descremada que presentan algunas desventajas, como variación entre lotes (Gibbs, 2001), enlaces no específicos con proteínas animales (Xiao y Isaacs, 2012) o rápido deterioro (Wild, 2013). La solución utilizada en los ensayos rTcD3/rTcD6 IgG-ELISA es un agente no peptídico denominado WellChampion™ que bloquea, estabiliza y preserva la fase sólida en un sólo paso, reduciendo el tiempo de sensibilización, la cantidad de residuos y los costos de producción. Al no ser un producto animal/celular, no sufre variaciones entre lotes, tiene una larga estabilidad, además de simplificar y acelerar el proceso de sensibilización de la placa. Este agente ya se ha utilizado con éxito en estudios

previos (Peng *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2016a). Una ventaja adicional de este reactivo es que elimina la necesidad de emplear otros agentes bloqueantes de unión no específica en las diluciones de muestra, el Ac secundario o en el tampón de sensibilización. Además, el tiempo requerido para la sensibilización con antígenos rTcD3 y rTcD6 fue de 15 min a TA, significativamente más corto que los reportados en la literatura que refieren mayoritariamente a 18 h a 4°C (De Marchi *et al.*, 2011; Mucci *et al.*, 2017; Floridia-Yapur *et al.*, 2019; Serrano *et al.*, 2024).

Tal como se mencionó en Introducción, un estudio de Fase I permite evaluar anticipadamente la capacidad de la nueva prueba para clasificar adecuadamente a los individuos en relación con una condición específica, teniendo en cuenta los límites de la metodología elegida. En este caso, se realizó un ensayo inicial utilizando 333 muestras plasmáticas positivas y 141 negativas para la EChc, previamente clasificadas según las normativas de la OMS (World Health Organization (WHO), 2017). Los valores de AUC encontrados para los antígenos rTcD3 y rTcD6 demostraron ser más elevados que los encontrados cuando se utilizó extracto total de *T. cruzi*, así como algunas proteínas recombinantes individuales u otras proteínas quiméricas recombinantes comúnmente utilizadas en los ensayos diagnósticos (Santamaría *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2014; Floridia-Yapur *et al.*, 2019; Alonso-Padilla *et al.*, 2021). Durante la Fase I del estudio se observaron valores de sensibilidad que oscilaron entre el 92,20% y el 93,61% para rTcD3 y rTcD6, respectivamente. Respecto a la especificidad, los valores fueron 91,60% para rTcD3 y 92,70% para rTcD6. Estos valores demuestran la elevada capacidad discriminatoria de ambos antígenos en la detección de Acs específicos contra *T. cruzi*. No obstante, nuestros resultados son aún más relevantes si se comparan con los valores obtenidos en literatura. Por ejemplo, Padilla JA *et al.*, (2021) reportó valores de sensibilidad de 49%, 84% y 90% para los Acs HSP70, 3973 y F29, respectivamente, mientras que los valores de especificidad fueron de 83,00%, 93,00% y 27,00% para las mismas proteínas. En la misma línea, un estudio liderado por Majeau *et al.*, (2024), utilizando una mezcla de péptidos derivados de proteínas altamente conservadas en *T. cruzi*, informó valores que no superaron el 73,00% para sensibilidad y 90,00% para la especificidad. Estos datos junto con otros estudios que reportaron valores similares (Krautz *et al.*, 1998; Umezawa y Franco Da Silveira,

1999; Mendes *et al.*, 2014), demostraron que rTcD3 y rTcD6 presentan mayor capacidad en discriminar individuos seropositivos de aquellos seronegativos.

Es ampliamente reconocido que *T. cruzi* exhibe una sustancial heterogeneidad genética y fenotípica (Brenière *et al.*, 2016) que se correlaciona con patrones geográficos específicos en América Latina e influye significativamente en la presentación clínica de la enfermedad y en el diagnóstico (Verani *et al.*, 2009; Brenière *et al.*, 2016; Zingales, 2017). Esto implica que el rendimiento de las pruebas serológicas puede variar en regiones donde las cepas circulantes difieren de las utilizadas para preparar los Acs homogeneizados o recombinantes (Duthie *et al.*, 2016; Truyens *et al.*, 2021). Además, los antecedentes genéticos del huésped también influyen en la reactividad de las pruebas debido a las variaciones en las respuestas de Acs entre países. Llama la atención que cada vez más informes documentan un elevado número de falsos negativos al cribar muestras procedentes de México y Centroamérica mediante ELISA convencional o pruebas de diagnóstico rápido (Caballero *et al.*, 2007; Verani *et al.*, 2009; Whitman *et al.*, 2019; Kelly *et al.*, 2021; Truyens *et al.*, 2021). Teniendo esto en consideración, se analizó la capacidad diagnóstica de los antígenos rTcD3 y rTcD6, utilizando un panel conformado por muestras de plasma de pacientes residentes en siete países endémicos de América Latina: Argentina, Bolivia, Colombia, México, Paraguay, El Salvador y Estados Unidos, donde prevalecen diferentes UDTs (Velásquez-Ortiz *et al.*, 2022). Así, las muestras estratificadas según el país de origen mostraron significación estadística en el índice de reactividad y los parámetros de sensibilidad, utilizando rTcD3-ELISA. Las muestras de México y El Salvador mostraron menor reactividad en comparación con los casos de infección por *T. cruzi* de Argentina y Bolivia. Para rTcD6, todas las muestras presentaron un comportamiento similar, independientemente de su origen. Estos resultados sugieren que, si bien la diversidad parasitaria está asociada con diferencias en los perfiles de Acs (Ricci *et al.*, 2023), podría no ser la causa principal de las variaciones en el rendimiento observadas para rTcD3. Por otro lado, la diferencia observada entre ambos antígenos podría atribuirse al hecho de que rTcD6 proporciona un repertorio más amplio de epítopes debido a una mayor longitud de secuencia en comparación con rTcD3, lo que a su vez mejora la inmunogenicidad de las proteínas. Cabe destacar que la proteína de la cual derivan

estos antígenos, Tc323, se encuentra altamente conservada entre las diferentes UDTs secuenciadas por lo que las probabilidades de que las diferencias encontradas entre dichos países se deban por las variaciones genéticas de este protozoo son bajas. Además, el número de muestras ensayadas provenientes de El Salvador y EE. UU. son escasas. Por lo tanto, las siguientes etapas de investigación se enfocarán en ampliar el número de individuos provenientes de los países ya ensayados y la incorporación de otras regiones donde *T. cruzi* es endémico. Esto se realizará con el propósito de confirmar que rTcD3 y rTcD6 mantienen su desempeño diagnóstico en todas las zonas geográficas donde la ECh es prevalente.

Por otro lado, aún falta identificar un marcador biológico en la EChc que pueda evaluar eficazmente la progresión desde la forma sin síntomas hacia la sintomática. Dado el vínculo entre la patología de la EChc y la respuesta inmune, algunas investigaciones se han centrado en estudiar Acs específicos contra proteínas del parásito en donde una reducción o aumento de sus niveles sea indicativo de progresión (Negrette *et al.*, 2008; Zrein *et al.*, 2018), aunque estos informes en la literatura son escasos. En base a esto, se determinó la eficacia de rTcD3 y rTcD6 para detectar Acs anti-*T. cruzi* en las diferentes presentaciones clínicas de la EChc. En particular, la respuesta inmune humoral generada por pacientes con diferentes formas clínicas de la EChc, calculada en términos de IR, no mostró niveles de reactividad significativamente distintos entre las cohortes ensayadas. Esto supone que ambas proteínas son seguramente reconocidas por todos los sujetos con EChc, lo que realza su potencial diagnóstico. Estos resultados difieren del realizado por Longhi *et al.*, (2012) en el que se evaluó a la proteína recombinante JL7 por su capacidad diagnóstica y se determinó que era capaz de discriminar entre las distintas formas clínicas de la enfermedad. No obstante, resulta importante resaltar que tanto en el estudio anterior como en este trabajo de Tesis se analizó el perfil de IgG total. Esto cobra especial importancia, ya que, por ejemplo, un estudio llevado a cabo por Verçosa *et al.*, (2007) en el que evaluó el perfil de las subclases de IgG contra los Ags citoplasmáticos (CRA) y flagelar (FRA) específicos de *T. cruzi* encontró que sólo el isotipo IgG2 permitió diferenciar entre individuos con EChc asintomáticos de aquellos con cardiopatía. Por lo tanto, se ha demostrado que el perfil de IgG de individuos crónicamente infectados puede contribuir a la

patogénesis de la enfermedad (Cerban *et al.*, 1993; Georg *et al.*, 2017; Serrano *et al.*, 2024), aunque se desconoce cuáles isotipos de IgG están involucrados en la respuesta inmune generada en pacientes con EChc ante la presencia de rTcD3 y rTcD6.

En resumen, las dos moléculas demostraron eficacia y seguridad en la discriminación entre muestras seropositivas y seronegativas de EChc por lo que progresaron a la Fase II del estudio. El panel aquí utilizado incluyó 942 muestras, 406 positivas y 536 negativas para *T. cruzi* provenientes de distintas áreas endémicas de Brasil que superó el número de muestras estimado, incluso considerando un margen de seguridad del 10% como medida de precaución. El valor de sensibilidad más alto fue para rTcD6 con un valor de 81,84% mientras que para rTcD3 fue ligeramente menor, con un valor de 79,51%, sin diferencias significativamente estadísticas entre ellos. Puesto que el estudio de Fase II se realizó sólo con muestras procedentes de Brasil, esto puede haber interferido con la sensibilidad de las pruebas (Verani *et al.*, 2009; Truyens *et al.*, 2021). En cuanto a la especificidad, se encontró que no hubo diferencia significativa entre las dos moléculas, con resultados superiores al 97,92%. Otros estudios han evaluado el rendimiento diagnóstico de proteínas recombinantes para el diagnóstico de EChc con valores superiores o equivalentes a estos hallazgos: TcF, TcF26 y TcF43 (Sensibilidad: 25,00–92,5%; Especificidad: 88,90–99%) (Duthie *et al.*, 2016), CP2 (Sensibilidad: 98,6; Especificidad: 99,40%) (Camussone *et al.*, 2009), GST-TSSA VI (Sensibilidad: 86,90%; Especificidad: 98,00%) (De Marchi *et al.*, 2011); rCRP (Sensibilidad: 98,46%; Especificidad: 92,00%) (Meira *et al.*, 2002), FP3, FP6, FP10, y TcF (Sensibilidad: 99,54–100%; Especificidad: 95,21–99,92%) (Abrás *et al.*, 2016), IBPM 8.1, IBPM 8.2 IBPM 8.3 y IBPM 8.4 (Sensibilidad: 95,40–99,60%; Especificidad: 90,00–99,60%) (Santos F. *et al.*, 2016). Sin embargo, estos estudios fueron llevados a cabo con un número reducido de muestras, lo que favorece un alto rendimiento, ya que incluyen pocos perfiles inmunológicos.

Los resultados obtenidos resaltan la calidad de estos Ags para ser usados en el campo del diagnóstico de la EChc. Hasta el momento, y en estas condiciones ensayadas, no se obtuvieron parámetros de sensibilidad y especificidad que permita considerar a esta prueba como ensayo de referencia. En ese sentido, una alternativa

para potenciar la sensibilidad de estas moléculas sería la creación de una quimera que fusione ambos Ags, otra alternativa consistiría en evaluar la antigenicidad de estas moléculas luego de su expresión en un sistema eucariótico capaces de proporcionar las modificaciones postraduccionales necesarias que podrían ser importantes para mejorar la interacción Ag-Ac (Cloos y Christgau, n.d.; Doyle y Mamula, 2001). Ambas aproximaciones serán el foco principal de los próximos esfuerzos de investigación de nuestro grupo.

Por otra parte, la utilización de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos para confirmar la infección crónica por *T. cruzi* ha demostrado mejorar significativamente la precisión de las pruebas diagnósticas al reducir la probabilidad de reactividad cruzada con otras enfermedades infecciosas (López-Monteon et al., 2019). No obstante, a pesar de la mayor especificidad que ofrecen los Ags recombinantes, los informes de reactividad cruzada han persistido (Abras et al., 2016; Caballero E. et al., 2019; García-Bermejo et al., 2023; Santos et al., 2023; Serrano et al., 2024), principalmente a causa de la infección por otros protozoarios filogenéticamente relacionados a *T. cruzi* como diversas especies de *Leishmania* y *T. rangeli*. Teniendo esto en consideración, se empleó un panel serológico compuesto por 749 plasmas de individuos positivos para otras patologías no relacionadas a la EChc para evaluar reacciones cruzadas contra rTcD3 y rTcD6. Puesto que *T. cruzi* y *Leishmania spp.* tienen una filogenia común muy cercana y comparten cantidades significativas de características antigénicas (Gomes, Lorena y Luquetti, 2009), las muestras positivas a leishmaniasis representaron el grupo más importante para comprobar reacciones cruzadas. Es importante destacar que el número de muestras fue mayor que los utilizados en literatura, como se puede comprobar en los trabajos de Gadelha *et al.* (2003) (n = 32), Camussone *et al.* (2009) (n = 15), Saba *et al.* (2013) (n = 464) y Abras *et al.*, (2016) (n = 71). El número total de muestras que reaccionaron con los Ags derivados de Tc323 fue menor al 1% y no resultaron ser coincidentes para los dos antígenos, a excepción de una muestra positiva para leptospirosis. Excepto por el grupo de muestras positivas para toxoplasmosis analizadas para el Ag rTcD6, que mostró un IR de 0,71, todos los demás grupos exhibieron valores inferiores a 0,61, lo que es consistente con los valores encontrados en las muestras negativas analizadas durante el estudio de Fase II. Los resultados indicaron que los

dos Ags pueden usarse con seguridad en regiones donde coexisten diversas enfermedades causadas por bacterias, virus y parásitos.

Finalmente, a pesar de que las regiones D3 y D6 fueron predichas y validadas como las más inmunogénicas de Tc323, los ensayos demostraron que ninguna de las dos contiene el epítipo reconocido por el Ac scFv 6B6. En ese sentido, se realizó una modelación *in silico* de acoplamiento molecular que predijo otra región de Tc323, denominada D5, como posible sitio de unión a este Ac. No obstante, cuando D5 fue expresada bajo un sistema procariota, no se obtuvieron señal de reconocimiento por ninguna de las técnicas empleadas: ELISA y WB. Por lo tanto, dado que trabajos anteriores llevados a cabo por nuestro laboratorio han demostrado que el Ac humano scFv A2R1 se unía a su proteína objetivo, la tubulina, sólo cuando contenía alguna modificación postraducciona específica de eucariotas (Niborski *et al.*, 2021), esto impulsó la expresión del fragmento D5 en protozoo no patógeno *L. tarentolae*. Sin embargo, tampoco se observó señal de reconocimiento por parte del scFv 6B6. Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluó si la secuencia aminoacídica aislada del D5 interaccionaba efectivamente con el Ac scFv 6B6 por predicciones *in silico*, aunque los resultados fueron negativos. Estos resultados sugieren que scFv 6B6 se une a un epítipo conformacional presente en la proteína Tc323 completa.

8. Perspectivas

Dada la comprobada utilidad diagnóstica de los antígenos derivados de Tc323, este proyecto se extenderá generando una construcción quimérica que integre a ambos dominios y se la ensayará con los plasmas utilizados durante esta Tesis, con el objetivo de aumentar los niveles de sensibilidad de los ensayos de ELISA manteniendo los elevados niveles de especificidad. Asimismo, mediante aproximaciones *in silico*, se determinarán los péptidos más inmunogénicos de TcD3 y TcD6 y se evaluará su rendimiento diagnóstico.

Por otro lado, según los resultados del *ítem* anterior, otro aspecto que será objeto de futuras investigaciones es el desarrollo de una prueba rápida basada en la prueba inmunocromatográfica de flujo lateral incluyendo a los antígenos rTcD3 y rTcD6. Esto podría sustituir la laboriosa serología convencional en zonas de bajos recursos, pudiendo permitir un tratamiento inmediato y favoreciendo una mejor adhesión al mismo.

Paralelamente, se llevará a cabo el estudio de Fase III, que permita determinar el rendimiento diagnóstico de ambos antígenos en, por ejemplo, bancos de sangre.

Seguidamente, se continuará investigando la posibilidad de utilizar los mismos como marcadores o criterio de cura luego del tratamiento con drogas antiparasitarias. Esta iniciativa se impulsa principalmente por la carencia de biomarcadores de uso rutinario en entornos clínicos, lo que subraya la continua necesidad de identificar nuevos marcadores de evaluación postratamiento.

Asimismo, se evaluará la presencia de anticuerpos de tipo IgM en los niños nacidos de madres con EChc, determinando, de esta manera, si ambos antígenos recombinantes son capaces de diagnosticar infecciones congénitas. Esto es especialmente importante dado que el diagnóstico neonatal es un área de vacancia con un fuerte impacto social, en la que este último recae en técnicas operador dependiente como el MH (actualmente considerado *gold standard*).

Finalmente, se llevará a cabo un estudio transversal con el objetivo de determinar si los diferentes isotipos de IgG contra los antígenos rTcD3 y rTcD6

pueden servir como biomarcadores para evaluar la progresión de la ECh entre los distintos grupos clínicos. Además, se extenderá la cohorte para incluir a aquellos individuos con alteraciones gastrointestinales y neurológicas.

9. Resultados: Exploración del N-glicoma plasmático en búsqueda de nuevos marcadores pronósticos de la EChc.

9.1 Población de estudio.

Las muestras de plasma de los pacientes con las diferentes formas clínicas de la EChc (**Tabla 22**) se trataron para obtener los N-glicanos según se describió en la sección 5.35 de Materiales y Métodos.

Características	NI (no infectados con <i>T. cruzi</i> , n = 8)	G0 (pacientes sin manifestaciones clínicas, n = 8)	G1 (pacientes con manifestaciones clínicas, n = 7)
Edad, mediana (rango intercuartílico)	44 (32 – 60)	55,5 (42 – 74)	61 (41 – 74)
Género, F/M	6/2	5/3	4/3
Estadio Kuschnir, 0-1-2-3	NA	8-0-0-0	0-5-1-1
PCR, +/-	NA	8/8	7/7

Tabla 22. Características clínicas y demográficas de los donantes de plasma. La determinación de ADN de *T. cruzi* en las muestras de sangre se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en la sección 5.2 de Materiales y Métodos.

9.2 Análisis del N-glicoma plasmático de individuos con EChc y sujetos no infectados.

El protocolo empleado para estudiar la N-glicosilación en plasma fue establecido de acuerdo con Saldiva *et al.*, (2014). Brevemente, las muestras se someten a de-N-glicosilación enzimática y los glicanos obtenidos se marcan con 2-aminobenzamida (2-AB), lo que permite su detección por fluorescencia en el sistema cromatográfico. Se estudiaron las estructuras sialiladas por separación de intercambio aniónico débil (WAX) (**Figura 50**).

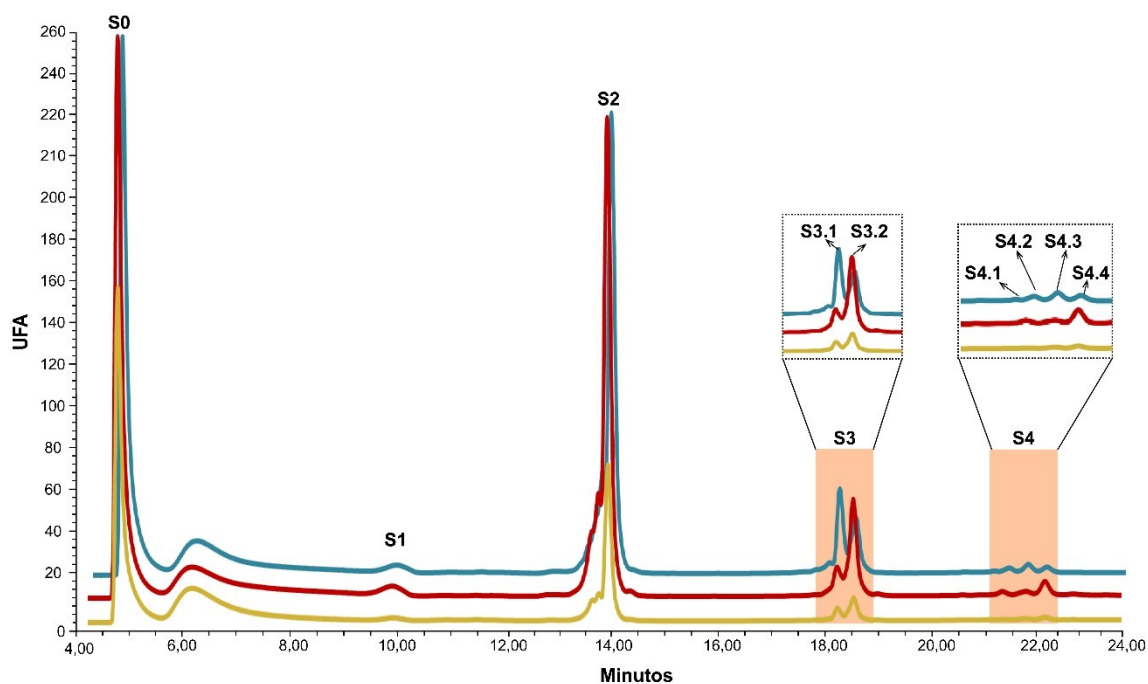


Figura 50. Perfiles cromatográficos ejemplares obtenidos por intercambio aniónico (WAX-HPLC) para los N-glicanos del plasma derivado de pacientes con EChc e individuos no infectados. Los glicanos se dividen según su carga en neutros (S0), monosialilados (S1), disialilados (S2), tri-sialilados (S3) y tetrasialilados (S4). Los recuadros rosas indican los picos con perfiles diferenciales entre los distintos grupos de la cohorte. Los picos individuales que integran los glicanos trisialilados (S3.1 y S3.2) y tetrasialilados (S4.1, S4.2, S4.3 y S4.4) se destacan en una vista detallada en el recuadro. UFA, Unidades de Fluorescencia Arbitrarias.

En el análisis cromatográfico comparativo se observó una diferencia en estructuras tri- y tetrasialiladas. Mientras en los picos correspondientes a estructuras trisialiladas (S3.1, S3.2), las abundancias fueron similares en la cohorte NI (no infectados) y G0 (pacientes de ECh sin manifestaciones clínicas), la cohorte G1 mostró una alteración del perfil en los picos S3 indicando un cambio de abundancia de las estructuras componentes. Sin embargo, el aumento en las áreas de los picos S3.1 y S3.2 en el grupo G1 respecto de los NI y G0 no resultó significativo (**Figura 51**). En tanto, el perfil de tetrasialilados se observó afectado también; la cuantificación de áreas porcentuales relativas (**Figura 51**) confirmó una disminución significativa en la abundancia del pico S4.1 en el grupo G1 respecto de los no infectados. Una tendencia similar se observó para los picos S4.2 y S4.4. Contrariamente, para el pico S4.3 las abundancias entre las cohortes fueron similares.

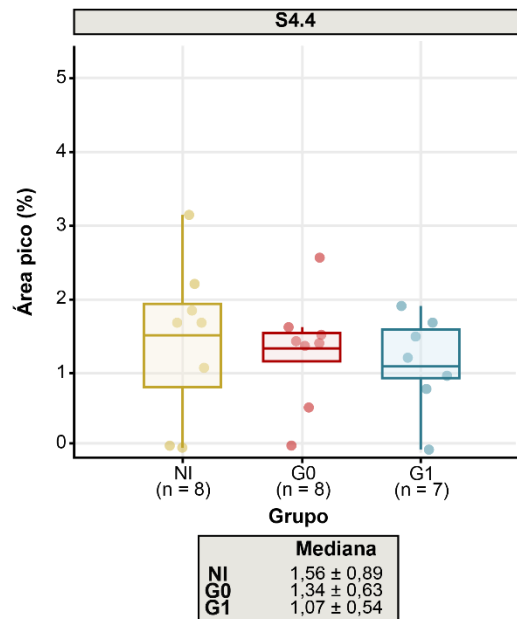
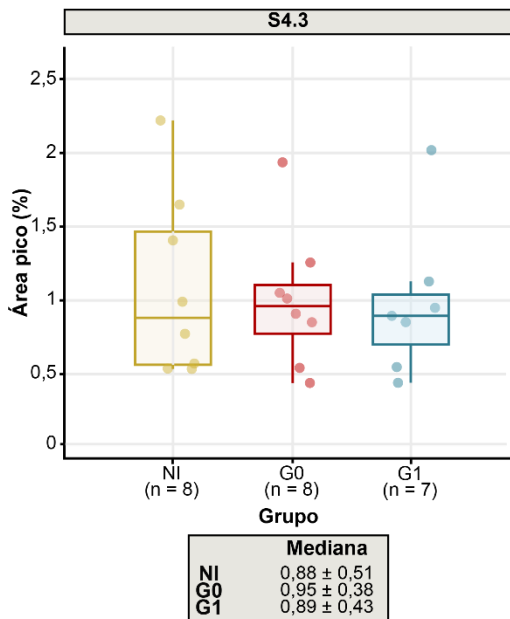
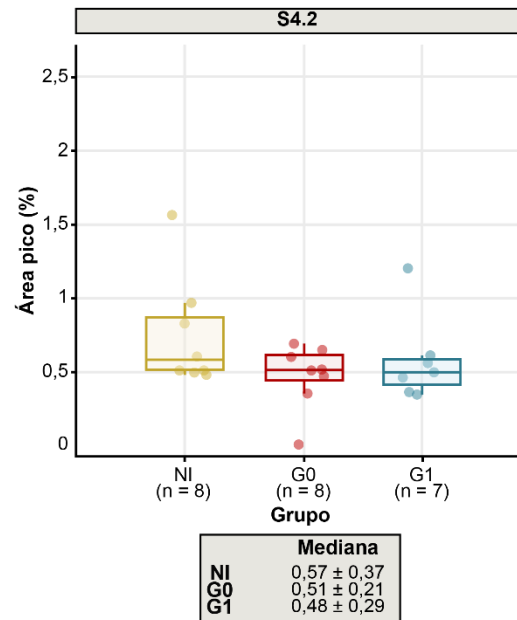
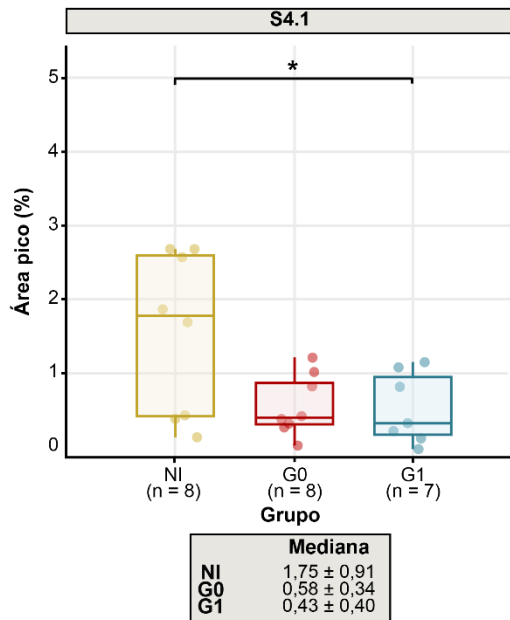
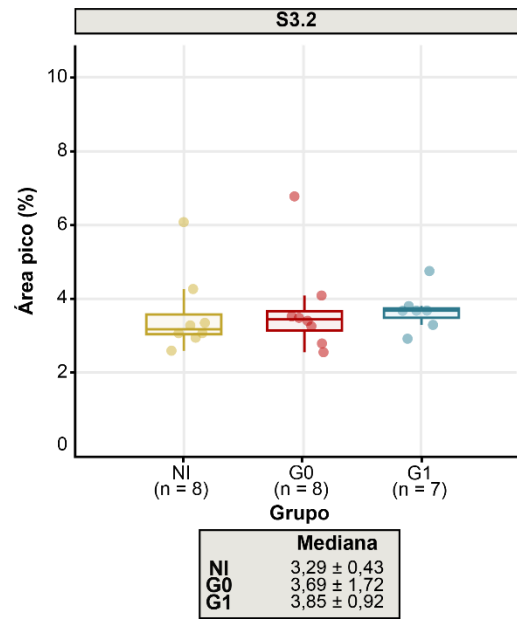
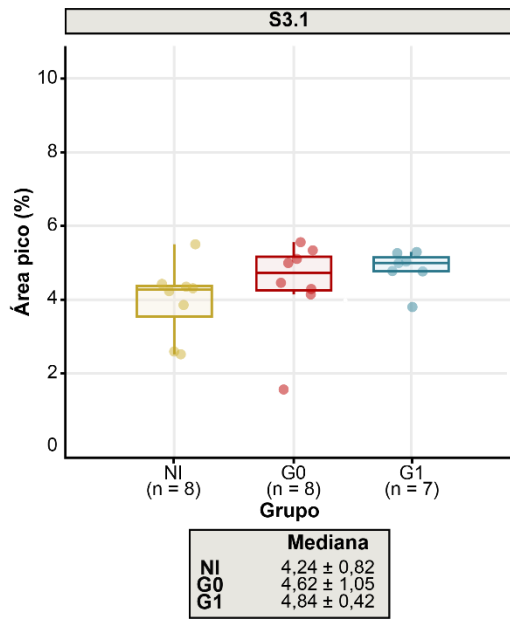


Figura 51. Abundancia porcentual para los picos trisialilados (S3.1 y S3.2) y tetrasialilados (S4.1, S4.2, S4.3 y S4.4) obtenidos por WAX-HPLC. Cada punto corresponde al dato de un individuo. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. Las diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples de Dunn. Las correlaciones significativas se indican con el nivel de significancia (* $p < 0,05$).

En lo correspondiente a las estructuras mono y di-sialiladas, no se observaron diferencias significativas entre las cohortes de individuos (**Figura 52**; las áreas relativas individuales están disponibles en el Apéndice). Las estructuras neutras, por su parte, no pudieron ser cuantificadas por limitaciones de la técnica, ya que los mismos eluyen junto con impurezas de la muestra.

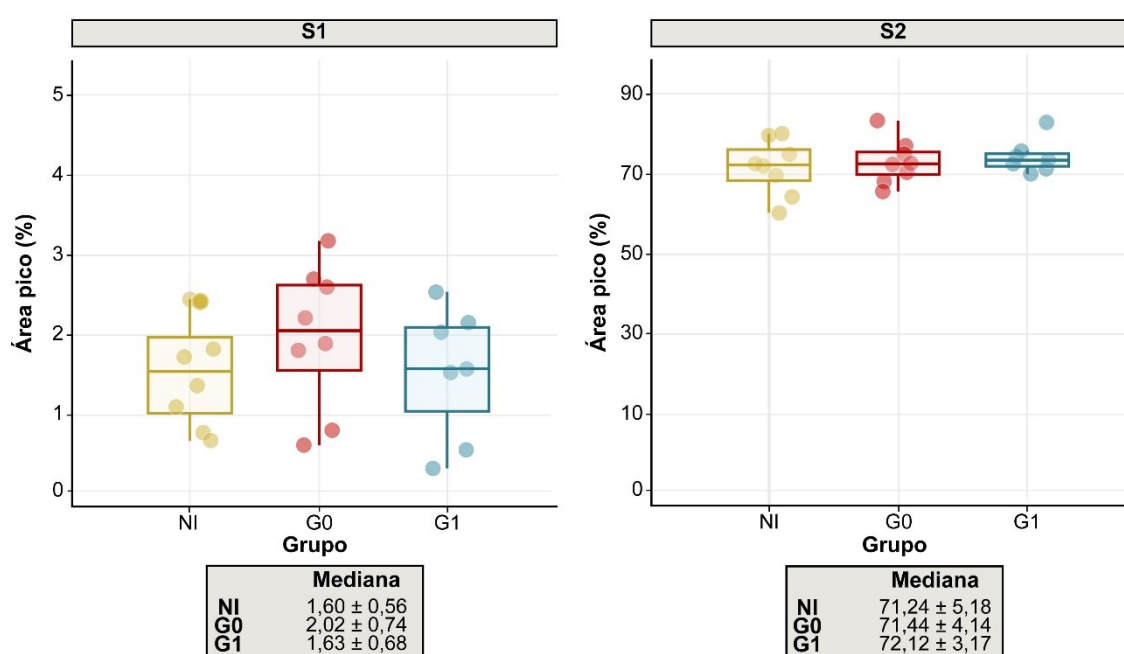


Figura 52. Abundancia porcentual para los picos mono (S1) y disialilados (S2) obtenidos por WAX-HPLC. Cada punto corresponde al dato de un individuo en cada cohorte. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. Las diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples de Dunn.

Seguidamente, y a los efectos de estudiar la distribución de N-glicanos en plasma por un segundo sistema cromatográfico, los N-glicanos extraídos y derivatizados con 2-AB se caracterizaron mediante separación en una columna de interacción hidrofílica (HILIC), lo que permite caracterizar picos de glicanos (*glycan peaks*, GPs, **Figura 53**) (Pavić *et al.*, 2018). A diferencia de WAX, en esta técnica la separación no obedece solamente a carga, sino a tamaño, polaridad y antenaridad, entre otras características. Cada GP se define con un valor continuo por

comparación con unidades de glucosa (UG), resultantes de la utilización de dextrano parcialmente hidrolizado como estándar externo (Saldiva *et al.*, 2014). Así, basándose en la capacidad resolutive de la columna, se caracterizó un perfil de N-glicanos compuesto por 39 GPs (**Figura 53**).

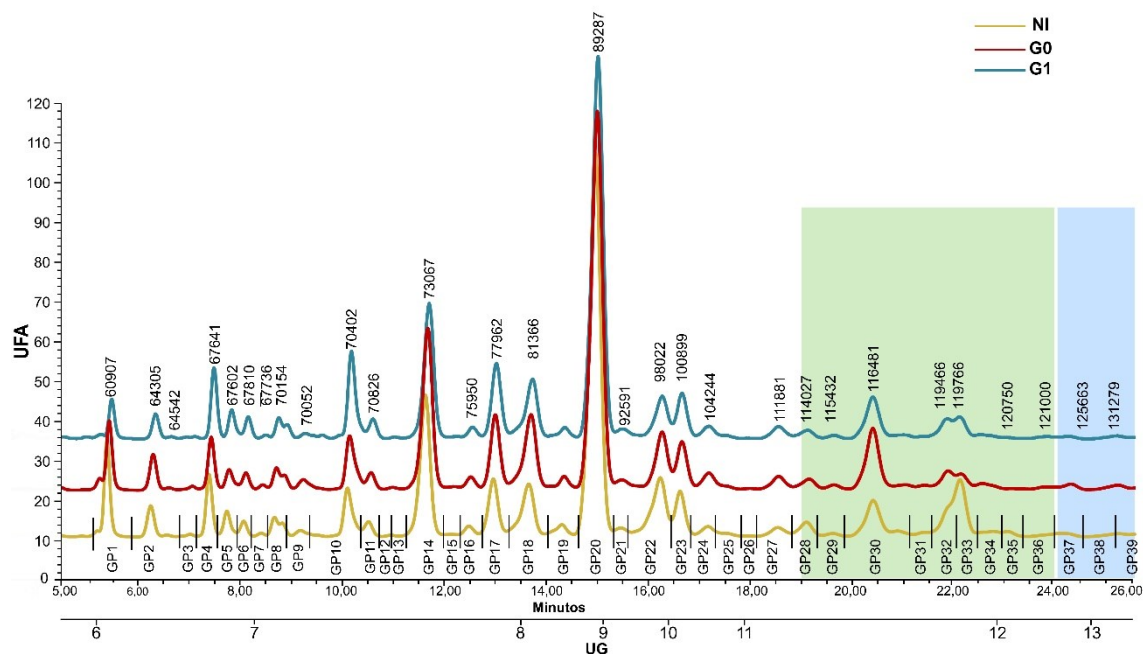


Figura 53. Perfiles cromatográficos ejemplares obtenidos por interacción hidrofílica (HILIC-UPLC) para los N-glicanos del plasma derivado de pacientes con EChc e individuos no infectados. Dada la co-elución de numerosos N-glicanos en cada pico, se definen glycan peaks según su movilidad cromatográfica. Se utiliza dextrán parcialmente hidrolizado como estándar externo, midiendo unidades de glucosa (UG). Los componentes de cada GP fueron identificados por comparación de datos de literatura (Pavić *et al.*, 2018). El recuadro sombreado verde y azul indican los picos correspondientes a estructuras tri- y tetrasialiladas, respectivamente. UFA, Unidades de Fluorescencia Arbitrarias.

Al examinar los perfiles cromatográficos entre distintos grupos que integran la cohorte (**Figura 53**), se observó un perfil acorde al esperado para muestras de plasma, según descrito en literatura, con GPs mayoritarios 14, 17, 18 y 20 correspondientes a las estructuras A2G2S1, FA2BG2S1 y A2G2S2, correspondientemente (Pavić *et al.*, 2018). Notablemente, los picos GP32, GP33 y GP34 presentaron alteración en su área y forma, indicativo de un cambio en la composición y/o abundancia de los N-glicanos componentes entre individuos no infectados y pacientes de EChc con (G1) y sin (G0) manifestaciones clínicas. Los mismos, según descrito en bases de datos, son identificables como estructuras trisialiladas, mayoritariamente A3G3S3, A3F1G3S3, y FA3(B)G3S3 (GP32), A4G4S3,

A3F1G3S3 (GP33) y A4G4S3 (GP34), respectivamente (Saldova *et al.*, 2014; Pavić *et al.*, 2018).

El análisis cuantitativo de las áreas bajo la curva para los picos GP32-34 (**Figura 54**; las áreas relativas individuales están disponibles en el Apéndice) no reveló diferencias significativas en las abundancias entre los grupos ensayados; sin embargo, es relevante señalar que, para el GP32 (componentes A3G3S3, A3F1G3S3, y FA3(B)G3S3), se observó una tendencia a una mayor abundancia de estas estructuras en individuos NI y G0 con respecto al G1. En el caso de GP33 (A4G4S3, A3F1G3S3), la tendencia se mantuvo, con una disminución de las estructuras componentes en pacientes con compromiso cardíaco. Finalmente, el GP34 (A4G4S3) mostró una tendencia opuesta en relación con los dos picos anteriores, evidenciándose una disminución del área para los integrantes del grupo G0 y NI, y un aumento de abundancia de estas estructuras en el grupo G1. Esta compensación de áreas podría explicar la diferencia no significativa observada en los picos trisialilados de WAX, donde por su carga, todas estas estructuras coeluyen (**Figura 51**).

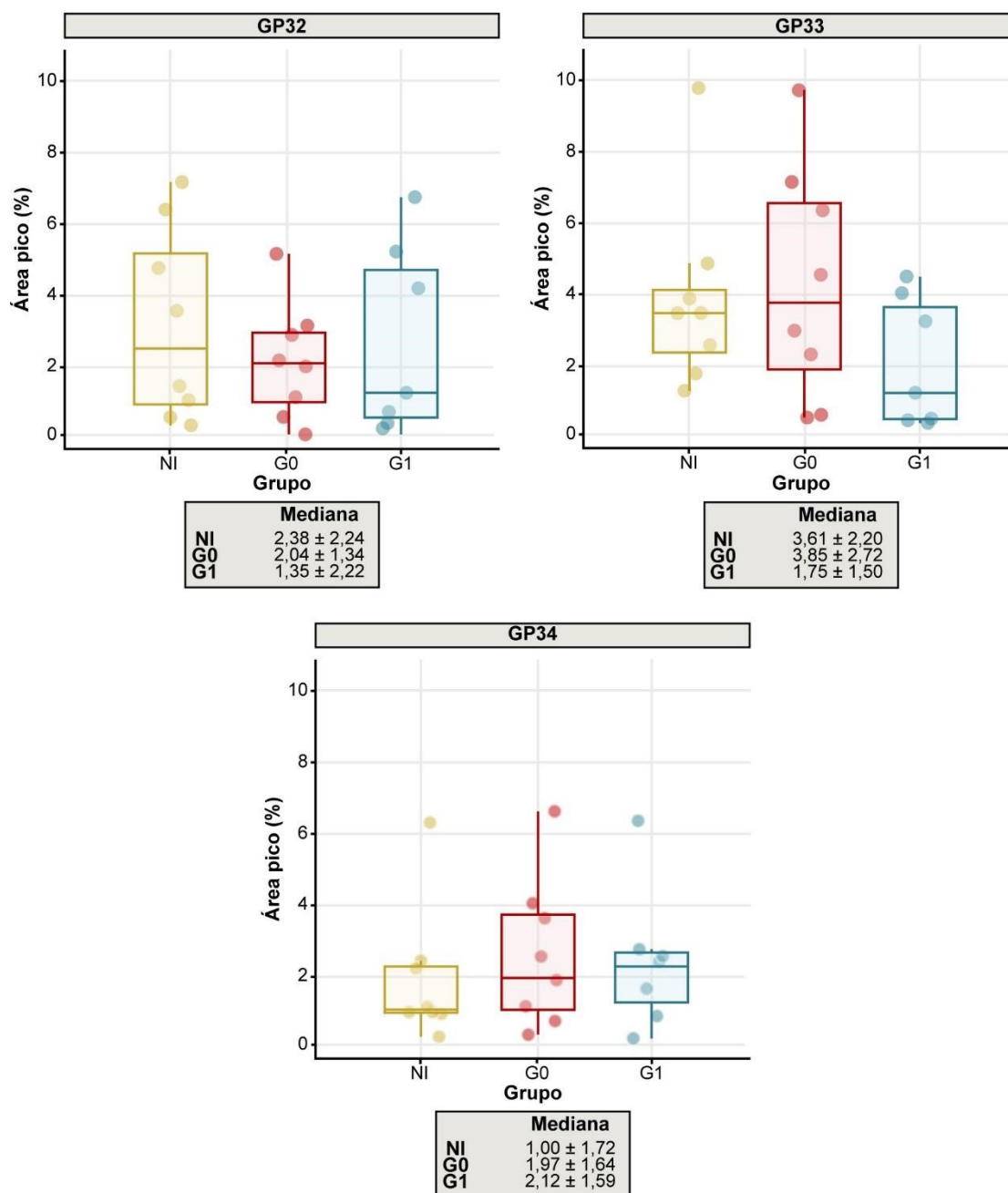


Figura 54. Abundancia porcentual para los picos GP32, GP33 y GP 34 obtenidos por HILIC-UPLC. Cada punto corresponde al dato de un paciente. Las cajas y los bigotes reflejan la mediana y el rango intercuartil. Las diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples de Dunn.

En tanto, y si bien la cromatografía WAX presentaba diferencias significativas en tetrasialilados (**Figura 51**), que en esta metodología corresponden con los GP 37-39 (estructuras A4G4S4, A4F1G4S4 y A4F2G4S4), estas diferencias no pudieron ser validadas por HILIC por limitaciones de la metodología, ya que al ser

estructuras con altos tiempos de retención (y correspondientemente, altos UG) eluyen en picos muy anchos y pequeños con mayor error.

Finalmente, para visualizar mejor las diferencias de las áreas relativas tanto para los GP32, GP33 y GP34 en HILIC, como para las estructuras tri- (S3.1 y S3.2) y tetrasialiladas (S4.1, S4.2, S4.3 y S4.4) en WAX, se llevó a cabo un análisis multivariado empleando un análisis de componentes principales (PCA), como se muestra en la **Figura 55**.

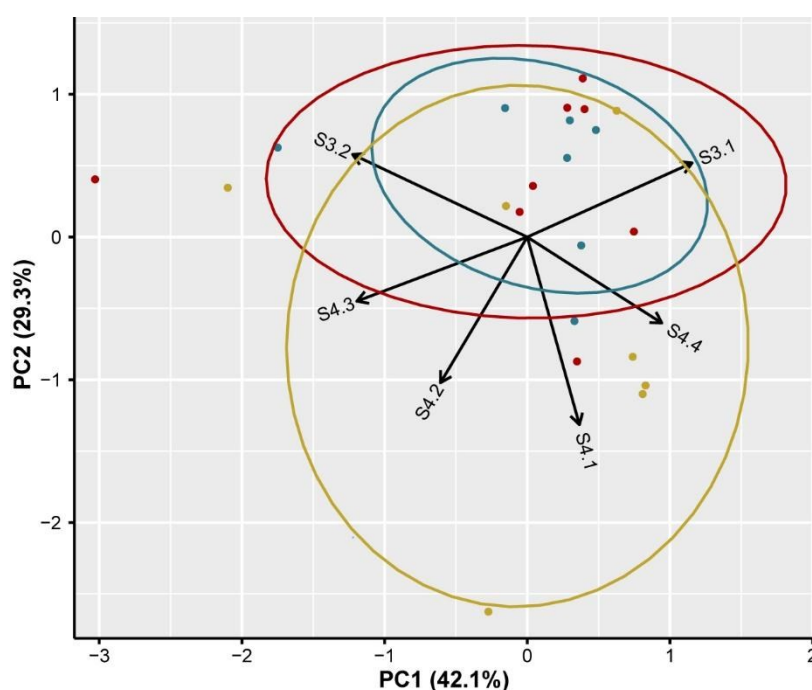


Figura 55. Análisis de componentes principales (PCA) de cada área de los picos provenientes del análisis por HILIC y WAX coloreado según los grupos de pacientes con EChc (G0, rojo y G1, azul) e individuos no infectados (NI, amarillo). El gráfico de puntuaciones que muestra los dos componentes principales (PC) representa el 42,1% (PC1) y el 29,3% (PC2) de la varianza general de los datos. Las elipses se basan en una región de confianza del 95%.

Aun cuando no se logró una buena separación entre grupos, el grupo NI tuvo una tendencia a separarse del grupo G0 y G1, principalmente cuando se evaluaron las estructuras tetrasialiladas (picos S4, **Figura 51**). Sólo el 42,1% de la variabilidad total fue explicada por los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), lo cual es acorde a la variabilidad observada en el conjunto de muestras.

9.3 Análisis de correlación entre carga parasitaria y abundancia de tetrasialilados (áreas cromatográficas de los picos).

Finalmente, el último paso de este estudio consistió en evaluar si existía una correlación entre la presencia de ADN de *T. cruzi* en sangre (qPCR positiva) y el área de los picos analizados. Cuando se analizó el número de equivalentes parasitarios/mL y la abundancia de los picos, se evidenció una correlación negativa específicamente para las estructuras tetrasialiladas S4.3 y S4.4 en el grupo G1 y G0, respectivamente (**Figura 56**).

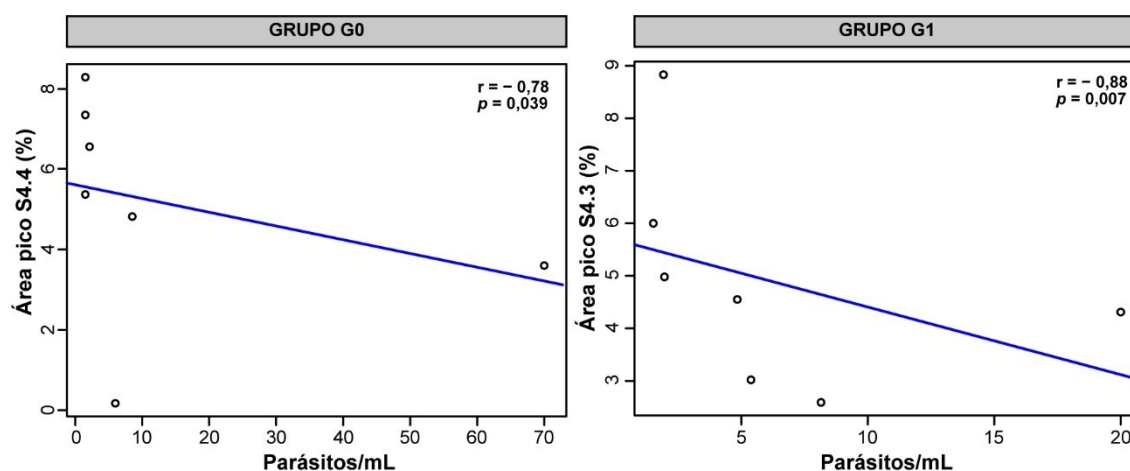


Figura 56. Análisis de correlación que muestra la relación entre el área de los picos obtenidos por WAX y el equivalente parasitario/mL (qPCR) en pacientes pertenecientes al grupo G0 (panel izquierdo) y G1 (panel derecho) mediante la correlación de rangos de Spearman. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Se detalla en la Figura el Coeficiente de Correlación (r) y el valor de probabilidad (p).

10. Discusión

Uno de los grandes vacíos en el conocimiento actual sobre la infección por *T. cruzi* es cómo identificar a los pacientes que desarrollarán alteraciones cardíacas, o a los pacientes que, aunque asintomáticos, tienen una cardiopatía subclínica que amerita vigilancia estricta. Es prioridad de la OMS la identificación de biomarcadores moleculares que puedan utilizarse para predecir la evolución de la enfermedad y realizar un pronóstico clínico confiable, aunque aún sin éxito. En este sentido, el área de los glicobiomarcadores, y en particular el glicoma de suero/plasma, se ha explorado en otras patologías como cáncer o esteatohepatitis no alcohólica (Kamada *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020), pero en la EChc permanece poco explorado. Considerando la escasez de estudios publicados sobre el N-glicoma plasmático en los pacientes con ECh crónicamente infectados, se hipotetizó que cambios en el N-glicoma plasmático podrían actuar como marcadores de pronóstico de la ECh.

En el curso de la infección del huésped, *T. cruzi* utiliza una amplia variedad de mecanismos para escapar de la vigilancia inmune del hospedero, entre los que se destaca la enzima trans-sialidasa (TS) (Schenkman *et al.*, 1991; Parodi *et al.*, 1992), un factor de virulencia clave para este patógeno. Dado que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico (AS) *de novo* (Erdmann *et al.*, 2009; da Fonseca *et al.*, 2019), la TS le permite sortear esta limitación a través de la hidrólisis del AS de los glicanos del huésped, facilitando así su transferencia a la superficie del parásito. Si bien se ha estudiado ampliamente la manipulación de AS por parte de este patógeno para establecer una infección exitosa (Schenkman *et al.*, 1994; De-Rubin and Schenkman, 2012; Nardy *et al.*, 2016; Musikant *et al.*, 2021), hasta la fecha no se ha explorado su impacto en las complicaciones clínicas relacionadas con la EChc ni tampoco si los cambios generados podrían ser cuantificados tempranamente para predecir el curso clínico de la enfermedad. En ese contexto, una investigación reciente demostró que la infección por *T. cruzi* promueve la regulación diferencial negativa de varias enzimas involucradas en las vías de glicosilación en cardiomiocitos humanos [(Rafael Barboza *et al.*, 2023)], lo que resulta en niveles disminuidos de sialilación cardíaca, provocando un marcado aumento en el número de parásitos

intracelulares. En un estudio anterior, Montpetit *et al.*, (2009) utilizando un modelo murino, determinaron que una deficiencia de sialilación comprometió el potencial de acción y las funciones de los canales de sodio dependientes de voltaje en los cardiomiocitos auriculares, todos síntomas observados en los pacientes que padecen CCC.

Otro estudio que pone en manifesto la importancia de la sialilación dentro del marco de la fisiopatología de la EChc, es el realizado en nuestro laboratorio (Benatar *et al.*, 2015), donde se demostró que este patógeno es capaz de modular el glicofenotipo de las células cardíacas, lo que altera la unión de una lectina inmunomoduladora, la Galectina-1 (Gal-1). Gal-1 inhibe la infección de células cardíacas por *T. cruzi*, ya que una ausencia de esta glicoproteína incrementó los niveles de parasitemia de los animales infectados con las dos cepas utilizadas en el estudio: cepa Brazil (Tc I) y cepa Tulahuén (Tc VI). Se ha demostrado que los grupos filogenéticos Tc I y Tc II se caracterizan por una expresión diferencial de TS, donde estas últimas expresan mayores cantidades de esta enzima (Risso *et al.*, 2004). Esta diferencia, que supone mayores niveles de desialilación de las células del huésped, podría impactar en la progresión hacia formas clínica manifestables, ya que se demostró una asociación positiva entre la infección con Tc II e con insuficiencia o paro cardíacos repentino (Nielebock *et al.*, 2020).

En este trabajo de Tesis doctoral, se estudiaron los perfiles de N-glicosilación plasmática en pacientes de EChc con o sin alteraciones cardíacas (grupos G1 y G0, respectivamente), comparándolos también con individuos no infectados (grupo NI). Nuestros resultados por cromatografía de intercambio aniónico muestran una disminución significativa en N-glicanos tetrasialilados de plasma en pacientes con compromiso cardíaco (G1) respecto de sujetos no infectados (NI). Este resultado, nos conduce a hipotetizar una posible hidrólisis de las estructuras tetrasialiladas en pacientes con sintomatología cardíaca por efecto de una neuraminidasa (y en particular, considerando los antecedentes previamente descriptos para la TS y su relevancia en *T. cruzi*, con contribución de la actividad de esta enzima), aunque los efectos de la patología cardíaca *per se* no pueden descartarse, como lo demuestra el incremento de ácido siálico libre en plasma pacientes con cardiopatías no

Chagásicas (Cheeseman *et al.*, 2023), o estudios anteriores que han demostrado el papel clave de neuraminidasas del huésped como Neu-1 en patologías cardíacas (Heimerl *et al.*, 2020, 2022) o la propuesta de la utilización de inhibidores de sialidasas en patologías como isquemia de miocardio e infarto de miocardio (US20190054055A1).

Desde la perspectiva de este estudio y considerando que: a) se observó una correlación negativa entre la disminución en la abundancia de tetrasialilados y la carga parasitaria en ambos grupos de infectados, incluso en aquellos sin manifestaciones clínicas de la enfermedad, y b) dado que los niveles de parasitemia en pacientes sintomáticos crónicamente infectados correlacionan positivamente con la falla cardíaca asociada a la enfermedad (de Oliveira *et al.*, 2021), es posible considerar que la infección con *T. cruzi* y los niveles de transialidasa podrían ser un factor no explorado en la desialilación de glicoproteínas plasmáticas. Debido a que se analiza el N-glicoma en su totalidad y no las glicoproteínas específicas que están siendo desialiladas, excede a este trabajo de Tesis la identificación de las glicoproteínas específicamente alteradas en su sialilación (ver Perspectivas).

Si bien los resultados obtenidos son sólo significativos para los tetrasialilados en su conjunto (por intercambio aniónico), las limitaciones de la técnica HILIC no permitieron establecer cuáles de los tetrasialilados estarían siendo alterados. En ese sentido, la tendencia al aumento observada para los trisialilados se entiende a través del análisis por HILIC con alteraciones opuestas en diferentes tipos de estructuras. Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas en otros glicanos sialilados no excluye la posibilidad de alteración en otras estructuras, dadas las limitaciones técnicas y el tamaño muestral de este estudio. Nuestra hipótesis al momento de presentación de esta tesis es que las alteraciones observadas constituyen la suma de una serie de potenciales efectos, entre los cuales se encuentra la acción de la transialidasa, pero podrían también incluir otras potenciales alteraciones relacionadas con la patología cardíaca (por ejemplo, desialilación por sialidasas del huésped, o alteraciones en la expresión de glicoproteínas plasmáticas con diferentes tipos de N-glicanos como consecuencia de la inflamación).

11. Perspectivas

En función de los resultados obtenidos, se abren diferentes posibilidades a explorar a futuro.

Considerando que el tamaño de muestra es una de las limitaciones de este estudio, posteriores investigaciones ampliarán este trabajo no sólo con un mayor número de pacientes que padecen las diferentes manifestaciones clínicas de la EChc sino también, incluyendo individuos con miocardiopatías no asociadas a la EChc, para elucidar si las alteraciones en la sialilación observadas son específicas de la respuesta patológica asociada a *T. cruzi*, si son causa del estado inflamatorio, o consecuencia de un efecto conjunto.

Por otro lado, es importante señalar que este estudio adoptó un enfoque transversal, lo que implica que su capacidad para establecer causalidad es limitada. Por lo tanto, dado que los primeros signos de afectación cardíaca pueden pasar desapercibidos, especialmente considerando que muchos individuos crónicamente infectados por *T. cruzi* carecen de acceso a métodos de imagen cardíaca avanzados, existe la posibilidad de que algunos pacientes en las etapas tempranas de la enfermedad sean incorrectamente diagnosticados como individuos con EChc asintomática (Duran-Crane *et al.*, 2020). Por esto, resultará fundamental adoptar un enfoque prospectivo longitudinal que permita evaluar alteraciones en los N-glicanos plasmáticos de un mismo paciente durante un periodo definido en el tiempo y determinar si estas alteraciones emergen de manera temprana luego de la infección por *T. cruzi*, incluso antes de que se manifiesten los síntomas cardiacos. Dado que no se contó en este estudio con el dato de la cepa que infecta a cada paciente o los niveles de transialidasa circulante, estudios posteriores se realizarán con estos datos disponibles, para poder elucidar su relevancia.

Finalmente, será objeto de estudio posterior: a) determinar la identidad específica de los N-glicanos alterados por HILIC-FLR y digestión con exoglicosidasas, de manera de determinar una firma única de N-glicanos que podría tener potencial predictivo en los pacientes con EChc; b) identificar mediante

glicoproteómica qué glicoproteínas específicas son las que presentan alteraciones en N-glicanos.

12. Conclusiones

En este trabajo de Tesis se ha abordado el estudio de nuevas proteínas antigénicas de Tc323 para su uso potencial para el diagnóstico de la EChc y la búsqueda de alteraciones en la N-glicosilación plasmática que puedan predecir el avance de la patología en aquellos individuos que permitan anticipar la progresión de la enfermedad mediante dos aproximaciones distintas.

Una de ellas consistió en la caracterización de una proteína novedosa y que carece de homólogos por fuera de los kinetoplastidos lo que impulsó a su validación como candidato para el diagnóstico serológico de la EChc. Se demostró que Tc323 se encuentra en el espacio interior de la membrana plasmática de este protozoo y que está diferencialmente expresada tanto entre cepas de *T. cruzi*, que representan diferentes UDTs, así como en las distintas etapas de desarrollo de vida del parásito. Adicionalmente, se predijo la estructura tridimensional de la proteína mediante aproximaciones bioinformáticas y se determinó la presencia de seis dominios (D1-D6) estructurales que la conforman. De esta manera, ante la imposibilidad de obtener a Tc323 en su longitud completa para confirmar su potencial diagnóstico, se determinó que las regiones correspondientes a D3 y D6 poseían las mayores puntuaciones de inmunogenicidad teórica según varios predictores y eran consideradas inmunogénicas. Por lo tanto, se centraron los esfuerzos en la producción recombinante de ambas regiones (rTcD3 y rTcD6) y se evaluó su reactividad frente a una amplia cohorte de individuos *T. cruzi*-positivos y negativos. Ambos Ags demostraron una alta capacidad diagnóstica para discriminar muestras seropositivas y seronegativas para la EChc provenientes de múltiples áreas endémicas e independientemente de la manifestación clínica presentada por el paciente. Más aún, las tasas de reactividad cruzada con numerosas enfermedades infecciosas no relacionadas la infección por *T. cruzi* fue despreciable. Asimismo, el uso combinado de rTcD3 y rTcD6 tiene el potencial de usarse para reducir el número de casos no concluyentes. En conjunto, los resultados aquí presentados sugieren que ambas proteínas pueden ser elegidas para la continuación de los estudios de Fase III.

Por otro lado, las simulaciones de acoplamiento predijeron a D5 como posible epítotope del Ac scFv 6B6. No obstante, los enfoques aquí utilizados no permitieron validar esta predicción, principalmente como consecuencia de la limitación generada por el tamaño molecular de Tc323.

La segunda aproximación se basó en la búsqueda de N-glicanos en el plasma que estén diferencialmente afectados entre los pacientes con las diferentes manifestaciones clínicas de la EChc y que permitan ser utilizados como marcadores prognósticos de esta enfermedad. De esta manera, se ha demostrado que la presencia de cardiopatía asociada a la EChc altera significativamente el N-glicoma plasmático al nivel de estructuras tetrasialiladas obtenidas por WAX. Más aún, aunque no significativas, se observaron tendencias divergentes en las abundancias de las estructuras trisialiladas de los individuos con presentaban patología cardiaca demostrable de aquellos con EChc indeterminada y sujetos no infectados, que mantuvieron niveles similares de abundancias en dichas estructuras. Además, se comprobó una correlación negativa entre la cuantificación de carga parasitaria y el área de algunos picos tetrasialilados. Conjuntamente estos resultados sugieren una potencial desialilación del N-glicoma plasmático como consecuencia de la inflamación subyacente a la inflamación crónica del miocardio causada por la infección por *T. cruzi*.

Una característica común a ambas aproximaciones que aporta un valor especial a los resultados obtenidos es el uso de muestras de pacientes para el estudio tanto diagnóstico como pronóstico. En ese sentido, los antígenos rTcD3 y rTcD6 validados experimentalmente como buenos candidatos para el diagnóstico serológico de la EChc, así como aquellas estructuras N-glicosiladas que pudieran encontrarse específicamente modificadas en presencia de patología cardiaca, son esencialmente validadas en humanos. De esta forma, quedan exentos de la necesidad de validación en otros modelos experimentales.

13. Referencias

- A. Prata (2001). Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. Lancet infection disease. *Clin. Epidemiol. Asp. Chagas Dis.* 1, 92–100. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Abras, A., Gállego, M., Llovet, T., Tebar, S., Herrero, M., Berenguer, P., *et al.* (2016). Serological diagnosis of chronic chagas disease: Is it time for a change? *J. Clin. Microbiol.* 54. doi: 10.1128/JCM.00142-16
- Alonso-Padilla, J., Gallego, M., Schijman, A. G., and Gascon, J. (2017). Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17, 699–710. doi: 10.1080/14737159.2017.1338566
- Alonso-Padilla, J., López, M. C., Esteva, M., Zrein, M., Casellas, A., Gómez, I., *et al.* (2021). Serological reactivity against *T. cruzi*-derived antigens: Evaluation of their suitability for the assessment of response to treatment in chronic Chagas disease. *Acta Trop.* 221. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.105990
- Altcheh, J. M., and Freilij, H. (2019). *Chagas' disease: A Clinical Approach.*
- Andrade, D. V., Gollob, K. J., and Dutra, W. O. (2014). Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, 1–10. doi: 10.1371/journal.pntd.0003010
- Antonietti, L., Mariani, J., Martínez, M. J., Santalla, M., Vensentini, N., Kyle, D. A., *et al.* (2023). Circulating microRNAs as biomarkers of Chagas cardiomyopathy. *Front. Cardiovasc. Med.* 10. doi: 10.3389/fcvm.2023.1250029
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., *et al.* (2009). TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* 38, 457–462. doi: 10.1093/nar/gkp851
- Bangs, J. D., Uyetake, L., Brickman, M. J., Balber, A. E., and Boothroyd, J. C. (1993). Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in trypanosoma brucei. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. *J. Cell Sci.* 105, 1101–1113. doi: 10.1242/jcs.105.4.1101
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J., *et al.* (2003). The trypanosomiases. *Lancet* 362, 1469–1480. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14694-6
- Baruch, J., Suanes, A., Piaggio, J. M., and Gil, A. D. (2020). Analytic Sensitivity of an ELISA Test on Pooled Sera Samples for Detection of Bovine Brucellosis in Eradication Stages in Uruguay. *Front. Vet. Sci.* 7. doi: 10.3389/fvets.2020.00178
- Bas, M., Terrier, A., Jacque, E., Dehenne, A., Pochet-Béghin, V., Béghin, C., *et al.* (2019). Fc Sialylation Prolongs Serum Half-Life of Therapeutic Antibodies. *J. Immunol.* 202. doi: 10.4049/jimmunol.1800896

- Bautista-López, N. L., Ndao, M., Camargo, F. V., Nara, T., Annoura, T., Hardie, D. B., *et al.* (2017). Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. *J. Clin. Microbiol.* 55. doi: 10.1128/JCM.01649-16
- Beghini, M., de Araújo, M. F., Severino, V. O., Etchebehere, R. M., Rocha Rodrigues, D. B., and de Lima Pereira, S. A. (2017). Evaluation of the immunohistochemical expression of Gal-1, Gal-3 and Gal-9 in the colon of chronic chagasic patients. *Pathol. Res. Pract.* 213. doi: 10.1016/j.prp.2017.04.014.
- Benatar, A. F., García, G. A., Bua, J., Cerliani, J. P., Postan, M., Tasso, L. M., *et al.* (2015). Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by *Trypanosoma cruzi* on Cardiac Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9. doi: 10.1371/journal.pntd.0004148
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 373, 456–466. doi: 10.1056/NEJMra1410150
- BERNSTEIN, F. C., KOETZLE, T. F., WILLIAMS, G. J. B., MEYER, E. F., BRICE, M. D., RODGERS, J. R., *et al.* (1977). The Protein Data Bank: A Computer-Based Archival File for Macromolecular Structures. *Eur. J. Biochem.* 80. doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11885.x
- Berrizbeitia, M., Moreno, D., Ward, B. J., Gómez, E., Jorquera, A., Rodríguez, J., *et al.* (2012). *Trypanosoma cruzi* Infection in an Indigenous Kariña Community in Eastern Venezuela. *Epidemiol. Res. Int.* 2012. doi: 10.1155/2012/138259
- Bocchi, E. A., Bestetti, R. B., Scanavacca, M. I., Cunha Neto, E., and Issa, V. S. (2017). Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 1510–1524. doi: 10.1016/j.jacc.2017.08.004
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bradwell, K. R., Koparde, V. N., Matveyev, A. V., Serrano, M. G., Alves, J. M. P., Parikh, H., *et al.* (2018). Genomic comparison of *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Trypanosoma cruzi* strains of high and low virulence. *BMC Genomics* 19. doi: 10.1186/s12864-018-5112-0
- Brasil, P. E. A. A., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A. M., Sangenis, L. H. C., and Braga, J. U. (2010). ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 10, 337. doi: 10.1186/1471-2334-10-337
- BRAVO-TOBAR, I. D., NELLO-PÉREZ, C., FERNÁNDEZ, A., MOGOLLÓN, N., PÉREZ, M. C., VERDE, J., *et al.* (2015). ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITY AND SERUM C-REACTIVE PROTEIN AS PROGNOSTIC MARKERS OF CHAGAS DISEASE SEVERITY. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57. doi: 10.1590/s0036-46652015000500003
- Brenière, S. F., Waleckx, E., and Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–19. doi: 10.1371/journal.pntd.0004792

- Briceño, L., Mary Rodríguez, E., Medina, M., Campos, Y., Mosca, W., Briceño, A., *et al.* (2010). An inexpensive antigen for serodiagnosis of Chagas' disease.
- Brossas, J.-Y., Gulin, J. E. N., Bisio, M. M. C., Chapelle, M., Marinach-Patrice, C., Bordessoules, M., *et al.* (2017). Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. *PLoS One* 12, e0185504. doi: 10.1371/journal.pone.0185504
- Burns, J. M., Shreffler, W. G., Rosman, D. E., Sleath, P. R., March, C. J., and Reed, S. G. (1992). Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1239–1243. doi: 10.1073/pnas.89.4.1239
- Caballero E., Z., Correa, R., Nascimento, M. S., Villarreal, A., Llanes, A., and Kesper, N. (2019). High sensitivity and reproducibility of in-house ELISAs using different genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 41, 1–12. doi: 10.1111/pim.12627
- Caballero, Z. C., Sousa, O. E., Marques, W. P., Saez-Alquezar, A., and Umezawa, E. S. (2007). Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania spp.* *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1045–1049. doi: 10.1128/CVI.00127-07
- Camussone, C., Gonzalez, V., Belluzo, M. S., Pujato, N., Ribone, M. E., Lagier, C. M., *et al.* (2009). Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 16. doi: 10.1128/CVI.00005-09
- Candia-Puma, M. A., Machaca-Luque, L. Y., Roque-Pumahuanca, B. M., Galdino, A. S., Giunchetti, R. C., Coelho, E. A. F., *et al.* (2022). Accuracy of Diagnostic Tests for the Detection of Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics* 12. doi: 10.3390/diagnostics12112752
- Cebul, R. D., Hershey, J. C., and Williams, S. V. (1982). Using multiple tests: Series and parallel approaches. *Clin. Lab. Med.* 2. doi: 10.1016/s0272-2712(18)31018-7
- Ceciliani, F., and Pocacqua, V. (2007). The Acute Phase Protein α1-Acid Glycoprotein: A Model for Altered Glycosylation During Diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8. doi: 10.2174/138920307779941497
- Cerban, F. M., Gea, S., Menso, E., and Vottero-Cima, E. (1993). Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67. doi: 10.1006/clin.1993.1041
- Cerisola, J. A., Alvarez, M., Wynne de Martini, G. J., and Bonacci, H. (1971). La reacción de hemoaglutinación cualitativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bioq Clin* 5, 94.
- Cervantes-Landín, A. Y., Martínez, I., Schabib, M., and Espinoza, B. (2014). High molecular weight proteins of *Trypanosoma cruzi* reduce cross-reaction with *Leishmania spp.* in serological diagnosis tests. *Biomed Res. Int.* 2014. doi: 10.1155/2014/365403.
- Cheeseman, J., Badia, C., Elgood-Hunt, G., Gardner, R. A., Trinh, D. N., Monopoli, M. P., *et al.* (2023). Elevated concentrations of Neu5Ac and Neu5,9Ac2 in human plasma:

- potential biomarkers of cardiovascular disease. *Glycoconj. J.* 40, 645–654. doi: 10.1007/s10719-023-10138-3
- Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974). Prediction of Protein Conformation. *Biochemistry* 13. doi: 10.1021/bi00699a002
- Cloos, P. A. C., and Christgau, S. (n.d.). Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity.
- Colley, K. J., Varki, A., Haltiwanger, R. S., and Kinoshita, T. (2022). Cellular Organization of Glycosylation.
- Corral, R. S., Guerrero, N. A., Cuervo, H., Gironès, N., and Fresno, M. (2013). *Trypanosoma cruzi* Infection and Endothelin-1 Cooperatively Activate Pathogenic Inflammatory Pathways in Cardiomyocytes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7. doi: 10.1371/journal.pntd.0002034
- Cortes-Serra, N., Losada-Galvan, I., Pinazo, M. J., Fernandez-Becerra, C., Gascon, J., and Alonso-Padilla, J. (2020). State-of-the-art in host-derived biomarkers of Chagas disease prognosis and early evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* treatment response. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165758
- Cotrim, P. C., Paranhos, G. S., Mortara, R. A., Wanderley, J., Rassi, A., Camargo, M. E., *et al.* (1990). Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human Chagasic sera. *J. Clin. Microbiol.* 28, 519–524. doi: 10.1128/jcm.28.3.519-524.1990
- Coura, J. R., and Borges-Pereira, J. (2010a). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.008
- Coura, J. R., and Borges-Pereira, J. (2010b). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115, 5–13. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.008
- Cummings, R. D., and Kornfeld, S. (1984). The distribution of repeating [Gal beta 1,4GlcNAc beta 1,3] sequences in asparagine-linked oligosaccharides of the mouse lymphoma cell lines BW5147 and PHAR 2.1. *J. Biol. Chem.* 259. doi: 10.1016/s0021-9258(20)82134-6
- da Fonseca, L. M., da Costa, K. M., Chaves, V. de S., Freire-De-Lima, C. G., Morrot, A., Mendonça-Previato, L., *et al.* (2019). Theft and reception of host cell's sialic acid: Dynamics of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases and mucin-like molecules on chagas' disease immunomodulation. *Front. Immunol.* 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00164
- da Silva, C. A., Fattori, A., Sousa, A. L., Mazon, S. B., Alegre, S. M., Almeida, E. A., *et al.* (2010). Determining the C-Reactive Protein Level in Patients With Different Clinical Forms of Chagas Disease. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.)* 63. doi: 10.1016/s1885-
- Da Silveira, J. F., Umezawa, E. S., and Luquetti, A. O. (2001). Chagas disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 17, 286–291. doi: 10.1016/S1471-4922(01)01897-9
- Dario, M. A., Pavan, M. G., Rodrigues, M. S., Lisboa, C. V., Kluyber, D., Desbiez, A. L. J., *et al.* (2021). *Trypanosoma rangeli* genetic, mammalian hosts, and geographical diversity

- from five brazilian biomes. *Pathogens* 10. doi: 10.3390/pathogens10060736
- Dc-Rubin, S. S. C., and Schenkman, S. (2012). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in chagas' disease. *Cell. Microbiol.* 14. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01831.x
- de Andrade, J. P., Neto, J. A. M., de Paola, A. A. V., Vilas-Boas, F., Oliveira, G. M. M., Bacal, F., *et al.* (2011). I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of chagas' heart disease. Executive summary. *Arq. Bras. Cardiol.* 96. doi: 10.1590/S0066-782X2011000600002
- De Marchi, C. R., Di Noia, J. M., Frasc, A. C. C., Neto, V. A., Almeid, I. C., and Buscaglia, C. A. (2011). Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas' disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 18. doi: 10.1128/CVI.05289-11
- de Noya, B. A., Pérez-Chacón, G., Díaz-Bello, Z., Dickson, S., Muñoz-Calderón, A., Hernández, C., *et al.* (2017). Description of an oral chagas disease outbreak in Venezuela, including a vertically transmitted case. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 569–571. doi: 10.1590/0074-02760170009
- de Oliveira, M. T., Schmidt, A., da Silva, M. C., Donadi, E. A., da Silva, J. S., and Marin-Neto, J. A. (2021). Parasitic Load Correlates With Left Ventricular Dysfunction in Patients With Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Front. Cardiovasc. Med.* 8. doi: 10.3389/fcvm.2021.7413475857(10)70215-2
- De Oliveira, R. B., Troncon, L. E. A., Dantas, R. O., and Meneghelli, U. G. (1998). Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 884–889. doi: 10.1016/S0002-9270(98)00151-8
- de Rezende, J., and Luquetti, A. (1994). Chagasic megavisceras. *Chagas' Dis. Nerv. Syst. Sci. Publ. no 547. Washington, DC Pan Am. Heal. Organ.*
- de Sousa, A. S., Vermeij, D., Ramos, A. N., and Luquetti, A. O. (2023). Chagas disease. *Lancet*, 203–218. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01787-7
- DeLuca, K. F., Mick, J. E., Ide, A. H., Lima, W. C., Sherman, L., Schaller, K. L., *et al.* (2021). Generation and diversification of recombinant monoclonal antibodies. *Elife* 10. doi: 10.7554/eLife.72093
- Dias, J. C. P., Ramos, A. N., Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M. A., Coura, J. R., *et al.* (2016). 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* doi: 10.1590/0037-8682-0505-2016
- Díaz, M. L., Torres, R., and González, C. I. (2011). Differential protein expression in developmental stages of *Trypanosoma cruzi* I isolated from a patient with chronic chagasic cardiomyopathy. *Biomedica* 31. doi: 10.7705/biomedica.v31i4.400
- Díaz-García, L., Medina-Vera, I., García-de la Puente, S., González-Garay, A., and Murata, C. (2019). Estudios de exactitud diagnóstica. *Acta Pediátrica México* 40. doi: 10.18233/apm40no6pp342-3571933

- Doherty, A. J., Connolly, B. A., and Worrall, A. F. (1993). Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene*. doi: 10.1016/0378-1119(93)90491-K
- Dong, H., Nilsson, L., and Kurland, C. G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriol.* doi: 10.1128/jb.177.6.1497-1504.1995
- Dos Santos, G. P., Abukawa, F. M., Souza-Melo, N., Alcântara, L. M., Bittencourt-Cunha, P., Moraes, C. B., *et al.* (2021). Cyclophilin 19 secreted in the host cell cytosol by *Trypanosoma cruzi* promotes ROS production required for parasite growth. *Cell. Microbiol.* 23, e13295. doi: 10.1111/cmi.13295
- Doyle, H. A., and Mamula, M. J. (2001). Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol.* 22, 443–449. doi: 10.1016/S1471-4906(01)01976-7
- Duffy, T., Cura, C. I., Ramirez, J. C., Abate, T., Cayo, N. M., Parrado, R., *et al.* (2013). Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7. doi: 10.1371/journal.pntd.0002000.
- Duran-Crane, A., Rojas, C. A., Cooper, L. T., and Medina, H. M. (2020). Cardiac magnetic resonance imaging in Chagas' disease: a parallel with electrophysiologic studies. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* 36. doi: 10.1007/s10554-020-01925-2.
- Duthie, M. S., Guderian, J. A., Vallur, A. C., Misquith, A., Liang, H., Mohamath, R., *et al.* (2016). Multi-epitope proteins for improved serological detection of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas Disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 84. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.006
- Echavarría, N. G., Echeverría, L. E., Stewart, M., Gallego, C., and Saldarriaga, C. (2020). Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Curr. Probl. Cardiol.*, 100507. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2019.100507.
- Emini, E. A., Hughes, J. V, Perlow, D. S., and Boger, J. (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55. doi: 10.1128/jvi.55.3.836-839.1985
- Erdmann, H., Steeg, C., Koch-Nolte, F., Fleischer, B., and Jacobs, T. (2009). Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell. Microbiol.* 11. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01350.x.
- Escalante, H., Jara, C., Davelois, K., Iglesias, M., Benites, A., and Espinoza, R. (2014). [Western blot technique standardization for specific diagnosis of Chagas disease using excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes]. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 31, 644–651.
- Espinoza, B., Martínez, I., and Schabib-Hany, M. (2019). First report of family clusters of Chagas disease seropositive blood donors in Mexico City and their epidemiological relevance. *Acta Trop.* 193, 23–30. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.02.014

- Eulalio, A., Mano, M., Ferro, M. D., Zentilin, L., Sinagra, G., Zacchigna, S., *et al.* (2012). Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 492. doi: 10.1038/nature11739
- Florida-Yapur, N., Monje-Rumi, M., Ragone, P., Lauthier, J. J., Tomasini, N., D'Amato, A. A., *et al.* (2019). TcTASV Antigens of *Trypanosoma cruzi*: Utility for diagnosis and high accuracy as biomarkers of treatment efficacy in pediatric patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 101. doi: 10.4269/ajtmh.18-0936
- Frade, A. F., Luquetti, A. O., Prata, A., and Ferreira, A. W. (2011). Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. *Acta Trop.* 117. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.08.018
- Frasch, A. C. C., Cazzulo, J. J., Åslund, L., and Pettersson, U. (1991). Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol. Today* 7, 148–151. doi: 10.1016/0169-4758(91)90284-U
- Freeman, B. D., Machado, F. S., Tanowitz, H. B., and Desruisseaux, M. S. (2014). Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. *Life Sci.* 118. doi: 10.1016/j.lfs.2014.04.021
- Freilij, H., and Altcheh, J. (1995). Congenital chagas' disease: Diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infect. Dis.* 21. doi: 10.1093/clinids/21.3.551
- Freilij, H., and Storino, R. (1994). Chagas e inmunodepresión (Capítulo 17). *Enferm. Chagas, Storino R, Milei J. Ed. Mosby-Doyma*, 293–301.
- Fung, E., Chan, E. Y. S., Ng, K. H., Yu, K. M., Li, H., and Wang, Y. (2023). Towards clinical application of GlycA and GlycB for early detection of inflammation associated with (pre)diabetes and cardiovascular disease: recent evidence and updates. *J. Inflamm. (United Kingdom)* 20. doi: 10.1186/s12950-023-00358-7
- Galanis, K. A., Nastou, K. C., Papandreou, N. C., Petichakis, G. N., and Iconomidou, V. A. (2019). Linear B-cell epitope prediction: a performance review of currently available methods. doi: 10.1101/833418
- Galanis, K. A., Nastou, K. C., Papandreou, N. C., Petichakis, G. N., Pigis, D. G., and Iconomidou, V. A. (2021). Linear B-cell epitope prediction for in silico vaccine design: A performance review of methods available via command-line interface. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–19. doi: 10.3390/ijms22063210
- Galvao, S., Bensenor, I. M., Blaha, M. J., Jones, S., Toth, P. P., Santos, R. D., *et al.* (2023). GlycA as a Novel Biomarker of Systemic Inflammation in Hypothyroidism. *Thyroid* 33. doi: 10.1089/thy.2023.0070
- Garcia, V. S., Gonzalez, V. D. G., Marcipar, I. S., and Gugliotta, L. M. (2014). Immunoagglutination test to diagnose Chagas disease: Comparison of different latex-antigen complexes. *Trop. Med. Int. Heal.* 19. doi: 10.1111/tmi.12379
- García-Bermejo, I., Arana, D. M., Zaragoza Vargas, G., Carrasco Fernández, B., García, E.,

- Nieto, J., *et al.* (2023). Evaluation of the Chagas VirClia® and Chagas TESA VirClia® for the Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Pathogens* 12. doi: 10.3390/pathogens12010050.
- Gardinassi, L. G., Dotz, V., Ederveen, A. H., de Almeida, R. P., Costa, C. H. N., Costa, D. L., de Jesus, A. R., Mayboroda, O. A., Garcia, G. R., Wuhrer, M., & de Miranda Santos, I. K. F. (2014). Clinical severity of visceral leishmaniasis is associated with changes in immunoglobulin G Fc N-glycosylation. *MBio*, 5(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01844-14>
- Georg, I., Hasslocher-Moreno, A. M., Xavier, S. S., Holanda, M. T. de, Roma, E. H., and Bonecini-Almeida, M. da G. (2017). Evolution of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody production in patients with chronic Chagas disease: Correlation between antibody titers and development of cardiac disease severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–22. doi: 10.1371/journal.pntd.0005796
- Gibbs, J. (2001). ELISA Tehcnical Bulletin-No 3. Corning Inc. *Life Sci.*
- Giordanengo, L., Gea, S., Barbieri, G., and Rabinovich, G. A. (2001). Anti-galectin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: Differential expression of this β -galactoside-binding protein in cardiac Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.* 124. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01512.x.
- Glas, A. S., Lijmer, J. G., Prins, M. H., Bonsel, G. J., and Bossuyt, P. M. M. (2003). The diagnostic odds ratio: A single indicator of test performance. *J. Clin. Epidemiol.* 56, 1129–1135. doi: 10.1016/S0895-4356(03)00177-X.
- Gogtay, N. J., and Thatte, U. M. (2017a). Statistical evaluation of diagnostic tests – part 2 [Pre-test and post-test probability and odds, likelihood ratios, receiver operating characteristic curve, youden's index and diagnostic test biases]. *J. Assoc. Physicians India* 65.
- Gogtay, N. J., and Thatte, U. M. (2017b). Statistical evaluation of diagnostic tests (part 1): Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values. *J. Assoc. Physicians India* 65.
- Gomes, Y. M., Lorena, V. M. B., and 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, 115–121. doi: 10.1590/S0074-02762009000900017
- Gómez-Ochoa, S. A., Rojas, L. Z., Echeverría, L. E., Muka, T., and Franco, O. H. (2022). Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Glob. Heart* 17. doi: 10.5334/GH.1150
- González, A., and Fillat, M. F. (2018). ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *Escherichia coli*. *Rev. Educ. Bioquímica* 37.
- Gornik, O., and Lauc, G. (2008). Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. 25, 267–278.

- Granjon, E., Dichtel-Danjoy, M. L., Saba, E., Sabino, E., Campos de Oliveira, L., and Zrein, M. (2016). Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-cruzi for the Serological Confirmation of Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10. doi: 10.1371/journal.pntd.0004596
- Greenbaum, J. A., Andersen, P. H., Blythe, M., Bui, H. H., Cachau, R. E., Crowe, J., *et al.* (2007). Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools. *J. Mol. Recognit.* 20. doi: 10.1002/jmr.815
- Greiner, M., Pfeiffer, D., and Smith, R. D. (2000). Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45. doi: 10.1016/S0167-5877(00)00115-X
- Gruber, A., and Zingales, B. (1993). *Trypanosoma cruzi*: Characterization of Two Recombinant Antigens with Potential Application in the Diagnosis of Chagas' Disease. *Exp. Parasitol.* 76. doi: 10.1006/expr.1993.1001
- Gudelj, I., Lauc, G., and Pezer, M. (2018). Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell. Immunol.* 333. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.009
- Guindon, S., Dufayard, J.-F. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Guzmán-Gómez, D., López-Monteon, A., De La Soledad Lagunes-Castro, M., Álvarez-Martínez, C., Hernández-Lutzon, M. J., Dumonteil, E., *et al.* (2015). Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: Role of the antigen used for diagnostic. *Parasites and Vectors*. doi: 10.1186/s13071-015-1072-2
- Haynes, C., Oldfield, C. J., Ji, F., Klitgord, N., Cusick, M. E., Radivojac, P., *et al.* (2006). Intrinsic disorder is a common feature of hub proteins from four eukaryotic interactomes. *PLoS Comput. Biol.* doi: 10.1371/journal.pcbi.0020100
- Heimerl, M., Gausepohl, T., Mueller, J. H., and Ricke-Hoch, M. (2022). Neuraminidases—Key Players in the Inflammatory Response after Pathophysiological Cardiac Stress and Potential New Therapeutic Targets in Cardiac Disease. *Biology (Basel)*. 11. doi: 10.3390/biology11081229
- Heimerl, M., Sieve, I., Ricke-Hoch, M., Erschow, S., Battmer, K., Scherr, M., *et al.* (2020). Neuraminidase-1 promotes heart failure after ischemia/reperfusion injury by affecting cardiomyocytes and invading monocytes/macrophages. *Basic Res. Cardiol.* 115. doi: 10.1007/s00395-020-00821-z
- Holst, S., Deuss, A. J. M., Van Pelt, G. W., Van Vliet, S. J., Garcia-Vallejo, J. J., Koeleman, C. A. M., *et al.* (2016). N-glycosylation profiling of colorectal cancer cell lines reveals association of fucosylation with differentiation and caudal type homeobox 1 (CDX1)/Villin mRNA expression. *Mol. Cell. Proteomics* 15. doi: 10.1074/mcp.M115.051235
- Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L. D., McNeill, P. D., Sleath, P. R., Lodes, M. J., *et*

- al.* (1999). A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation- confirmed and consensus-positive sera. *J. Infect. Dis.* 179. doi: 10.1086/314723
- Hu, M., Lan, Y., Lu, A., Ma, X., and Zhang, L. (2019). “Glycan-based biomarkers for diagnosis of cancers and other diseases: Past, present, and future,” in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. doi: 10.1016/bs.pmbts.2018.12.002
- Hu, W., Xie, J., Zhu, T., Meng, G., Wang, M., Zhou, Z., *et al.* (2020). Serum N-Acetylneuraminic Acid Is Associated with Atrial Fibrillation and Left Atrial Enlargement. *Cardiol. Res. Pract.* 2020. doi: 10.1155/2020/1358098
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L., and Frasch, A. C. C. (1987). Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25. doi: 10.1016/0166-6851(87)90006-5
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., and Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* 45, W24–W29. doi: 10.1093/nar/gkx346
- Joenvaara, S., Saraswat, M., Kuusela, P., Saraswat, S., Agarwal, R., Kaartinen, J., *et al.* (2018). Quantitative N-glycoproteomics reveals altered glycosylation levels of various plasma proteins in bloodstream infected patients. *PLoS One* 13. doi: 10.1371/journal.pone.0195006
- Källberg, M., Margaryan, G., Wang, S., Ma, J., and Xu, J. (2014). Raptorx server: A resource for template-based protein structure modeling. *Methods Mol. Biol.* doi: 10.1007/978-1-4939-0366-5_2
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* (80-). 313. doi: 10.1126/science.1129594
- Karplus, P. A., and Schulz, G. E. (1985). Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72. doi: 10.1007/bf01195768
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., and Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066. doi: 10.1093/nar/gkf436
- Kelly, E. A., Bulman, C. A., Gunderson, E. L., Irish, A. M., Townsend, R. L., Sakanari, J. A., *et al.* (2021). Comparative performance of latest-generation and FDA-cleared serology tests for the diagnosis of chagas disease. *J. Clin. Microbiol.* 59, 1–7. doi: 10.1128/JCM.00158-21
- Kelly, S., Ivens, A., Manna, P. T., Gibson, W., and Field, M. C. (2014). A draft genome for the African crocodilian trypanosome *Trypanosoma grayi*. *Sci. Data* 1. doi: 10.1038/sdata.2014.24
- Kelly, S., Ivens, A., Mott, G. A., O'Neill, E., Emms, D., Macleod, O., *et al.* (2017). An alternative strategy for trypanosome survival in the mammalian bloodstream revealed through

- genome and transcriptome analysis of the ubiquitous bovine parasite trypanosoma (megatrypanum) theileri. *Genome Biol. Evol.* 9. doi: 10.1093/gbe/evx152
- Khan, W. H., Khan, N., Mishra, A., Gupta, S., Bansode, V., Mehta, D., *et al.* (2022). Dimerization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein affects sensitivity of ELISA based diagnostics of COVID-19. *Int. J. Biol. Macromol.* 200. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.094
- Kolaskar, A. S., and Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 276. doi: 10.1016/0014-5793(90)80535-Q
- Krautz, G. M., Peterson, J. D., Godsel, L. M., Krettli, A. U., and Engman, D. M. (1998). Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58. doi: 10.4269/ajtmh.1998.58.137
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Kuschnir, E., Sgammini, H., Castro, R., Evequoz, C., Ledesma, R., and Brunetto, J. (1985). [Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy]. *Arq. Bras. Cardiol.*
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Lafaille, J. J., Linss, J., Krieger, M. A., Souto-Padrón, T., Wanderley, de S., and Goldenberg, S. (1989). Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35. doi: 10.1016/0166-6851(89)90115-1
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291. doi: 10.1107/s0021889892009944
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., and Laustsen, A. H. (2018). Basics of antibody phage display technology. *Toxins (Basel)*. 10. doi: 10.3390/toxins10060236
- Lefort, V., Longueville, J.-E., and Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Mol. Biol. Evol.* 34, 2422–2424. doi: 10.1093/molbev/msx149
- Levin, M. J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., *et al.* (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41. doi: 10.4269/ajtmh.1989.41.530
- Liang, J., Zhu, J., Wang, M., Singal, A. G., Odewole, M., Kagan, S., *et al.* (2019). Evaluation of AGP Fucosylation as a Marker for Hepatocellular Carcinoma of Three Different Etiologies. *Sci. Rep.* 9. doi: 10.1038/s41598-019-48043-1
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-

- Reason, I. J., *et al.* (2019). Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *J. Phys. Oceanogr.* 49, 1–13. doi: 10.3389/fpubh.2019.00166
- Li, C., Zhao, M., Xiao, L., Wei, H., Wen, Z., Hu, D., *et al.* (2021). Prognostic Value of Elevated Levels of Plasma N-Acetylneuraminic Acid in Patients With Heart Failure. *Circ. Hear. Fail.* 14, E008459. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.121.008459
- Linhares-Lacerda, L., Granato, A., Gomes-Neto, J. F., Conde, L., Freire-de-Lima, L., de Freitas, E. O., *et al.* (2018). Circulating plasma MicroRNA-208a as potential biomarker of chronic indeterminate phase of Chagas disease. *Front. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00269
- Llop, E., Ferrer-Batallé, M., Barrabés, S., Guerrero, P. E., Ramírez, M., Saldova, R., *et al.* (2016). Improvement of Prostate Cancer Diagnosis by Detecting PSA Glycosylation-Specific Changes. *Theranostics* 6. doi: 10.7150/thno.15226
- Lobo, M., Balouz, V., Melli, L., Carlevaro, G., Cortina, M. E., Cámara, M. de los M., *et al.* (2018). Molecular and antigenic characterization of *Trypanosoma cruzi* TolT proteins. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, 1–27. doi: 10.1371/journal.pntd.0007245
- Longhi, S. A., Brandariz, S. B., Lafon, S. O., Niborski, L. L., Luquetti, A. O., Schijman, A. G., *et al.* (2012). Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of chagas disease and discrimination of its clinical forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 267–271. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0533
- López, L., Arai, K., Giménez, E., Jiménez, M., Pascuzo, C., Rodríguez-Bonfante, C., *et al.* (2006). C-Reactive Protein and Interleukin-6 Serum Levels Increase as Chagas Disease Progresses Towards Cardiac Failure. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.)* 59. doi: 10.1016/s1885-5857(06)60048-0
- López-Monteon, A., Dumonteil, E., and Ramos-Ligonio, A. (2019). “More than a Hundred Years in the Search for an Accurate Diagnosis for Chagas Disease: Current Panorama and Expectations,” ed. A. J. Rodríguez-Morales (Rijeka: IntechOpen), Ch. 5. doi: 10.5772/intechopen.86567
- Luquetti, A. O., and Rassi, A. (2000). Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Trypanos. cruzi e doença Chagas* 2, 344–378.
- Majeau, A., Dumonteil, E., and Herrera, C. (2024). Identification of highly conserved *Trypanosoma cruzi* antigens for the development of a universal serological diagnostic assay. *Emerg. Microbes Infect.* 13. doi: 10.1080/22221751.2024.2315964
- Mandrekar, J. N. (2010). Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J. Thorac. Oncol.* 5, 1315–1316. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181ec173d
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., and Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115, 1109–1123. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296
- Mariño, K., Saldova, R., Adamczyk, B., and Rudd, P. M. (2011). Changes in serum N-glycosylation profiles: Functional significance and potential for diagnostics.

- Matsuda, N. M., Miller, S. M., and Evora, P. R. B. (2009). The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics* 64, 1219–1224. doi: 10.1590/S1807-59322009001200013.
- Meira, W. S. F., Galvao, L., Gontijo, E. D., Machado-coelho, G. L. L., Norris, K. a, and Chiari, E. (2002). *Trypanosoma cruzi* Recombinant Complement Regulatory Protein: a Novel Antigen for Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Chagas' Disease. *J. Clin. Epidemiol.* 40, 3735–3740. doi: 10.1128/JCM.40.10.3735
- Mendes, D. O., Lourdes, R. D. A., Lana, M. De Fujiwara, R. T., and Bartholomeu, D. C. (2014). Genome-Wide Screening and Identification of New *Trypanosoma cruzi* Antigens with Potential Application for Chronic Chagas Disease Diagnosis. 9. doi: 10.1371/journal.pone.0106304
- Menezes, C. A. da S., de Oliveira, A. L. G., Barbosa, I. C. M., de Jesus, A. C. P., Chaves, A. T., and Rocha, M. O. da C. (2024). Galectin-3 (Gal-3) and the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-2) as potential biomarkers for the clinical evolution of chronic Chagas cardiomyopathy. *Acta Trop.* 252. doi: 10.1016/j.actatropica.2024.107153.
- Ministerio de Salud de la Nación. 2017. “¿Qué Es El Chagas?” Accessed April 6. <http://www.msal.gob.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/ique-es-el-chagas>.
- Mishra, P., Pandey, C. M., Singh, U., Gupta, A., Sahu, C., and Keshri, A. (2019). Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Ann. Card. Anaesth.* 22. doi: 10.4103/aca.ACA_157_18.
- Montpetit, M. L., Stocker, P. J., Schwetz, T. A., Harper, J. M., Norring, S. A., Schaffer, L., *et al.* (2009). Regulated and aberrant glycosylation modulate cardiac electrical signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106. doi: 10.1073/pnas.0905414106
- Moreira, M. D. C. V., Heringer-Walther, S., Wessel, N., Moreira Ventura, T., Wang, Y., Schultheiss, H. P., *et al.* (2008). Prognostic value of natriuretic peptides in Chagas' disease: A 3-year follow-up investigation. *Cardiology* 110. doi: 10.1159/000112403
- Mucci, J., Carmona, S. J., Volcovich, R., Altcheh, J., Marco, J. D., Nielsen, M., *et al.* (2017). Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. 1–19.
- Musikant, D., Higa, R., Rodríguez, C. E., Edreira, M. M., Campetella, O., Jawerbaum, A., *et al.* (2021). Sialic acid removal by trans-sialidase modulates MMP-2 activity during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochimie* 186. doi: 10.1016/j.biochi.2021.04.005
- Nardy, A. F. F. R., Freire-de-Lima, C. G., Pérez, A. R., and Morrot, A. (2016). Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the escape from host immune surveillance. *Front. Microbiol.* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00348
- Negrette, O. S., Valdéz, F. J. S., Lacunza, C. D., Bustos, M. F. G., Mora, M. C., Uncos, A. D., *et*

- al. (2008). Serological evaluation of specific-antibody levels in patients treated for chronic chagas' disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 15. doi: 10.1128/CVI.00106-07
- Newman, T. B., Browner, W. S., Cummings, S. R., and Hulley, S. B. (2013). "Designing Studies of Medical Tests," in *Designing Clinical Research*.
- Niborski, L. L., Potenza, M., Chirivi, R. G. S., Simonetti, L., Ossowski, M. S., Grippo, V., *et al.* (2021). Recombinant antibody against *Trypanosoma cruzi* from patients with chronic Chagas heart disease recognizes mammalian nervous system. *EBioMedicine* 63. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103206
- Nielebock, M. A. P., Moreira, O. C., das Chagas Xavier, S. C., de Freitas Campos Miranda, L., de Lima, A. C. B., de Jesus Sales Pereira, T. O., *et al.* (2020). Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. *PLoS One* 15. doi: 10.1371/journal.pone.0243008
- Okamoto, E. E., Sherbuk, J. E., Clark, E. H., Marks, M. A., Gandarilla, O., Galdos-Cardenas, G., *et al.* (2014). Biomarkers in *Trypanosoma cruzi*-Infected and Uninfected Individuals with Varying Severity of Cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. doi: 10.1371/journal.pntd.0003227
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., *et al.* (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
- Oliveira, E. C., Stefani, M. M., Luquetti, A. O., Vêncio, E. F., Moreira, M. A., Souza, C., *et al.* (1993). *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas' disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 26. doi: 10.1590/S0037-86821993000100006
- Otvos, J. D., Shalaurova, I., Wolak-Dinsmore, J., Connelly, M. A., Mackey, R. H., Stein, J. H., *et al.* (2015). GlycA: A composite nuclear magnetic resonance biomarker of systemic inflammation. *Clin. Chem.* 61. doi: 10.1373/clinchem.2014.232918
- Ouchchane, L., Rabilloud, M., Boire, J. Y., Beuscart, R., Bénichou, J., Roy, P., *et al.* (2009). Évaluation des méthodes d'analyse appliquées aux sciences de la vie et de la santé—Biostatistique.
- PAHO (2018). *Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas.* Washington, D.C. OPS; 2018.
- Parker, J. M. R., Guo, D., and Hodges, R. S. (1986). New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry* 25. doi: 10.1021/bi00367a013
- Parodi, A. J., Pollevick, G. D., Mautner, M., Buschiazzi, A., Sanchez, D. O., and Frasch, A. C. (1992). Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 11. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05221.x
- Pavić, T., Dilber, D., Kifer, D., Selak, N., Keser, T., Ljubičić, C. D. S., *et al.* (2018). N-

- glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Transl. Med.* 16. doi: 10.1186/s12967-018-1695-0
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., *et al.* (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* 51, D418–D427. doi: 10.1093/nar/gkac993
- Peng, T., Yang, W. C., Lai, W. H., Xiong, Y. H., Wai, H., and Zhang, J. (2014). Improvement of the stability of immunochromatographic assay for the quantitative detection of clenbuterol in swine urine. *Anal. Methods* 6. doi: 10.1039/c4ay01173b
- Pérez-Molina, J. A., and Molina, I. (2017). Chagas disease. *Lancet* 391, 82–94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4
- Peever, L. M., Garcia, V., Rodeles, L. M., Mendicino, D., Vicco, M., Lagier, C., *et al.* (2018). Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology* 145, 1594–1599. doi: 10.1017/S0031182018000458
- Pinazo, M. J., Gascon, J., and Alonso-Padilla, J. (2021). How effective are rapid diagnostic tests for Chagas disease? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 19. doi: 10.1080/14787210.2021.1873130
- Pinazo, M. J., Thomas, M. C., Bustamante, J., de Almeida, I. C., Lopez, M. C., and Gascon, J. (2015). Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: State of the art and future perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110. doi: 10.1590/0074-02760140435
- Pinto, C. M., Kalko, E. K. V., Cottontail, I., Wellinghausen, N., and Cottontail, V. M. (2012). TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1328–1332. doi: 10.1016/j.meegid.2012.04.013.
- Porcino, G. N., Bladergroen, M. R., Dotz, V., Nicolardi, S., Memarian, E., Gardinassi, L. G., *et al.* (2023). Total serum N-glycans mark visceral leishmaniasis in human infections with *Leishmania infantum*. *iScience* 26. doi: 10.1016/j.isci.2023.107021
- Pouresmaeil, M., and Azizi-Dargahlou, S. (2023). Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. *Arch. Microbiol.* 205. doi: 10.1007/s00203-023-03541-9
- Qian, Y., Wang, Y., Zhang, X., Zhou, L., Zhang, Z., Xu, J., *et al.* (2013). Quantitative analysis of serum IgG galactosylation assists differential diagnosis of ovarian cancer. *J. Proteome Res.* 12. doi: 10.1021/pr4003992
- Queiroz, R. M. L., Charneau, S., Motta, F. N., Santana, J. M., Roepstorff, P., and Ricart, C. A. O. (2013). Comprehensive proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell surface proteins by two complementary methods. *J. Proteome Res.* 12, 3255–3263. doi: 10.1021/pr400110h
- Rabinovich, J. E., Wisnivesky-Colli, C., Solarz, N. D., and Gurtler, R. E. (1990). Probability of transmission of Chagas disease by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area of Santiago del Estero, Argentina. *Bull. World Health Organ.* 68, 737–746.

- Ramírez, J. C., Cura, C. I., Da Cruz Moreira, O., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., *et al.* (2015). Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from chagas disease patients. *J. Mol. Diagnostics* 17. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.010
- Ramírez, J. D., Tapia-Calle, G., Muñoz-Cruz, G., Poveda, C., Rendón, L. M., Hincapié, E., *et al.* (2014). Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect. Genet. Evol.* 22, 250–256. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.022
- Rangel-Gamboa, L., López-García, L., Moreno-Sánchez, F., Hoyo-Ulloa, I., Vega-Mémije, M. E., Mendoza-Bazán, N., *et al.* (2019). *Trypanosoma cruzi* infection associated with atypical clinical manifestation during the acute phase of the Chagas disease. *Parasites and Vectors* 12. doi: 10.1186/s13071-019-3766-3
- Rassi, A., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Rendón-Macías, M. E., and Villasís-Keever, M. Á. (2020). Phases to determine the clinical utility of diagnostic tests. *Rev. Alerg. Mex.* 67, 279–285. doi: 10.29262/RAM.V67I3.831.
- Kamada, Y., Ono, M., Hyogo, H., Fujii, H., Sumida, Y., Mori, K., *et al.* (2015). A novel noninvasive diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis using two glycomarkers. *Hepatology* 62. doi: 10.1002/hep.28002
- Ogawa, K., Kobayashi, T., Furukawa, J. ichi, Hanamatsu, H., Nakamura, A., Suzuki, K., *et al.* (2020). Tri-antennary tri-sialylated mono-fucosylated glycan of alpha-1 antitrypsin as a non-invasive biomarker for non-alcoholic steatohepatitis: a novel glycomarker for non-alcoholic steatohepatitis. *Sci. Rep.* 10. doi: 10.1038/s41598-019-56947-1
- Rafael Barboza, B., Macedo-da-Silva, J., Adrienne Mendonça Trajano Silva, L., de, V., Gomes, M., Martins Santos, D., *et al.* (n.d.). ST8Sia2 polysialyltransferase protects against infection by *Trypanosoma cruzi* 1. doi: 10.1101/2023.11.14.567071
- Risso, M. G., Garbarino, G. B., Mocetti, E., Campetella, O., González Cappa, S. M., Buscaglia, C. A., *et al.* (2004). Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J. Infect. Dis.* 189. doi: 10.1086/420831.
- Ribeiro, A. J., Silva, K. A., Lopes, L. da S., Resende, C. A. A., Couto, C. A. P., Gandra, I. B., *et al.* (2024). The use of peptides for immunodiagnosis of human Chagas disease. *Amino Acids* 56. doi: 10.1007/s00726-024-03394-6
- Ribeiro, A. L. P., Dos Reis, A. M., Barros, M. V. L., De Sousa, M. R., Rocha, A. L. L., Perez, A. A., *et al.* (2002). Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagas' disease. *Lancet* 360. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09638-1
- Ribeiro, A. L., Nunes, M. P., Teixeira, M. M., and Rocha, M. O. C. (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat. Rev. Cardiol.* 9, 576–589. doi: 10.1038/nrcardio.2012.109

- Ricci, A. D., Bracco, L., Salas-Sarduy, E., Ramsey, J. M., Nolan, M. S., Lynn, M. K., *et al.* (2023). The *Trypanosoma cruzi* Antigen and Epitope Atlas: antibody specificities in Chagas disease patients across the Americas. *Nat. Commun.* 14. doi: 10.1038/s41467-023-37522-9
- Riera, C., Verges, M., Iniesta, L., Fisa, R., Gállego, M., Tebar, S., *et al.* (2012). Short report: Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 412–416. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0111
- Royle, L., Campbell, M. P., Radcliffe, C. M., White, D. M., Harvey, D. J., Abrahams, J. L., *et al.* (2008). HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. 376, 1–12. doi: 10.1016/j.ab.2007.12.012
- Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2006). Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol. Biol.* 347. doi: 10.1385/1-59745-167-3:125
- Ruiz-Márvez, E., Ramírez, C. A., Rodríguez, E. R., Flórez, M. M., Delgado, G., Guzmán, F., *et al.* (2020). Molecular characterization of TC964, a novel antigenic protein from *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–19. doi: 10.3390/ijms21072432
- Sackett, D. L., and Haynes, R. B. (2002). Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *Br. Med. J.* 324. doi: 10.1136/bmj.324.7336.539
- Saldova, R., Asadi Shehni, A., Haakensen, V. D., Steinfeld, I., Hilliard, M., Kifer, I., *et al.* (2014). Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J. Proteome Res.* 13, 2314–2327. doi: 10.1021/pr401092y
- Sánchez, L. V., and Ramírez, J. D. (2013). Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: An overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology* 140, 147–159. doi: 10.1017/S0031182012001394
- Sánchez-Camargo, C. L., Albajar-Viñas, P., Wilkins, P. P., Nieto, J., Leiby, D. A., Paris, L., *et al.* (2014). Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J. Clin. Microbiol.* 52. doi: 10.1128/JCM.00144-14
- Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., and Reche, P. A. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J. Immunol. Res.* 2017. doi: 10.1155/2017/2680160
- Sant’Anna, C., Nakayasu, E. S., Pereira, M. G., Lourenço, D., de Souza, W., Almeida, I. C., *et al.* (2009). Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics* 9, 1782–1794. doi: 10.1002/pmic.200800730
- Santamaría, A. L., De Rissio, A. M., Riarte, A., Garavaglia, P. A., Bruballa, A. C., Rodríguez, M. A., *et al.* (2013). Use of an enzyme-linked immunosorbent assay that utilizes the Tc13Tul antigen of *Trypanosoma cruzi* to monitor patients after treatment with

- benznidazole. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.028
- Santana, R. A. G., Guerra, M. G. V. B., Sousa, D. R., Couceiro, K., Ortiz, J. V., Oliveira, M., *et al.* (2019). Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 132–135. doi: 10.3201/eid2501.180646
- Santini, A., Man, A., and Voidăzan, S. (2021). Accuracy of Diagnostic Tests. *J. Crit. care Med. (Universitatea Med. si Farm. din Targu-Mures)* 7, 241–248. doi: 10.2478/jccm-2021-0022
- Santos, E. F., Daltro, R. T., Regis-Silva, C. G., Pavan, T. B. S., de Oliveira, F. A., da Silva, Â. M., *et al.* (2023). Assessment of Cross-Reactivity of Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens with Crithidia sp. LVH-60A: Implications for Accurate Diagnostics. *Diagnostics* 13. doi: 10.3390/diagnostics13223470
- Santos, F. L. N., Celedon, P. A. F., Zanchin, N. I. T., De Arruda Campos Brasil, T., Foti, L., De Souza, W. V., *et al.* (2016a). Performance assessment of four chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic chagas disease. *PLoS One* 11, 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0161100
- Santos, F. L. N., De Souza, W. V., Da Silva Barros, M., Nakazawa, M., Krieger, M. A., and De Miranda Gomes, Y. (2016b). Chronic Chagas disease diagnosis: A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 1034–1039. doi: 10.4269/ajtmh.15-0820
- Schachter, H. (1986). Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem. Cell Biol.* 64. doi: 10.1139/o86-026
- Schijman, A. G., Alonso-Padilla, J., Longhi, S. A., and Picado, A. (2021). Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic chagas disease: From field to laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 116, 1–13. doi: 10.1590/0074-02760200444
- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M., *et al.* (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5. doi: 10.1371/journal.pntd.0000931
- Schisterman, E. F., Perkins, N. J., Liu, A., and Bondell, H. (2005). Optimal cut-point and its corresponding Youden index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology* 16, 73–81. doi: 10.1097/01.ede.0000147512.81966.ba.
- Schofield, C. J. (1981). Chagas Disease, Triatomine Bugs, and Bloodloss. *Lancet* 317, 1316. doi: 10.1016/S0140-6736(81)92487-9
- Scott, M. S., Calafell, S. J., Thomas, D. Y., and Hallett, M. T. (2005). Refining protein subcellular localization. *PLoS Comput. Biol.* 1, 0518–0528. doi: 10.1371/journal.pcbi.0010066
- Seeling, M., Brückner, C., and Nimmerjahn, F. (2017). Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat. Rev. Rheumatol.* 13. doi: 10.1038/nrrheum.2017.146

- Sergeant, E. S. G. (2018). Epitools - epidemiological calculators. *Ep. - Epidemiol. Calc.*
- Serrano, I. M., Ribeiro, G., Santos, R. S., Cruz, J. S., Lanza, F. C., Santos, E. F. dos, *et al.* (2024). IgG Isotypes Targeting a Recombinant Chimeric Protein of *Trypanosoma cruzi* in Different Clinical Presentations of Chronic Chagas Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* doi: 10.4269/ajtmh.23-0652
- Shikanai-Yasuda, M. A., and Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* 54, 845–852. doi: 10.1093/cid/cir956
- Shreffler, J., and Huecker, M. R. (2020). *Diagnostic Testing Accuracy: Sensitivity, Specificity, Predictive Values and Likelihood Ratios.*
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M. E. A., and Nussenzweig, V. (1994). Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu. Rev. Microbiol.* 48. doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002435
- Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W., and Nussenzweig, V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65. doi: 10.1016/0092-8674(91)90008-M
- Sołkiewicz, K., Krotkiewski, H., Jędryka, M., and Kratz, E. M. (2021). Variability of serum IgG sialylation and galactosylation degree in women with advanced endometriosis. *Sci. Rep.* 11. doi: 10.1038/s41598-021-85200-x
- Stagno, S., and Hurtado, R. (1971). [Congenital Chagas' disease. Immunological and diagnostic study by means of immunofluorescence with anti-IgM]. *Bol. Chil. Parasitol.* 26, 20–27.
- Stanley, P., Moremen, K. W., Lewis, N. E., Taniguchi, N., and Aebi, M. (2022). "N-Glycans,," eds. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, *et al.* (Cold Spring Harbor (NY)), 103–116. doi: 10.1101/glycobiology.4e.9
- Su, Z., Xie, Q., Wang, Y., and Li, Y. (2020). Abberant immunoglobulin g glycosylation in rheumatoid arthritis by LTQ-ESI-MS. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi: 10.3390/ijms21062045
- Talvani, A., Rocha, M. O. C., Cogan, J., Maewal, P., De Lemos, J., Ribeiro, A. L. P., *et al.* (2004). Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99. doi: 10.1590/S0074-02762004000600020
- Tavares Daltro, R., Maia Leony, L., Erdens Maron Freitas, N., Antônio Oliveira Silva, Â., Ferreira Santos, E., Pimenta Del-Rei, R., *et al.* (2019). Cross-Reactivity Using Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens: Diagnostic performance in settings where Chagas disease and American cutaneous or visceral leishmaniasis are coendemic. *J. Clin. Microbiol.* 57, 1–10. doi: 10.1128/JCM.00762-19
- Team, R. C. (2021). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found. Stat. Comput.*
- Telleria, J., Biron, D. G., Brizard, J. P., Demettre, E., Séveno, M., Barnabé, C., *et al.* (2010). Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with

- subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20411–20416. doi: 10.1073/pnas.1015496107
- Telleria, J., Tibayrenc, M., Del Salto Mendoza, M., Seveno, M., and Costales, J. A. (2023). Comparative proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* TcI lineage epimastigotes unveils metabolic and phenotypic differences between fast- and slow-dividing strains. *Exp. Parasitol.* 252. doi: 10.1016/j.exppara.2023.108576
- Telles, S., Abate, T., Slezynger, T., and Henriquez, D. A. (2003). *Trypanosoma cruzi* ubiquitin as an antigen in the differential diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 37, 23–28. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00086-5
- Thiele, C., and Hirschfeld, G. (2021). Cutpointr: Improved estimation and validation of optimal cutpoints in r. *J. Stat. Softw.* 98. doi: 10.18637/jss.v098.i11
- Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28, 85–104. doi: 10.1016/S0020-7519(97)00180-X
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- Truyens, C., Dumonteil, E., Alger, J., Cafferata, M. L., Ciganda, A., Gibbons, L., *et al.* (2021). Geographic Variations in Test Reactivity for the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Clin. Microbiol.* 59, 2–9. doi: 10.1128/JCM.01062-21.
- Tyler, K. M. M., and Engman, D. M. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 31, 472–481. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00153-9.
- Ulrich, P. N., Jimenez, V., Park, M., Martins, V. P., Atwood, J. 3rd, Moles, K., *et al.* (2011). Identification of contractile vacuole proteins in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 6, e18013. doi: 10.1371/journal.pone.0018013.
- Umezawa, E. S., and Franco Da Silveira, J. (1999). Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 285–288. doi: 10.1590/S0074-02761999000700051.
- Umezawa, E. S., Bastos, S. F., Coura, J. R., Levin, M. J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., *et al.* (2003). An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 43, 91–97. doi: 10.1046/j.1537-2995.2003.00279.x.
- Umezawa, E. S., Nascimento, M. S., Kesper, N., Coura, J. R., Borges-Pereira, J., Junqueira, A. C. V., *et al.* (1996). Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2143–2147.
- van Dijk, W., Turner, G. A., and Mackiewicz, A. (1994). Changes in glycosylation of acute-phase proteins in health and disease: Occurrence, regulation and function. *Glycosylation Dis.* 1. doi: 10.1007/BF00917463.

- van Zundert, G. C. P. P., Rodrigues, J. P. G. L. M. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastitis, P. L., Karaca, E., *et al.* (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* 428, 720–725. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.014.
- Vattepu, R., Sneed, S. L., and Anthony, R. M. (2022). Sialylation as an Important Regulator of Antibody Function. *Front. Immunol.* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.818736.
- Velásquez-Ortiz, N., Herrera, G., Hernández, C., Muñoz, M., and Ramírez, J. D. (2022). Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Sci. Data* 9, 1–8. doi: 10.1038/s41597-022-01452-w.
- Verani, J. R., Seitz, A., Gilman, R. H., LaFuentes, C., Galdos-Cardenas, G., Kawai, V., *et al.* (2009). Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 410–415. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.410.
- Verçosa, A. F. A., Lorena, V. M. B., Carvalho, C. L., Melo, M. F. A. D., Cavalcanti, M. G. A., Silva, E. D., *et al.* (2007). Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *J. Clin. Lab. Anal.* 21. doi: 10.1002/jcla.20186.
- Verhelst, X., Dias, A. M., Colombel, J. F., Vermeire, S., Van Vlierberghe, H., Callewaert, N., *et al.* (2020). Protein Glycosylation as a Diagnostic and Prognostic Marker of Chronic Inflammatory Gastrointestinal and Liver Diseases. *Gastroenterology* 158. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.060.
- Villar, S. R., Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Maza, M. C., del Moral-Salmoral, J., Gómez-Montes, M., *et al.* (2024). Discovery of circulating miRNAs as biomarkers of chronic Chagas heart disease via a small RNA-Seq approach. *Sci. Rep.* 14. doi: 10.1038/s41598-024-51487-9.
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Álvarez, M. G., *et al.* (2005). Indicadores clínicos de progresión de la miocarditis chagásica crónica. 58, 1037–1044.
- Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E., and Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell. Mol. Life Sci.* 71. doi: 10.1007/s00018-013-1491-1.
- Wang, Y., Moreira, M. da C. V., Heringer-Walther, S., Ebermann, L., Schultheiss, H. P., Wessel, N., *et al.* (2010). Plasma ACE2 Activity is an Independent Prognostic Marker in Chagas' Disease and Equally Potent as BNP. *J. Card. Fail.* 16. doi: 10.1016/j.cardfail.2009.09.005.
- Washburn, N., Schwabb, I., Ortiz, D., Bhatnagar, N., Lansing, J. C., Medeiros, A., *et al.* (2015). Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112. doi: 10.1073/pnas.1422481112
- Weinkauff, C., Salvador, R., and Pereiraperrin, M. (2011). Neurotrophin receptor Trkc is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* in neural, glial, and epithelial cells. *Infect. Immun.*

79. doi: 10.1128/IAI.05403-11

- Whiting, P. F., Davenport, C., Jameson, C., Burke, M., Sterne, J. A. C., Hyde, C., *et al.* (2015). How well do health professionals interpret diagnostic information? A systematic review. *BMJ Open* 5, 1–8. doi: 10.1136/bmjopen-2015-008155
- Whitman, J. D., Bulman, C. A., Gunderson, E. L., Irish, A. M., Townsend, R. L., Stramer, S. L., *et al.* (2019). Chagas disease serological test performance in U.S. blood donor specimens. *J. Clin. Microbiol.* 57. doi: 10.1128/JCM.01217-19
- WHO (2020). World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Fact Sheet*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- Wild, D. (2013). *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*. Newnes.
- World Health Organization (2002). Control of Chagas Disease: Second report of the WHO Expert Committee.
- World Health Organization (WHO) (2017). *Fourth WHO Report on neglected Tropical Diseases: Integrating neglected tropical diseases into global health and development*. doi: WHO/HTM/NTD/2017.01
- Xiao, Y., and Isaacs, S. N. (2012). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)-not all BSAs are alike. *J. Immunol. Methods* 384. doi: 10.1016/j.jim.2012.06.009
- Youden, W. J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3, 32–35. doi: 10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::AID-CNCR2820030106>3.0.CO;2-3
- Zhao, Y., Wei, A., Zhang, H., Chen, X., Wang, L., Zhang, H., *et al.* (2017). α 2,6-Sialylation mediates hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo by targeting the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncogenesis* 6. doi: 10.1038/oncsis.2017.40
- Zingales, B. (2017). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 184, 38–52. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.017
- Zingales, B., and Macedo, A. M. (2023). Fifteen Years after the Definition of *Trypanosoma cruzi* DTUs: What Have We Learned? *Life* 13. doi: 10.3390/life13122339
- Zrein, M., Granjon, E., Gueyffier, L., Caillaudeau, J., Liehl, P., Pottel, H., *et al.* (2018). A novel antibody surrogate biomarker to monitor parasite persistence in *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12. doi: 10.1371/journal.pntd.0006226

14. Apéndice.

Tabla 1. Genes objetivo, detalles del cebador y condiciones de la PCR. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los dominios de Tc323 en pRSET-A. Además, se detalla el número de ciclos, la longitud de los fragmentos y las condiciones del ciclado. Se incluyeron los sitios de enzimas de restricción (indicados en **negrita** y subrayado) en cada par de cebadores.

Nombre del dominio	Secuencia de los cebadores		Número de ciclos	Tamaño del fragmento	Ciclo de PCR
	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')			
Dominio 1 (D1)	GGATCCATGAGTGTTATCGTAAGAAATTCG	GAATTCCTACTCTGCAAACCCCGTGAT	30 ciclos	225 pb	95°C 5'
					94°C 30"
					58°C 1'
					72°C 2'
					72°C 10'
Dominio 2 (D2)	<u>GGATCC</u> CGTGCCATCTTGTCCTCCA	<u>GAATTC</u> CCTAACCATCGCCGCTTGGTTCG	40 ciclos	3879 pb	95°C 10'
					94°C 5'
					58°C 3'
					72°C 5'
					72°C 10'
Dominio 3 (D3)	<u>GGATCC</u> CGTGCCATCTTGTCCTCCA	<u>GAATTC</u> CCTAACCATCGCCGCTTGGTTCG	30 ciclos	240 pb	95°C 5'
					94°C 30"
					62°C 1'
					72°C 30"
					72°C 10'
Dominio 4 (D4)	<u>GGATCC</u> CGTGCCATCTTGTCCTCCAT	<u>GAATTC</u> CCTAACCATCGCCGCTTGGTTCG	35 ciclos	1022 pb	95°C 5'
					94°C 30"
					58°C 1'
					72°C 2'
					72°C 10'
					95°C 5'

Dominio 5 (D5)	<u>GGATCC</u> GAACCCATCCATGTGCAATTGTC	<u>CTCGAG</u> CTACGTCGGAACGTAAAGGACAAAG	40 ciclos	2407 bp	94°C 2'
					68°C 3'
					72°C 5'
					72°C 10'
Dominio 6 (D6)	<u>GGATCC</u> CGTGCCATCTTGTCTCCAT	<u>GAATT</u> CCTAACCATCGCCGCTTGGTTTCG	35 ciclos	1179 pb	95°C 5'
					94°C 30"
					58°C 1'
					72°C 2'
					72°C 10'

Tabla 2. Tipo de expresión, detalles del cebador y condiciones de la PCR. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del D5 en pLEXSI-Ible3. Además, se detalla el número de ciclos, la longitud de los fragmentos y las condiciones del ciclo. Se incluyeron los sitios de enzimas de restricción (indicados en **negrita** y subrayado) en cada par de cebadores.

Expresión de D5	Secuencia de los cebadores		Número de ciclos	Tamaño del fragmento	Ciclo de PCR
	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')			
Citosólica (D5-SEC)	<u>TCTAGA</u> GGCCGAACCCATCCATGTGCAATTGTC	<u>CTTAAG</u> CTGGCTCGTCGGAACGTAAAGGACAAAG	35 ciclos	2407 pb	98°C 3'
					98°C 45"
					68°C 1'
					72°C 2'
Secretoria (D5-CIT)	<u>CTCGAG</u> TCTCATGGAACCCATCCATGTGCAATTGTC	<u>CTTAAG</u> CTGGCTCGTCGGAACGTAAAGGACAAAG	35 ciclos	2407 pb	72°C 10'
					98°C 3'
					98°C 45"
					65°C 1'
					72°C 2'
					72°C 10'

Tabla 3. Índice de reactividad para la evaluación del rendimiento diagnóstico durante la Fase I. Las muestras señaladas con recuadros verdes son aquellos plasmas utilizados tanto para la evaluación diagnóstica de los antígenos derivados de Tc323 como para el análisis de N-glicoma plasmático. La información contenida en la **Tabla 3** puede ser encontrada en el siguiente enlace:

https://drive.google.com/file/d/18Hp5QqTGIr-iXwKCXzTC7wQdyDMi07EH/view?usp=drive_link

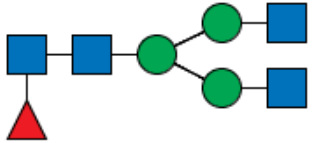
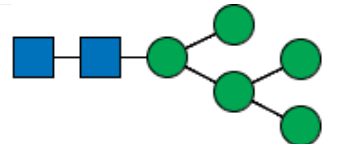
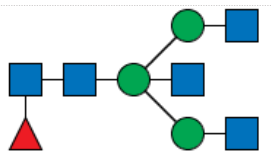
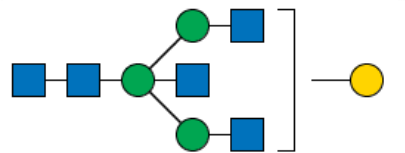
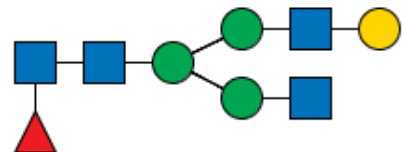
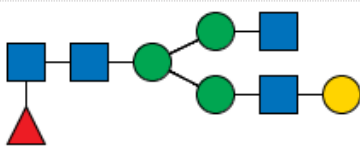
Tabla 4. Índice de reactividad para la evaluación del rendimiento diagnóstico durante la Fase II. La información contenida en la **Tabla 4** puede ser encontrada en el siguiente enlace:

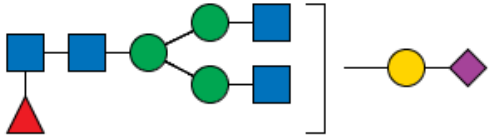
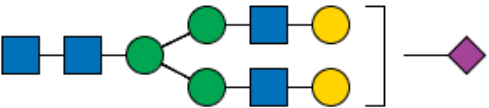
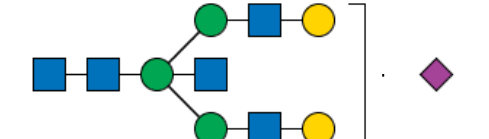
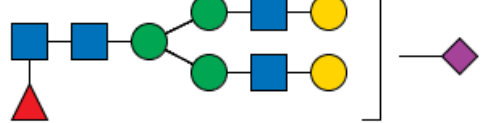
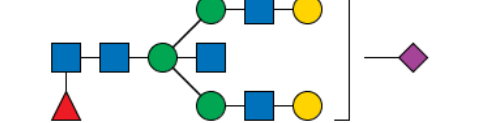
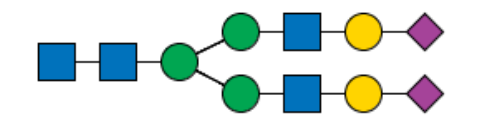
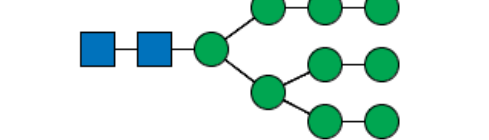
https://drive.google.com/file/d/1B7ekvil1AyidDksPIWC14wQqOayv5cyf/view?usp=drive_link

Tabla 5. Índice de reactividad para evaluación de reactividad cruzada. La información contenida en la **Tabla 5** puede ser encontrada en el siguiente enlace:

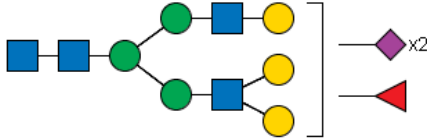
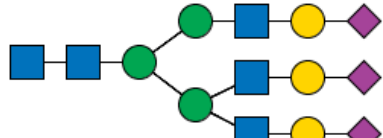
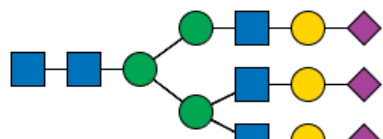
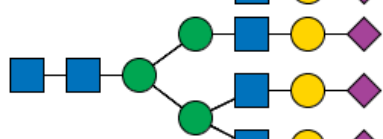
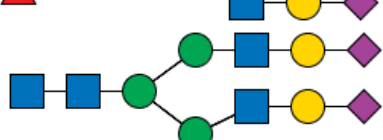
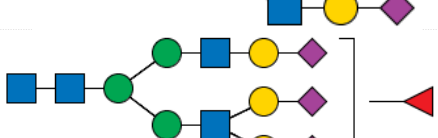
https://drive.google.com/file/d/1LxtWfsExaVM8Ru3vNiyB8Li0OOW_73MQ/view?usp=drive_link

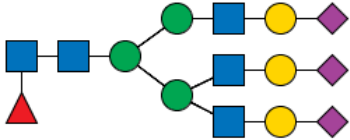
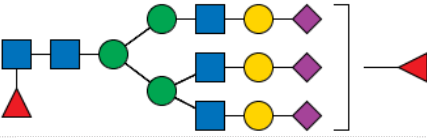
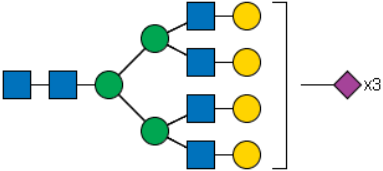
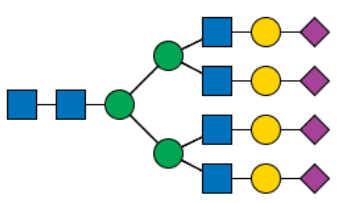
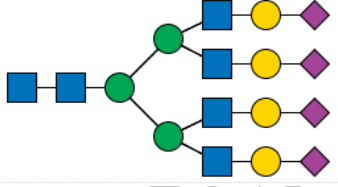
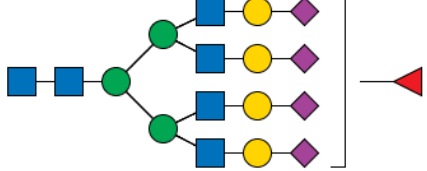
Tabla 6. Descripción detallada de los GPs correspondientes a cada proteína plasmática con sus correspondientes estructuras.

Origen	Pico de glicano	Esquema de glicano	Estructura de glicano	Descripción
Plasma	GP1		FA2	Núcleo fucosilado, di-antenario
Plasma	GP2		M5	Alta manosa
			FA2	Núcleo fucosilado, di-antenario con GlcNAc bisectante
Plasma	GP3		A2BG1	Monogalactosilado, di-antenario con GlcNAc bisectante
Plasma	GP4		FA2[6]G1	Núcleo fucosilado y monogalactosilado, di-antenario
Plasma	GP5		FA2[3]G1	Núcleo fucosilado y monogalactosilado, di-antenario

Plasma	GP13		FA2G1S1	Núcleo fucosilado, monogalactosilado y monosialilado di-antenario
Plasma	GP14		A2G2S1	Di-galactosilado y monosialilado di-antenario
Plasma	GP15		A2BG2S1	Di-galactosilado y monosialilado di-antenario con GlcNAc bisectante
Plasma	GP16		FA2G2S1	Núcleo fucosilado, bi-galactosilado y monosialilado, di-antenario
Plasma	GP17		FA2BG2S1	Núcleo fucosilado, bi-galactosilado y monosialilado, di-antenario con GlcNAc bisectante
Plasma	GP18		A2G2S2	Di-galactosilado y di-sialilado, di-antenario
Plasma	GP19		M9	Alta manosa

Plasma	GP20		A2G2S2	Di-galactosilado y di-sialilado, di-antenario
Plasma	GP21		A2G2S2	Di-galactosilado y di-sialilado di-antenario
Plasma	GP22		FA2G2S2	Núcleo fucosilado, di-galactosilado y di-sialilado di-antenario
Plasma	GP23		FA2BG2S2	Núcleo fucosilado, di-galactosilado y di-sialilado di-antenario con GlcNAc bisectante
Plasma	GP24		A3G3S2	Tri-galactosilado y di-sialilado tri-antenario
Plasma	GP25		A3G3S2	Tri-galactosilado y di-sialilado tri-antenario
Plasma	GP26		A3G3S2	Tri-galactosilado y di-sialilado tri-antenario

Plasma	GP27		A3F1G3S2	Antenarrio fucosilado, tri-galactosilado y di-sialilado tri-antenarrio
Plasma	GP28		A3G3S3	Tri-galactosilado y tri-sialilado tri-antenarrio
Plasma	GP29		A3G3S3	Tri-galactosilado y tri-sialilado tri-antenarrio
Plasma	GP30		A3G3S3	Tri-galactosilado y tri-sialilado tri-antenarrio
Plasma	GP31		FA3G3S3	Núcleo fucosilado, tri-galactosilado y tri-sialilado, tri-antenarrio
Plasma	GP32		A3G3S3	Tri-galactosilado y tri-sialilado tri-antenarrio
Plasma	GP33		A3F1G3S3	Antenarrio fucosilado, tri-galactosilado y tri-sialilado tri-antenarrio

Plasma	GP34		FA3G3S3	Núcleo fucosilado, tri-galactosilado y tri-sialilado, tri-antenario
Plasma	GP35		FA3F1G3S3	Núcleo y antenarrio fucosilado, tri-galactosilado y tri-sialilado tri-antenario
Plasma	GP36		A4G4S3	Tetra-galactosilado y tri-sialilado, tetra-antenario
Plasma	GP37		A4G4S4	Tetra-galactosilado y tetra-sialilado tetra-antenario
Plasma	GP38		A4G4S4	Tetra-galactosilado y tetra-sialilado tetra-antenario
Plasma	GP39		A4F1G4S4	Antenarrio fucosilado, tetra-galactosilado y tetra-sialilado tetra-antenario

			A4F2G4S4	Antenarrio di-fucosilado, tetra-galactosilado y tetra-sialilado tetra-antenarrio
			A4G4LacS4	Tetra-galactosilado y tetra-sialilado, tetra-antenarrio con una extensión de lactosamina

Tabla 7. Abundancia relativa de los glicanos GP32-34 expresado como porcentaje del área integrada total.

GP32	GP33	GP34	Cohorte
2.11	3.21	0.42	G0
0.79	8.81	3.48	G0
2.7	1.18	2.24	G0
1.97	1.25	0.74	G0
4.59	6.67	1.08	G0
0.38	4.5	5.62	G0
2.92	6.01	1.69	G0
1.25	2.65	3.13	G0
1.35	3.42	0.85	G1
0.38	4.08	0.33	G1
0.91	1.12	2.41	G1
0.64	4.46	5.4	G1
5.91	1.05	2.12	G1
4.64	1.75	1.49	G1
3.79	1.16	2.25	G1
0.78	3.95	2.14	NI
1.51	8.86	5.36	NI
0.59	2.86	0.9	NI
5.62	1.8	1.96	NI
6.26	3.61	0.94	NI
1.18	4.77	0.37	NI
4.26	3.61	0.94	NI
3.26	2.2	1.06	NI

Tabla 8. Abundancia relativa de los glicanos GP3-34 expresado como porcentaje del área integrada total.

S3.1	S3.2	S4.1	S4.2	S4.3	S4.4	Cohorte
1.98	6.47	0.47	0.69	1.77	0.18	G0
4.84	3.72	0.51	0.01	1.00	1.36	G0
4.94	3.65	0.26	0.35	0.91	1.30	G0
4.26	3.14	1.26	0.65	1.20	2.30	G0
4.40	3.75	0.56	0.60	1.03	1.51	G0
4.13	4.22	0.93	0.51	0.52	1.33	G0
5.13	2.94	1.09	0.47	0.86	1.43	G0
5.31	3.53	0.59	0.51	0.60	0.61	G0
5.09	3.66	0.13	0.56	1.09	0.72	G1
4.66	3.65	0.34	0.46	0.90	1.66	G1
4.84	3.76	0.84	0.36	0.52	1.07	G1
5.07	3.02	1.06	1.20	0.61	0.96	G1
3.85	4.55	0.25	0.61	1.83	0.03	G1
4.87	3.66	0.43	0.34	0.86	1.31	G1
4.65	3.33	1.12	0.50	0.94	1.47	G1
2.84	5.71	0.59	0.83	1.32	0.15	NI
3.89	4.20	0.63	0.49	0.98	1.70	NI
5.27	3.44	0.38	0.48	0.63	1.05	NI
4.21	3.20	2.51	0.51	0.60	1.56	NI
4.31	3.10	1.68	0.60	0.80	2.00	NI
4.27	3.21	2.51	0.51	0.60	1.56	NI
4.37	2.81	1.83	1.56	2.00	0.17	NI
2.78	3.38	2.41	0.97	1.53	2.78	NI