



Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina

“López Neyra” CSIC

Identificación y caracterización de biomarcadores de patología de la enfermedad de Chagas y de eficacia del tratamiento con benznidazol.

Directores de Tesis:

Dra. M^a Carmen Thomas Carazo Dra. Concepción Marañón Lizana

Dr. Manuel Carlos López López

Memoria presentada por la licenciada Ana Isabel Fernández Villegas
para optar al grado de Doctor.

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ana Isabel Fernández Villegas
D.L.: GR 213-2013
ISBN: 978-84-9028-323-3

A mi familia

La doctoranda Ana Isabel Fernández Villegas y los directores de la tesis M^o Carmen Thomas Carazo, Concepción Marañón Lizana y Manuel Carlos López López Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 15 de junio 2012

Directores de la Tesis

Fdo.: Carmen Thomas
López

Fdo.: Concepción Marañón

Fdo: Manuel Carlos

Aspirante

Fdo.: Ana Isabel Fernández Villegas

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis Directores de tesis Dra. Carmen Thomas, Dra. Concepción Marañón y Dr. Manuel Carlos López por confiar en mí desde el primer momento, ofrecerme su ayuda en este camino de la ciencia, por mostrarme su apoyo en momentos de desazón, por enseñarme a esquivar los obstáculos y por haber participado día a día en que uno de mis sueños se cumpliera.

En segundo lugar, agradecer a cada uno de mis compañeros de laboratorio por colaborar a que el desarrollo de esta tesis fuera en un ambiente agradable. Gracias a Adriana, Agustina, Darién, Almudena, Bea, Paco, Patrí y Kiko y los que durante el desarrollo de esta tesis estuvieron como Marta, Laura, Ana, Zoraída, Paula, Daní, Marjorie y Arturo. Por supuesto a todo el personal del instituto, compañeros de otros laboratorios y servicios generales.

En tercer lugar, quería agradecerle al personal del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia y al Hospital Clínic de Barcelona por enlazar investigación científica y clínica.

En cuarto lugar, me gustaría mencionar a la gente que me acompañan desde hace muchos años y que aparte de la ciencia hacen que mi vida sea muy divertida y alegre, como Sonia, Eva, Yolí, Bea y Lidia. A Manu por animarme a perseguir mis ilusiones y ser mi mejor amigo.

Por último, y no por ello menos importante, me gustaría agradecer a mi familia muy en especial a mi madre Carmen y a mi padre Miguel por su cariño incondicional y por creer siempre en mí. A mi hermana Gloria, a Francis y a mi sobrina Glorilla por escucharme y acompañarme siempre sin dudar. A mi hermano Miguel, por su paciencia y ayudarme con “mis problemas informáticos”.

GRACIAS

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana es causada por el protozoo flagelado hematófilo *Trypanosoma cruzi*. Esta zoonosis es endémica del continente americano. Se estima que existen entre 8 y 10 millones de personas infectadas en el mundo y que cerca de 40 millones están en riesgo de infectarse (Schofield and Galvao, 2009) (Coura and Dias, 2009). La enfermedad presenta unos elevados índices de mortalidad y morbilidad con trastornos cardiacos y digestivos. Actualmente, debido a los movimientos migratorios, la enfermedad de Chagas está presente en zonas no endémicas, donde la transmisión por transfusión sanguínea, trasplantes de órganos y vía transplacentaria resultan en un alto número de nuevos casos (Wendel, 2010), (Barcan et al., 2005; Carrilero et al., 2009).

La enfermedad cursa con diferentes fases; una fase aguda subclínica en la mayoría de los casos, que ocasiona la muerte en el 10% de los pacientes. A la fase aguda le sigue una fase indeterminada inaparente y una fase crónica (40% de los pacientes) en la que el parásito persiste en tejidos profundos y a la que se le asocian altas tasas de mortalidad y morbilidad. A lo largo de la fase crónica, pueden aparecer sintomatología cardiaca y/o trastornos digestivos. En fases avanzadas, la enfermedad crónica de Chagas puede causar la muerte (Prata, 2001; Punukollu et al., 2007).

Los dos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Benznidazol y el Nifurtimox. Ambos fármacos presentan diversos efectos secundarios, como fiebres, dolores musculares, pérdida de peso, reacciones cutáneas. En la fase inicial aguda, la administración de estos medicamentos ayuda a controlar la enfermedad y disminuye la probabilidad de cronicidad (Jannin and Villa, 2007), pero en fases crónicas su efectividad no está firmemente demostrada. Estudios previos han indicado que el tratamiento con benznidazol en pacientes asintomáticos retrasa la aparición de daños cardiacos (Gallerano and Sosa, 2000; Viotti et al., 1994).

Actualmente, las pruebas serológicas más utilizadas para el diagnóstico de Chagas son el ensayo de hemaglutinación (IHA), el ensayo de inmunofluorescencia (IFI) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los antígenos que contienen estos tests son extractos de proteínas totales del parásito o una combinación de proteínas recombinantes del mismo (Britto et al., 2001; Viotti et al., 2006). Estas técnicas son capaces de detectar la respuesta de anticuerpos producida frente a las proteínas de parásitos en sueros de pacientes de Chagas,

aunque nos son útiles para diferenciar si el paciente se encuentra en fase indeterminada o en fase crónica de la enfermedad, resultando poco útiles para evaluar la progresión de pacientes bajo tratamiento, ya que los anticuerpos son muy estables y persisten durante mucho tiempo (WHO, 2002). Por tanto, las pruebas serológicas convencionales no permiten detectar la evolución de respuesta tras el tratamiento y por tanto reconocer fallos terapéuticos.

Debido a la importancia y necesidad de evaluar el estado de la enfermedad de pacientes de Chagas, tanto la fase de la enfermedad como durante el seguimiento tras el tratamiento con benznidazol, se propusieron como objetivos, por una parte la búsqueda de moléculas capaces de discernir entre fases de la enfermedad de Chagas y, por otra parte, encontrar marcadores susceptibles de ser sensibles al tratamiento con benznidazol los cuales proporcionarían un valor predictivo del estado en el que se encuentra el paciente.

Con los resultados descritos a lo largo de este trabajo hemos podido establecer un biomarcador de la enfermedad de Chagas capaz de distinguir entre la fase crónica asintomática y fase crónica sintomática (manifestaciones cardíacas o trastornos digestivos). Por otra parte, se han identificado un sistema de marcadores serológicos útiles para evaluar la modificación de la respuesta inmunitaria adaptativa en pacientes de Chagas tratados con benznidazol. Y, por último, se presenta la aplicación de los marcadores serológicos anteriormente mencionados en un caso clínico de dos mellizos infectados con *Trypanosoma cruzi* vía congénita en una zona no endémica como es España.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE TRIPANOSOMÁTIDOS.....	3
1.1.1 Clasificación filogenética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.1.3 Diversidad genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> Y LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	6
1.2.1 Vías de transmisión	7
1.2.2 Fases y formas clínicas de la enfermedad	12
1.2.3 Diagnóstico de la enfermedad	16
1.2.4 Epimediología y control vectorial	18
1.2.5 Tratamiento para la enfermedad de Chagas	20
1.3 RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	23
1.3.1 Respuesta inmunitaria innata en <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
1.3.2 Respuesta inmunitaria adaptativa.....	31
1.4 BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	41
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 MATERIALES	51
3.2 MÉTODOS.....	57
4. RESULTADOS	71
4.1 SHORT-TERM FOLLOW-UP OF CHAGASIC PATIENTS AFTER BENZNIDAZOLE TREATMENT USING MULTIPLE SEROLOGICAL MARKERS.	73
4.2 CHARACTERIZATION OF AN IMMUNODOMINANT ANTIGENIC EPI TOPE FROM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> AS A BIOMARKER OF CHRONIC CHAGAS' DISEASE PATHOLOGY.....	79
4.3 NUEVOS INDICADORES SEROLÓGICOS.....	85
5. DISCUSIÓN	93
5.1 BIOMARCADOR DE PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN ESTADIO CRÓNICO.	94
5.2 MARCADORES SEROLÓGICOS ÚTILES PARA LA EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	98

5.3 APLICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES	103
5.4 CLINICAL CASE OF CONGENITAL TRANSMISSION OF CHAGAS DISEASE IN SPAIN: APLICACIÓN CLÍNICA DE LOS MARCADORES SEROLÓGICOS.....	105
6.CONCLUSIONES	115
7. ANEXOS	119
7.1 TITLE: CLINICAL CASE OF CONGENITAL TRANSMISSION OF CHAGAS DISEASE IN SPAIN.....	121
7.2 PATENTES DESARROLLADAS EN DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL	131
8. BIBLIOGRAFÍA	135

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE TRIPANOSOMÁTIDOS

1.1.1 Clasificación filogenética de *Trypanosoma cruzi*

Los tripanosomátidos son protozoos flagelados pertenecientes al orden Kinetoplastida. Este grupo de parásitos se distingue por presentar una sola mitocondria de gran tamaño, llamada kinetoplasto, situada adyacente al cuerpo basal del flagelo y cuyo ADN (ADNk) consiste en miles de copias de minicírculos y algunas copias de maxicírculos interconectados topológicamente formando una red (Simpson et al., 1987). El ADNk supone un 10-30% del ADN total dependiendo de la especie, y su replicación se inicia casi simultáneamente a la replicación de ADN nuclear sugiriendo que las fases de la síntesis de ADN en el núcleo y en la mitocondria están reguladas coordinadamente (Pasion et al., 1994).

A este orden pertenece la familia Trypanosomatidae que incluye especies de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. Los tripanosomátidos tiene un único flagelo y todos los géneros son parásitos de vertebrados e invertebrados. A diferencia de ellos, la familia Bodonidae, también incluida en este orden, engloba especies de vida libre. De hecho, diversas aproximaciones han sugerido que el ancestro común de todos los kinetoplástidos fue de vida libre (Wright et al., 1999).

Dentro de los kinetoplástidos se reconocen dos tipos de relaciones parásito-hospedador: i) kinetoplástidos monogénicos, que parasitan un solo hospedador invertebrado, y (ii) kinetoplástidos digénicos, que parasitan a dos hospedadores, normalmente uno invertebrado y otro vertebrado. Las especies monogénicas son “*tripanosomátidos inferiores*” y se postula que los géneros digénicos como *Leishmania* y *Trypanosoma* provienen de un ancestro monogénico (Lake et al., 1988). Sin embargo, el desarrollo del estilo de vida del parasitismo digénico ha sido objeto de controversia durante el siglo XX. Las dos teorías opuestas pueden resumirse en “primero invertebrado” o “primero vertebrado”, dependiendo de cuál fue el hospedador original del parasitismo monogénico. Las nuevas filogenies moleculares en el género *Trypanosoma* son compatibles con ambas hipótesis, ya que tanto el género *Trypanosoma* como la rama conductora de los parásitos

monogénicos surgen de la raíz del árbol filogenético de tripanosomátidos (Stevens et al., 2001), apareciendo así el género *Trypanosoma* como uno de los “tripanosomátidos inferiores”. Hoare (1972), divide a los tripanosomas en dos secciones: stercoraria y salivaria; dependiendo del lugar donde se desarrollan en el vector invertebrado, perteneciendo la especie *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) a la sección stercoraria.

1.1.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El hospedador vertebrado del parásito *T. cruzi* puede ser el hombre, también animales salvajes o domésticos, que actúan como reservorios. El hospedador pertenece a la familia Reduviidae (Hemiptera, Heteroptera) que actúa como vector transmisor de la enfermedad. Este parásito pasa por tres estadios morfológicos: la forma amastigote no flagelada, y las formas flageladas epimastigote y tripomastigote, esta última no replicativa. La forma epimastigote prolifera en el insecto vector y, eventualmente, se diferencia para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, con capacidad infectiva. Cuando un insecto infectado con el parásito pica a un hospedador vertebrado dichas formas vehiculizadas en las heces u orina pueden infectar al hospedador entrando a través de heridas en la piel, provocadas por la erosión que se produce al rascarse la picadura, o a través de mucosas. Una vez en el torrente sanguíneo del hospedador, los tripomastigotes son capaces de infectar a cualquier tipo celular: macrófagos, fibroblastos, células del sistema nervioso y muscular, etc (Burleigh and Andrews, 1995). Dentro de la célula infectada el tripomastigote se transforman a forma amastigote replicativas las cuales, tras varios ciclos de división, se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que son liberados tras la rotura de la célula hospedadora, pudiendo alcanzar el torrente sanguíneo e infectar otras células (Fig 11). Las formas tripomastigotes son una población pleomórfica, con dos morfologías básicas descritas como “*slender*” y “*broad*”. Se ha sugerido que las formas “*slender*” son las principales responsables de la infección en las células del hospedador vertebrado mientras que las formas “*broad*” tiene una mayor capacidad para infectar al hospedador invertebrado (Tyler and Engman, 2001). Las formas “*slender*” pueden invadir nuevamente células de forma similar a los tripomastigotes metacíclicos. La ingestión de los tripomastigotes sanguíneos por parte del insecto vector (*Rhodnius*, *Triatoma*, *Panstrongylus* etc.) y mediante la picadura a un hospedador infectado, permite que se complete el ciclo

de vida del parásito. Así, en el tracto gastrointestinal del insecto, el parásito se diferencia a la forma replicativa epimastigotes. Tras dividirse repetidamente por un proceso de fisión binaria se transforma en el recto en la forma tripomastigote metacíclico que será eliminada en las heces pudiendo infectar a un nuevo hospedador vertebrado. *T. cruzi* posee una gran capacidad de adaptación para sobrevivir en las diferentes condiciones externas, como cambios de pH y temperatura, que requiere en su ciclo de vida.

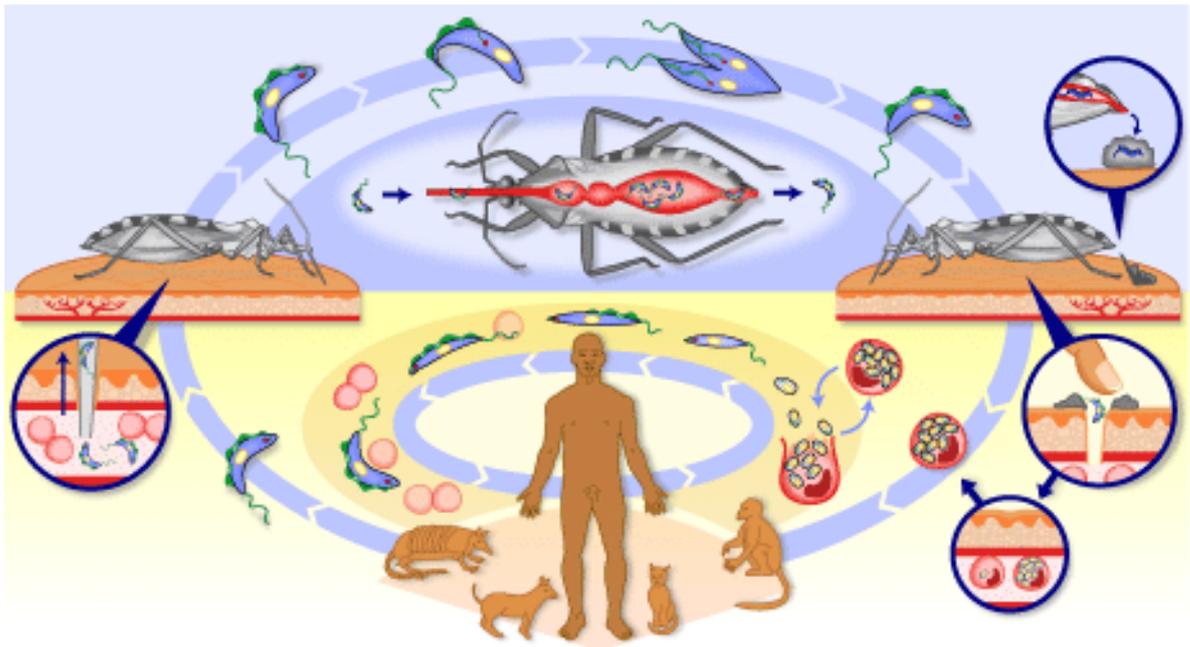


Figura 11. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se observa la diferenciación de formas epimastigotes a tripomastigotes en el intestino del insecto vector. En el hospedador vertebrado estos tripomastigotes se diferencian a amastigotes, formas replicativas que tras varios ciclos de división vuelven a diferenciarse a tripomastigotes.

1.1.3 Diversidad genética de *Trypanosoma cruzi*

La gran diversidad genética de *T. cruzi* ha sido demostrada mediante marcadores enzimáticos, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADNk y del ADN nuclear, diversidad en el número de cromosomas y en el tamaño del genoma, y mediante el análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) (Devera et al., 2003). En un principio, se aceptaba que *T. cruzi* tenía una estructura poblacional clonal (Tibayrenc et al., 1990) y su alta variabilidad genética y biológica se atribuía a una evolución independiente de dichas poblaciones clonales (Tibayrenc and Breniere,

1988). Sin embargo, con el transcurso del tiempo, han ido incrementándose las evidencias de intercambio genético entre las diferentes cepas del parásito que han contribuido a la actual estructura poblacional (Sturm and Campbell, 2009). Inicialmente, se describió la existencia de cepas híbridas de *T. cruzi* y, posteriormente, se demostró experimentalmente el intercambio genético al producir clones híbridos (Gaunt et al., 2003). Actualmente ha sido propuesto que la estructura poblacional que presenta el parásito puede ser el producto de dos a múltiples eventos de hibridación no meiótica entre las diferentes cepas (Westenberger et al., 2005), (Carranza et al., 2009).

Debido a los nuevos avances en el conocimiento de la diversidad de *T. cruzi*. Las diferentes cepas han sido recientemente clasificadas en seis “discrete typing units” o DTU (TcI-VI). Las DTU se definen como una agrupación de cepas que comparten características en su genotipo y que son identificables por marcadores genéticos; moleculares o inmunológicos comunes (Zingales et al., 2009; Zingales et al., 2012). Tc I está principalmente asociado con el ciclo de transmisión selvática, parece ser menos resistente al medicamento y está asociada con enfermedad humana en todos los países de la cuenca de la Amazonia, mientras Tc II se ha relacionado con el ciclo doméstico a lo largo de los países del sur, parece ser más resistente a los tratamientos y, al menos en Brasil y Argentina, ha sido relacionada con daño tisular causado por la enfermedad de Chagas. La técnica que se emplea actualmente para el genotipado de los diferentes aislados de *T. cruzi* consiste en una amplificación mediante PCR de secuencias de genes codificantes del ARNr 24S α , ARN 18S y mini-exon (Araujo et al., 2010).

1.2 TRYPANOSOMA CRUZI Y LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

T. cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, patología descrita a principios de siglo por Carlos Chagas (Chagas, 1909) que afecta a más de 8 millones de personas en América Central y Sudamérica (Schofield and Galvao, 2009),(Rassi et al., 2010). Esta patología crónica presenta elevados índices de morbilidad y mortalidad, así como una clara disminución tanto de la calidad de vida, como de la productividad laboral. La existencia de animales peridomésticos infectados es lo que contribuye a la transmisión vectorial de la infección.

1.2.1 Vías de transmisión

La principal vía de contagio de la enfermedad de Chagas es la vía vectorial, seguida de congénita, transfusional, la causada por transplante de órganos infectados y accidentes de laboratorio. Recientemente, la transmisión vía oral, ya descrita por Carlos Chagas, está tomando importancia debido al registro de diversos brotes (Fig I2) (Pereira et al., 2009).

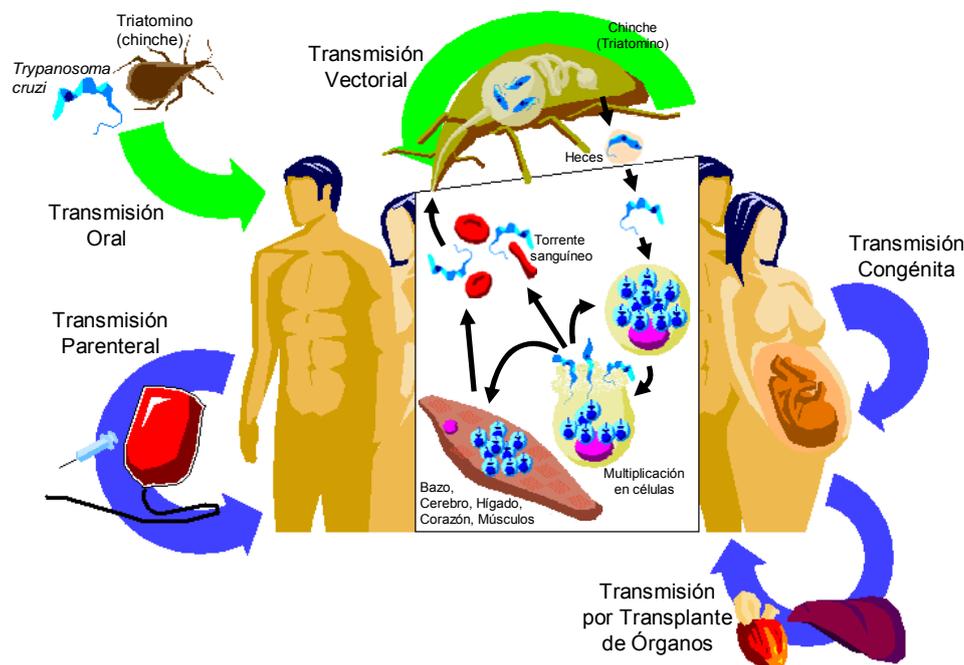


Figura I2. Vías de transmisión de *T. cruzi*.

- ★ Transmisión vectorial: *T. cruzi* infecta al humano y a más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos), peridomésticos (ratas, ratones, cobayas) y mamíferos salvajes (armadillos, roedores y marsupiales) a través de vinchucas de la familia de Triatominae en los tres ciclos posibles: domésticos, peridoméstico y silvático. Aunque existen más de 130 especies de triatomíneo solo un grupo de ellas son identificadas como vectores competentes para *T. cruzi* (Lent et al., 1979), (Galvão et al., 2003; Zingales et al., 2012) (Fig I3). Las especies de vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al humano son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* (WHO, 2002), (Zeledon and Rabinovich, 1981). *T. infestan* es el vector más importante y el vector primario en regiones endémicas del sur de Sudamérica.

R. Prolixus es encontrada en el norte de Sudamérica y Centroamérica. *T. dimidiata* ocupa un área similar a *R. Prolixus* y se extiende por el norte de Sudamérica hasta México. Los triatomíneos tienen cinco estados de ninfa y adultos de ambos sexos, todos pueden portar y transmitir *T.cruzi*. La probabilidad de que un triatomíneo se infecte con *T. cruzi* aumenta con el número de veces que haya succionado sangre así que, en fases más tardías y en adultas tienen la tasa de infección más alta.

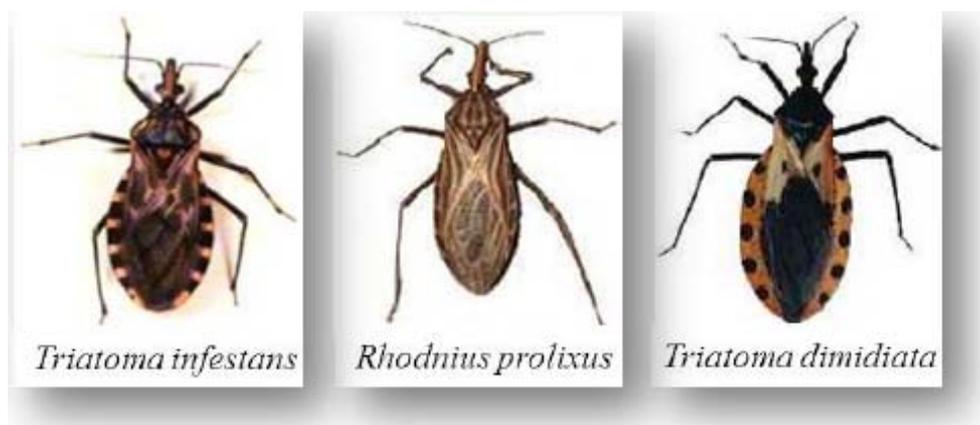


Figura 13. *Triatoma infestans*, *Rhodnius Prolixus* y *Triatoma Dimidiata*

- ★ Transmisión congénita: la enfermedad de Chagas se transmite de la madre infectada al hijo durante el embarazo o parto. Este tipo de transmisión presenta diferencias importantes según la parte geográfica en la que ocurra dependiendo de si la zona es endémica o no endémica de *T.cruzi*. La tasa de transmisión varía de 0,1-17,0% en zonas endémicas (Torrico et al., 2004), (Brutus et al., 2007),(Hermann et al., 2004),(Sosa-Estani et al., 2009) y de 0,0-7,6% en zonas no endémicas (Martinez de Tejada et al., 2009),(Munoz et al., 2009),(Paricio-Talayero et al., 2008),(Gonzalez-Granado et al., 2009). Las diferencias encontradas en la tasa de transmisión respecto ala área geográfica podrían explicarse considerando:
 - factores maternos: fase de la enfermedad de la madre, carga parasitaria, estado inmunológico y embarazos anteriores.
 - factores del parásito: cepa de *T. cruzi* o carga parasitaria.
 - la sensibilidad y especificidad de las técnicas de laboratorio usadas para el diagnóstico de recién nacidos

Actualmente, no se conocen los mecanismos fisiológicos de la transmisión vía congénita (WHO, 2002),(Shippey et al., 2005). Algunos autores sugieren que el parásito alcanza al feto a través de la placenta (Nisida et al., 1999),(Carlier, 2005). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la infección no es todavía claro. Se piensa que la infección vertical de la enfermedad de Chagas es una consecuencia de una interacción compleja entre la respuesta inmunitaria de la madre, factores de la placenta y características del parásito (Carlier, 2005),(Burgos et al., 2007).

Se postula que durante la transmisión congénita, los tripomastigotes del torrente sanguíneo de la madre atraviesan la placenta. Estos tripomastigotes comienzan a infectar células que constituyen tejidos y membranas entre la madre y el feto. Una vez en el interior de las células se diferencian a amastigotes que proliferan y tras un número de ciclos de replicación los amastigotes se diferencian de nuevo a tripomastigotes, que pueden invadir a capilares fetales e incluso alcanzar al feto (Junqueira and Soares, 2002). La invasión de la placenta por tripomastigotes podría ocurrir después de la semana 20 de gestación debido a que a partir de ese momento la placenta sufre una serie de transformaciones fisiológicas y metabólicas que favorecen la invasión de patógenos (Desai et al., 2007),(Rocha et al., 2004). Paralelamente a estas hipótesis existe también la posibilidad de que la transmisión ocurra en el momento del parto.

Se desconoce el número exacto de caso de Chagas congénito en países no endémicos. Los primeros casos de Chagas congénito aparecen en la primera década de este siglo. Así, un caso asintomático se publicó en Suecia, dos más en Suiza y siete casos congénitos en España, de los cuales dos de ellos presentaron Chagas congénito con sintomatología. (Martinez de Tejada et al., 2009),(Munoz et al., 2007),(Riera et al., 2006),(Pehrson et al., 1981),(Flores-Chavez et al., 2008a),(Carrilero et al., 2009). La tasa de transmisión vertical en zonas no endémicas, está subestimada debido a que la mayoría de los neonatos infectados son asintomáticos en el momento del parto.

- ★ Transmisión por transfusión sanguínea: En España, y en países no endémicos esta es una de las principales vías de transmisión del parásito. La sangre del donante infectado es incorporada en forma directa al torrente circulatorio del receptor sano, cuyas manifestaciones clínicas pueden aparecer tras 30 a 40 días después de la transfusión.

La transfusión sanguínea ha sido una de las principales vías de transmisión de la enfermedad, en regiones donde la percepción de la enfermedad no está muy desarrollada. La detección del parásito en sangre en pacientes que se mantienen en fase crónica asintomática es complicada debido a la baja tasa de parásito en sangre (Wendel, 2010). En pacientes crónicos infectados con *T. cruzi* existe menos de un tripanosoma por 20 ml de sangre total y por tanto, el hemocultivo no es una herramienta factible y eficaz en muchos casos. Sin embargo, se ha descrito que los parásitos de *T. cruzi* son estables en sangre y plasma durante al menos 30 días cuando se conservan a 4°C y durante periodos más extensos si la muestra es congelada (Schmunis, 1991). Además, los anticuerpos frente a *T. cruzi* aparecen a las 4-8 semanas tras la infección y persistente hasta que el parásito es erradicado. Por tanto, en países no endémicos, se han introducido tests serológicos obligatorio en grupos de riesgo para evitar la transmisión del parásito por esta vía.

Los primeros individuos infectados en zona no endémica (Estados Unidos) fueron emigrantes procedentes de Centro y Sudamérica (Grant et al., 1989), (Nickerson et al., 1989).

En muchos países europeos, donde previamente, la enfermedad prácticamente era desconocida, la detección de la enfermedad de Chagas se ha convertido en una consulta frecuente, especialmente en las unidades medicina tropical y del viajero. (Lescure et al., 2008), (Jackson et al., 2010), (Munoz et al., 2009), (Schmunis and Yadon, 2010).

España, uno de los países con la tasa de inmigración más alta, se han registrados varios casos de transmisión por transfusión sanguínea, en diferentes puntos del país (Perez de Pedro et al., 2008), (Flores-Chavez et al., 2008b). Debido al aumento del flujo migratorio de personas procedentes de países endémicos a España, se ha elaborado un Real Decreto por el Ministerio de Salud que especifica la exclusión o análisis exhaustivo de sangre de donantes nacidos en zonas endémicas, niños y nietos de madres nacidas en los países mencionados anteriormente o donantes que hayan residido o hayan sido transfundidos en zonas endémicas. (Castro, 2009)

★ Transmisión por trasplante de órganos: El órgano de un donante infectado es trasplantado a un receptor no infectado, aumentando el riesgo de transmisión y severidad con la inmunosupresión requerida por ese procedimiento.

La transmisión de *T. cruzi* vía trasplante de órganos ha sido descrita en países endémicos (Brasil, Argentina) (Silva et al., 2010), (Altclas et al., 1999), (de Faria

and Alves, 1993) y en países no endémicos como Estados Unidos como California, Texas (Kun et al., 2009),(Cimo et al., 1993), países de Europa como España y Suiza. (Villalba et al., 1992),(Jackson et al., 2011).

Se ha descrito la transmisión por trasplante de hígado en el 35% de pacientes inicialmente seronegativos para la enfermedad de Chagas (35%). (Barcan et al., 2005).

Hasta la fecha, no existe un acuerdo mundial para determinar si un órgano de un paciente de Chagas es considerado apto o no para un receptor, por lo que cada país establece sus normas. En el caso que se decida realizar el trasplante de un paciente de Chagas a un receptor, el receptor deberá ser sometido a un seguimiento de la posible infección, así como suministrar el tratamiento, en caso de que sea necesario.

★ Transmisión por vía oral: Se ha documentado la transmisión oral de la enfermedad de Chagas tras la ingestión de alimentos contaminados con triatomínicos infectados o sus excretas. Según los estudios desarrollados por Schenone y col (Schenone et al., 1982) se considera la transmisión oral de *T. cruzi*, como parte habitual del ciclo del parásito, a través de la ingestión por mamíferos susceptibles de vectores portadores del parásito o de sus deyecciones, así como de reservorios infectados.

Se estima que, la máxima capacidad infectiva por vía oral es producida por la forma tripomastigote metacíclico del parásito, presente en las deposiciones de los triatomínicos. Esta forma celular sería resistente a la actividad proteolítica de la mucosa gástrica y tendría la capacidad de adherirse a ella y traspasarla. (Neira et al., 2003)

Se postula que la capacidad de infectar las mucosas de la vía digestiva deriva de la presencia de una glicoproteína específica del estadio metacíclico del parásito, la gp82. Esta es una molécula de adhesión que se une a las células epiteliales en un mecanismo mediado por receptor e induce la movilización de Ca^{2+} , esencial para el ingreso del parásito a la célula (Ruiz et al., 1998) (Neira et al., 2003). Distintas cepas de *T. cruzi*, en su estadio metacíclico, presentan esta glicoproteína en su superficie. (Yoshida, 2006)

La proteína gp30 que se caracteriza porque presenta gran capacidad de infectar células *in vitro* pero baja afinidad por la mucina gástrica; en consecuencia, es poco efectiva *in vivo*. (Yoshida, 2008),(Cortez et al., 2006).

Por último la gp90, la cual se comporta como modulador negativo de infectividad de células *in vitro* (Covarrubias et al., 2007). Siendo por tanto, un

factor determinante en la capacidad infectiva por vía oral del parásito. Ya que gp90 procedente de vía oral mostró alta capacidad de infectar ratones vía oral y baja capacidad de infectar células *in vitro* y además era muy susceptible a la proteólisis por jugos gástricos en comparación a cepas obtenidas de *Triatoma infestans* o transmitida por marsupiales (Covarrubias et al., 2007).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se rechaza por exclusión en brotes en los que se descarta la transmisión por los mecanismos tradicionales. El aumento de casos de enfermedad de Chagas transmitida vía oral podría deberse a la mayor capacidad de diagnóstico epidemiológico permitiendo caracterizar casos y brotes o a la mayor visibilidad de la transmisión oral, debido a la disminución de los otros mecanismos de contagio, principalmente el vectorial y vía transfusión o transplante. (OPS/OMS, 2006)

- ★ Transmisión por accidentes de laboratorio: Se produce de forma accidental cuando cultivos, muestras infectadas de pacientes y animales con infección aguda entran en contacto con tejidos expuestos del manipulador (Hofflin et al., 1987). Generalmente se produce en centros en los que se realiza una inadecuada manipulación de material infectado, por personal no capacitado, o debido a que no se manejan las normas de bioseguridad propias de cada laboratorio.

1.2.2 Fases y formas clínicas de la enfermedad

La enfermedad de Chagas en el hombre, tiene dos etapas: aguda y crónica. Estas fases tienen caracteres clínicos evolutivos diferentes.

- **Fase aguda**

La primera fase dura entre 4-8 semanas, se caracteriza por un precoz aparición de síntomas. El parásito pasa ciclos de multiplicación dentro de la célula huésped y el sistema inmunitario desencadena una inflamación en la piel o conjuntiva.

La lesión está presente en una minoría de los casos con manifestaciones clínicas como: quejas de malestar, fiebre, dolor de cabeza, dolor articular y muscular, anorexia, vómitos, diarrea, somnolencia, apatía, hepatoesplenomegalia, edema, y convulsiones. Los síntomas desaparecen a los pocos meses de la infección en el 90% de los casos incluso si la infección no es tratada con medicación. El 60-70% de estos pacientes, no desarrollarán la enfermedad. La tasa de mortalidad es inferior al 5%. De forma evidente, la causa de muerte en la enfermedad de

Chagas aguda puede ser insuficiencia cardiaca, meningitis o encefalitis, normalmente en niños o individuos inmunosuprimidos.

La infección aguda se caracteriza por una elevada presencia del parásito en sangre por tanto puede ser detectada por un examen microscópico de frotis de sangre teñidos con Giemsa, donde el parásito se puede ver directamente por lo general durante un período de 6 a 8 semanas.

▪ **Fase crónica**

Aparece tras la fase aguda y puede presentarse en forma indeterminada o sintomática, con manifestaciones principalmente cardiacas (Rassi et al., 2010), digestivas, cardiodigestivas y, menos habitual, manifestaciones neurológicas.

o Fase crónica indeterminada: Su duración es variable y puede prolongarse de 10 a 30 años tras la infección. La presencia del parásito se evidencia mediante la detección de anticuerpos en suero. También, aunque no tan fácilmente, el parásito puede presentarse mediante hemocultivo. No presenta síntomas ni alteraciones evidentes en las pruebas clínicas cardiológicas o digestivas, (Junqueira and Soares, 2002) aunque se ha demostrado que la mayoría de los pacientes en esta fase tiene manifestaciones cardiacas que apenas son detectables de manera clínica (Barretto and Ianni, 1995). La mayor parte de las personas permanece en este período durante el resto de su vida y con una calidad de vida similar a personas no infectadas. En un elevado número de casos la enfermedad evoluciona a una fase con aparición de sintomatología.

o Fase crónica sintomática: Su duración depende de la gravedad de las manifestaciones cardiacas y digestivas. Alrededor del 30% de los pacientes crónicos indeterminados progresan a esta fase. Implica lesiones en el sistema cardíaco, digestivo y en el sistema nervioso central y periférico.

▪ Cardiaca: es la forma más frecuente clínicamente y habitual, que se manifiesta a partir de los 25 años de la infección sobretudo en niños infectados en la infancia. (Prata, 2001). El 20 a 30% de los pacientes desarrollan complicaciones cardiacas. Se presenta desde el período subclínico, con alteraciones del electrocardiograma que comprenden un bloqueo de la rama derecha del haz de Hiss y un hemibloqueo anterior izquierdo. El paciente puede mantenerse con esta alteración durante años o durante toda su vida en forma asintomática, pero también puede hacerse sintomática, en este último caso el paciente puede presentar disnea de esfuerzo, palpitations dolor precordial y

puede llegar a la insuficiencia cardíaca que es predominante en la zona derecha. En estos casos el ecocardiograma resulta de gran utilidad para el seguimiento y evolución. Los pacientes con daño severo del miocardio desarrollan enormes aumentos de tamaño del miocardio, insuficiencia cardíaca y fenómenos de trombo embolismo. La muerte súbita, por fibrilación ventricular, puede ocurrir en cualquier momento de la evolución de la enfermedad (Ramos et al., 1995). La punta del ventrículo izquierdo es frecuentemente, sede de una lesión aneurismática característica de la miocardiopatía de Chagas crónica. Las arritmias cardíacas complejas pueden ser verificadas por un Holter de 24 horas y las pruebas ergométricas empeoran con la progresión de la enfermedad de Chagas. (Pedrosa and Campos, 2004). La enfermedad afecta a ambos sexos de manera equitativa en pacientes de 30-50 años de edad. En el grupo de pacientes que muestran progresivos cambios en el electrocardiograma, la muerte inesperada puede ocurrir en más del 37,5% de los casos. Es importante destacar que el 58% de los pacientes con estos síntomas muestran signos de la insuficiencia cardíaca y con frecuencia mueren desde 7 meses a 2 años tras el inicio de de los síntomas (Prata, 1994).

- Digestiva: se manifiesta a partir de los 25 años de la infección y es la segunda causa más frecuente de complicaciones en la enfermedad de Chagas, aunque su mortalidad es baja puede afectar considerablemente a la calidad de vida de los pacientes. El 15-20% de los pacientes desarrollan alteraciones digestivas (Prata, 2001). La prevalencia de éstas manifestaciones varía dependiendo de la región geográfica de procedencia de los pacientes, siendo más frecuente en la región central de Brasil, menos frecuente en Bolivia y prácticamente inexistente en los países al norte de la cuenca amazónica, América Central y México. Esta particular distribución es probablemente debida a la cepa del parásito característica de cada zona (Miles et al., 2003),(Campbell et al., 2004).

Las principales alteraciones del tubo digestivo en los pacientes de Chagas son las megavisceras como el megaesófago y el megacolon; (Rezende and Luquetti, 1994) también pueden aparecer megauréter, megavejiga, megas de la vía biliar, pero estas formas son más difíciles de detectar.

El megaesófago se manifiesta por disfagia, dolor epigástrico o retroesternal, pirosis, tos y sialosis. La disfagia suele iniciarse de manera insidiosa, raramente en forma súbita y se va acentuando con la evolución, los pacientes se desnutren y sufren frecuentes infecciones del aparato respiratorio. En el megacolon los principales signos y síntomas son el estreñimiento, el meteorismo y el dolor abdominal. El estreñimiento se instala de manera insidiosa, con períodos cada vez más prolongados de retención, ocasionando la formación de fecalomas. La retención de materias fecales durante diez, quince o más días es común.

- Cardiodigestiva: La asociación de enfermedades cardíacas con megaesófago o megacolon, define la forma cardiodigestiva de la enfermedad de Chagas. En la mayoría de los países el desarrollo de megaesófago normalmente precede a enfermedades del corazón y del colon, pero la prevalencia de la forma cardiodigestiva no está claramente definida por la escasez de estudios apropiados.

- Neurológica: Se presenta en <5% de los pacientes de Chagas, en muchas ocasiones se asocia con la infección por VIH.

La disfunción autonómica se produce a partir de la primera fase de la enfermedad de Chagas. Las dolencias como el megacolon y megaesófago son consecuencias de la disfunción del sistema nervioso autónomo. Los trastornos autonómicos también pueden desempeñar un papel de la función cardíaca arrítmica y miocardiopatías. Los pacientes con enfermedad de Chagas, incluso en las primeras etapas y sin disfunción cardíaca, presentan signos de un trastorno del sistema nervioso parasimpático que se correlacionan significativamente con alteraciones en la sustancia blanca subcortical. Se especula que la enfermedad de Chagas, incluso en las primeras etapas, podría promover un desequilibrio entre los sistemas simpático y parasimpático y promover un ritmo cardíaco inestable (Py et al., 2009).

En caso de coinfección HIV-*T. cruzi* se han observado grado de inmunodeficiencia. En presencia de este síndrome se han observado no solo las infecciones agudas de Chagas más graves, sino también reactivaciones fatales de infecciones crónicas, especialmente con compromiso neurológico (Gluckstein et al., 1992; Pacheco et al., 1998)

1.2.3 Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la enfermedad laboratorio basado en métodos parasitológicos es eficaz en la fase aguda de la enfermedad, en la que se puede detectar el parásito, fácilmente, mediante las siguientes técnicas: observación directa por microscopía, técnicas de concentración de parásitos como el microhematocrito, técnica de Strout y hemocultivo.

En la transmisión congénita, la existencia de parásitos en el torrente circulatorio es variable y depende del momento de la transmisión, que puede incluso ser durante el parto. (Luquetti et al., 2005).

En la fase crónica de la enfermedad, la parasitemia suele ser baja y en ocasiones indetectable por lo que el diagnóstico de la infección se realiza mediante la detección de anticuerpos IgG anti-*T.cruzi*, hemaglutinación indirecta (IHA) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La confirmación de laboratorio de una sospecha clínica de enfermedad de Chagas se basa en los resultados concordantes de, al menos, 2 técnicas inmunológicas de antígenos distintos. (WHO, 2002). Existen dos grupos de pruebas serológicas para determinar la existencia de la infección. Por una parte, las pruebas convencionales, que emplean como antígeno el parásito completo o extractos solubles de proteínas purificados cuya composición es una mezcla de antígenos. Por otra parte, las técnicas más recientes utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (da Silveira et al., 2001).

En el caso de transmisión congénita, si en el momento del nacimiento y en los primeros meses de vida los test resultan positivos, podría deberse a una transmisión pasiva de anticuerpos de la madre, por lo que el nivel de anticuerpo de los neonatos donde los neonatos no infectados deberían seronegativizarse. La respuesta serológica frente a *T. cruzi* debería ser explorado hasta los 6-9 meses de edad porque hasta ese momento, pueden existir anticuerpos IgG transferidos de la madre. (Gomes et al., 2009)

1.2.3.a Diagnóstico para la valoración de la función cardiaca debido a la enfermedad de Chagas

Al igual que otras enfermedades cardiacas, los síntomas y signos objetivos de la cardiopatía chagásica no se correlacionan directamente. Algunos pacientes con

electrocardiograma avanzado y/o cambios y alteraciones ventriculares regionales de la motilidad pueden permanecer asintomáticos durante largos periodos de tiempo (Mendez and Cowie, 2001).

Por tanto, la valoración de la función cardiaca en pacientes de Chagas se define con el resultado de tres pruebas específicas: electrocardiograma, ecocardiografía y gammagrafía de perfusión miocárdica. (Punukollu et al., 2007)

Según la clasificación de Kuschnir (Kuschnir et al., 1985) el resultado de las tres pruebas anteriores determina el estadio de la fase crónica cardiaca en la que se encuentra el paciente. Así, se define como grupo 0, a pacientes con serología positiva, electrocardiograma normal, sin cardiomegalia y asintomático. Grupo I, pacientes con serología positiva y electrocardiograma patológico, especialmente portadores de alteraciones de conducción intraventricular y/o extrasistolia ventricular, sin cardiomegalia ni insuficiencia cardiaca. Grupo II, pacientes que además de serología y alteraciones electrocardiográficas, presentan cardiomegalia moderada sin síntomas ni signos de insuficiencia cardiaca y Grupo III a los pacientes con insuficiencia cardiaca clínica.

1.2.3.b Diagnóstico para la valoración de la función digestiva debido a la enfermedad de Chagas

Las manifestaciones gastrointestinales crónicas de la enfermedad de Chagas se describen en las glándulas salivales, el esófago, el esfínter esofágico inferior, el estómago, intestino delgado, colon, vesícula biliar. (Koberle, 1968), (Meneghelli, 1985),(Troncon et al., 1993), (Rezende Filho et al., 2005). Las manifestaciones gastrointestinales crónicas de la enfermedad de Chagas se describen asociadas con *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), con daño en las células intersticiales de Cajal y con la incidencia de cáncer gastrointestinal (Hagger et al., 2000),(Geraldino et al., 2006),(Garcia et al., 2003). De un total de 4.690 autopsias realizadas en pacientes con manifestaciones digestivas, 1.708 autopsias correspondían a pacientes de Chagas crónico. El análisis reveló que el megacolon fue la manifestación gastrointestinal más frecuente, seguida del megaesófago. El megacolon asociado con el megaesófago era la tercera dolencia más común. (Lopes et al., 1989). Por tanto, la valoración de la función digestiva en pacientes de Chagas se define con el resultado de pruebas que evalúen la actividad del megaesófago, como fluoroscopia, radiología, visualización del tránsito esofágico baritado, estudio de la manometría esofágica y fibro-endoscopia así como pruebas que evalúen la

actividad del megacolon como el estudio del colon mediante enema baritado, manometría rectal, fibrocolonoscopia y rectosigmoidoscopia.

Según la clasificación descrita por Rezende (Rezende Filho et al., 2005), y de acuerdo con el resultado de las pruebas diagnósticas, se establecen los siguientes grupos de pacientes con alteraciones en la función esofágica. Así, como grupo 0 se define a pacientes asintomáticos y sin alteraciones radiológicas en los que se evidencie algún grado de denervación. Grupo I, pacientes con esófago de calibre aparentemente normal al examen radiológico. Presentan tránsito lento y no existe regurgitación. Grupo II, pacientes con pequeño-moderado aumento de calibre. Retención de contraste apreciable y presencia frecuente de ondas terciarias, asociada o no a hipertonia del esófago inferior. Grupo III a los pacientes con esófago con gran aumento de diámetro: Actividad motora reducida e hipotonía de esófago inferior. Poseen gran retención de contraste y regurgitación importante. Grupo IV a los pacientes con dolicoesófago. Los pacientes poseen esófago atónico alargado y con gran capacidad de retención.

1.2.4 Epimiología y control vectorial

Según las características epidemiológicas de la enfermedad de Chagas, los países endémicos se pueden agrupar en cinco grupos de países, de acuerdo a los ciclos de transmisión, vectores y programas de control vectorial (Dias, 1997),(Schmunis, 2007),(Coura and Dias, 2009).

- ★ Grupo 1: incluye los países de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Honduras, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela. Se caracteriza por ciclos domésticos y peridomésticos con zonas de alta prevalencia de infección humana. Predominan las manifestaciones crónicas cardiacas consecuencia de la enfermedad de Chagas, y por el contrario, ausencia de manifestaciones digestivas en la zona norte de la línea ecuatorial. Existen importantes ciclos salvajes en ambientes naturales que incluyen *Triatoma infestans* (en áreas restrictivas de Bolivia). Actualmente, hay programas de control vectorial y transfusión en casi todos los países, con perspectivas de eliminación para *Triatoma infestans* (ya conseguido en Brasil, Chile y Uruguay) y *Rhodnius prolixus*, que son las especies domésticas.
- ★ Grupo 2: incluye los países de Colombia, Costa Rica y México. Se caracteriza por ciclos domésticos y peridomésticos con la presencia de cardiopatía crónica

de Chagas, se ha detectado en ciclos salvajes. Actualmente, están comenzado a aparecer programas de control vectorial.

- ★ Grupo 3: incluye los países de El Salvador, Guatemala, Nicaragua y Panamá. Presenta ciclos domésticos, peridomésticos y salvajes con escasa información clínica en casos humanos. Comienzan a existir programas de control vectorial.
- ★ Grupo 4: incluye los países de Antillas, Bahamas, Belice, Cuba, Estados Unidos, Guyana, Guyana francesa, Haití, Jamaica y Surinam. Presenta ciclos con casos singulares de infecciones de personas, y escasa información clínica. Los inmigrantes infectados residen en su mayoría en los Estados Unidos. Hay ausencia de programas de control, con la excepción del inicio de controles en los bancos de sangre en los Estados Unidos, dónde ya se han descrito casos originados por transfusión de sangre de un paciente infectado.
- ★ Grupo 5: incluye los países de Norte América, Europa, Asia y Oceanía, en particular los Estados Unidos, Canadá, España, Francia, Suiza, Japón, algunos países de Asia y Oceanía. Se han creado nuevos problemas epidemiológicos, políticos, sociales, económicos y de salud pública debido a la globalización de la enfermedad de Chagas como consecuencia de la migración de países de la población de países endémicos hacia países no endémicos (Fig 14) Estos problemas incluyen riesgos de transmisión congénita, por transfusión o por trasplante, así como la necesidad de cuidados médicos para los pacientes de Chagas y controles adicionales en bancos de sangre en países que carecen de experiencia en este tema.

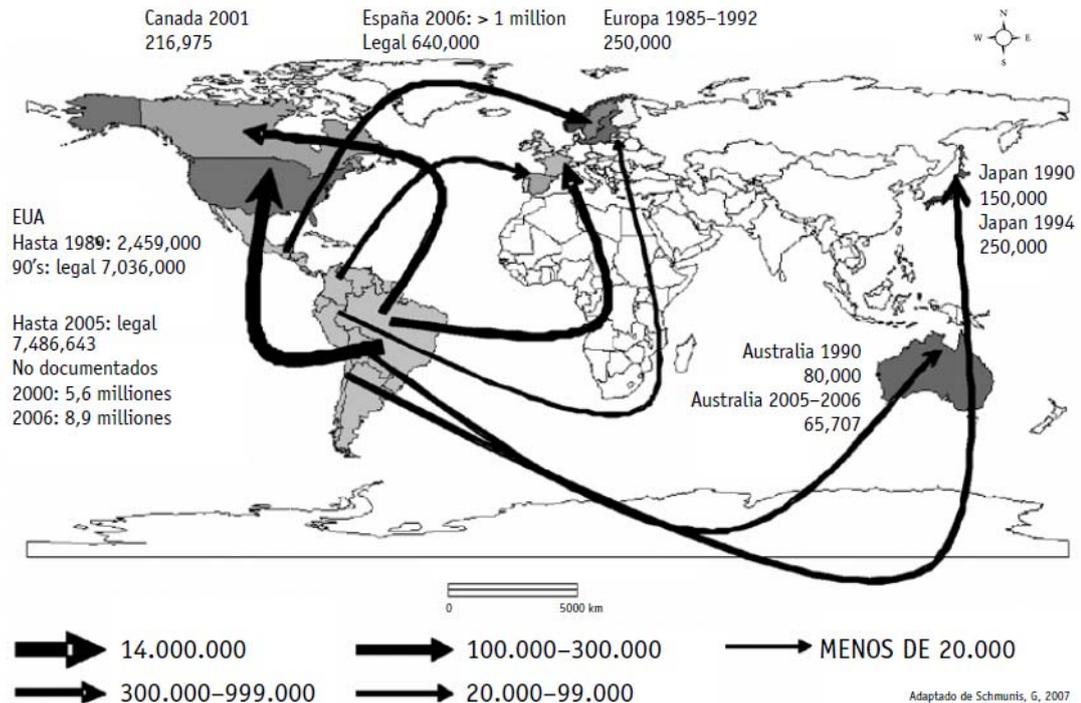


Figura I4. Flujo de migraciones de América Latina hacia regiones no endémicas para la enfermedad de Chagas (Schumnis, G.2007)

1.2.5 Tratamiento para la enfermedad de Chagas

El benznidazol y el nifurtimox son los únicos fármacos con eficacia probada contra la enfermedad de Chagas (Fig I5). (de Andrade et al., 1996),(Sosa Estani et al., 1998),(Viotti et al., 2006),(Fabbro et al., 2007) El Benznidazol tiene el mejor perfil de seguridad y eficacia, (Viotti et al., 2009) y por lo tanto se utiliza generalmente como primer tratamiento. Los pacientes deben ser tratados con benznidazol (5-10 mg / kg al día) durante 60 días, o con nifurtimox (15 mg / kg al día) en tres dosis divididas durante 60-90 días, preferiblemente después de las comidas.

En la fase inicial aguda, la administración de estos medicamentos ayuda a controlar la enfermedad y disminuye la probabilidad de cronicidad (Jannin and Villa, 2007), pero la fase crónicas su efectividad no está aún firmemente demostrada. Estudios previos han indicado que el tratamiento con benznidazol en pacientes asintomáticos retrasa la aparición de daños cardiacos (Gallerano and Sosa, 2000; Viotti et al., 1994). Por tanto, el tratamiento anti-tripanosomal es muy recomendado para todos los casos de infección aguda, congénita e infección

reactivada, en concreto para niños con infección y pacientes mayores de 18 años en fase crónica debido. El tratamiento se debe ofrecer a adultos de 19-50 años sin cardiopatía chagásica siendo opcional para los pacientes mayores de 50 años, dado que los beneficios del tratamiento no han sido aún demostrados como eficaces en esta población. El tratamiento está contraindicado durante el embarazo y en pacientes con insuficiencia hepática o renal.

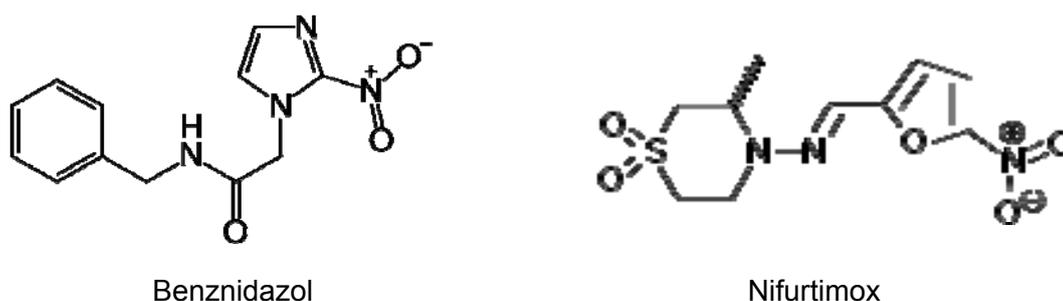


Figura 15. Fórmula química de los medicamentos tradicionales en la enfermedad de Chagas

Actualmente se encuentran en curso dos estudios: TRAENA (TRAtamiento EN pacientes Adultos) y BENEFIT (The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis). El objetivo de TRAENA es determinar si una droga parasiticida como el benznidazol es capaz de modificar la evolución natural de la enfermedad de Chagas crónica en pacientes adultos. Para ello se está realizando un ensayo clínico autorizado en Fase III. Los datos en cuanto a parasitología y serología se están recapitulando desde 1999 hasta la actualidad, se espera que los resultados sean publicados a lo largo del presente año (Riarte et al., 2012). BENEFIT es el estudio clínico multicéntrico, multinacional en la población seleccionada al azar más grande que se haya hecho en pacientes con infección por *T. cruzi* con evidencia de cardiomiopatía chagásica temprana. BENEFIT ha reclutado 2850 pacientes y se encuentra en fase de seguimiento. Los resultados se esperan obtener para el año 2014 (Morillo, 2012). Ambos estudios darán sin duda respuesta a algunas dudas, acerca de la eficacia del tratamiento en la enfermedad de Chagas en fase crónica.

A finales del año 2011 el Laboratorio Farmacéutico Público de Pernambuco (LAFEPE) de Brasil comenzó a comercializar una tableta más fácil de administrar y un tratamiento más seguro para bebés y niños pequeños menores de dos años, ya que recibirían una dosis exacta. El nuevo comprimido dispensable de 12,5 mg

es fácil de administrar y adaptado a los bebés y niños de hasta dos años de edad (20 kg de peso corporal).

Actualmente, están en desarrollo otros medicamentos dirigidos a inhibir la síntesis del ergosterol. Itraconazol y posaconazol (Fig 16). El Itraconazol se ha aplicado en pacientes de Chagas en fase crónica indeterminada y cardiaca basado en los resultados en estudios preclínicos. Estudios en animales han demostrado que el posaconazol es 30 veces más potente que el benznidazol. Actualmente, se están realizando ensayos clínicos de Fase II con posaconazol en 160 pacientes y se prevé el inicio del ensayo clínico en fase III en 2013 (Urbina, 2010)

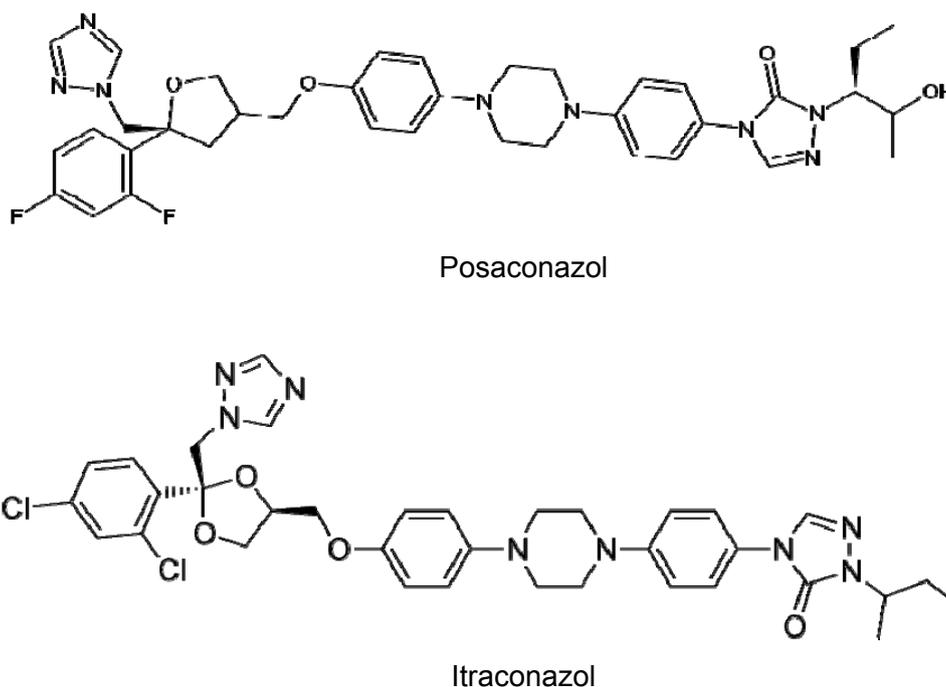


Figura 16. Fórmula química de los medicamentos bajo estudio para la enfermedad de Chagas

Las herramientas para la evaluación de la eficacia tratamiento con benznidazol son todavía de implementación e interpretación compleja. Un tema importante que todavía necesita ser discutido es la definición de cura de pacientes que recibieron tratamiento etiológico. Hasta ahora, el criterio universalmente aceptado es el obtenido por la seronegativización media mediante la serología convencional suele tardar varios años. Por tanto, es importante utilizar diferentes ensayos serológicos, con antígenos recombinantes o que hayan demostrado su conversión

negativa antes que la serología convencional. Por otra parte, el uso de la PCR para diagnóstico y como marcador post-terapéutico está siendo evaluado.

El tratamiento durante la fase aguda de la enfermedad tiene muy buenos resultados así lo muestran la reducción de manifestaciones clínicas y la reducción de los niveles de parasitemia.

Para evaluar la eficacia del tratamiento específico, en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, se debe tener en cuenta, la edad del paciente en el momento que recibió el tratamiento, el tiempo entre el tratamiento y el seguimiento, herramientas de diagnóstico utilizadas, y región geográfica en la que los pacientes se infectaron. Diversos estudios han demostrado que existe una seroconversión en pacientes en fase crónica (Bern et al., 2009), (Sanchez Negrette et al., 2008), (Viotti et al., 2006).

1.3 RESPUESTA INMUNE FRENTE A *TRYPANOSOMA CRUZI*

Los mecanismos de defensa frente a la infección *T. cruzi* implica tanto la respuesta inmunitaria innata como la adquirida. Esta compleja respuesta se desarrolla en distintos compartimentos del sistema inmune y se caracteriza, principalmente, por la expansión o proliferación celular, producción de citoquinas e inducción de mecanismos de muerte celular (Tarleton, 2007) (de Meis et al., 2009). Como consecuencia de la respuesta desencadenada, el parásito pasa a ser combatido continuamente y su multiplicación en los tejidos del hospedador se reduce. Sin embargo, *T. cruzi* puede contrarrestar las presiones selectivas impartidas por parte de efectores inmunes celulares y humorales y persistir indefinidamente en el hospedador. Tanto la diversidad genética de *T. cruzi* como la del hospedador resultan determinantes en la patología de la enfermedad, donde las lesiones en los tejidos resultantes se acumulan, llevando eventualmente a alteraciones funcionales musculares digestivas y nerviosas características de la enfermedad de Chagas crónica (Tarleton et al., 2007).

1.3.1 Respuesta inmunitaria innata en *Trypanosoma cruzi*

El sistema inmunitario innato parece tener un papel fundamental en, al menos, dos aspectos importantes de la enfermedad de Chagas. Por una parte, el control de la replicación del parásito y propagación en los tejidos del huésped y, por otra parte, la reacción inflamatoria en los tejidos infectados, considerada como una causa importante de daño tisular y disfunción de los órganos afectados. El papel de las citoquinas como la IL12, factor de necrosis TNF- α e interferon IFN- γ , así como reactivos intermedios de nitrógeno (RNI) resultan muy importantes para la resistencia del parásito durante las etapas tempranas de la infección y en el origen de una futura miocarditis (Golgher and Gazzinelli, 2004). Las células que participan en la inmunidad innata como *Natural Killers* (NK), células dendríticas y macrófagos, son elementos clave en el control inicial de la replicación de *T. cruzi*. Durante los últimos años, los estudios se han centrado, por una parte, en definir patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que son objetivos para los receptores del sistema innato, y, por otra parte, identificar receptores relevantes en la interacción huésped-parásito.

1.3.1.a Toll-like receptors (TLR)

La función primaria de la inmunidad innata es la eliminación rápida de los microorganismos invasores. Los macrófagos y las células dendríticas (CD) pueden reconocer agentes microbianos y desplegar una rápida defensa inmunitaria. Estas células tienen un papel importante en la regulación de la inmunidad adquirida a largo plazo. Entre las distintas familias de los receptores de la inmunidad innata como helicasas, receptores Nod-(LNR), los receptores Toll (TLRs) han sido los más estudiados en la mayoría de trabajos relacionados con la infección por *T. cruzi* (Fig 6). Los TLRs son el medio principal en el que el sistema inmunitario innato reconoce y responde rápidamente a la presencia de patógenos (Takeuchi and Akira, 2010). Son partícipes en el reclutamiento de los fagocitos hacia tejido infectado y la destrucción del invasor patógeno. Sin embargo, cuando los TLR se activan en exceso puede provocar una patología, como en el caso del choque séptico inducido con bacterias Gram-negativas. (Dobrovolskaia and Vogel, 2002) Hasta la fecha, los TLRs han sido implicados en la defensa frente a distintos patógenos de microorganismos que causan enfermedades humanas, incluyendo parásitos protozoarios (Gazzinelli et al.,

2004). Por tanto, los TLRs se consideran mediadores centrales de la activación inmune innata durante la infección con *T. cruzi*. La familia de los TLRs se compone de 11 y 13 miembros en humano y ratón, respectivamente (Takeuchi and Akira, 2010). Las principales moléculas microbianas que activan los receptores TLR son componentes de la pared celular o membrana de bacterias: TLR1 y TLR2 son activados por lipopéptido triacilados; TLR2 y TLR6 por lipopéptido diacilados; TLR4 por polisacáridos (LPS), y TLR5 por flagelinas. Los ácidos nucleicos de los virus y las bacterias también se han identificado como agonistas de TLR intracelulares, así TLR3 es activado DNA de doble cadena vírico, TLR7 y TLR8 por el virus monocatenario ARN y TLR9 por motivos CpG no metilados. Los TLRs comparten un dominio citoplasmático de alta homología con el receptor de IL-1 (IL1R), conocido como dominio TLR/IL-1R (TIR) (Gay and Keith, 1991). La señalización de los TLR no es posible, (O'Neill et al., 2003). Los dominios TIR de los TLRs pueden interactuar con moléculas adaptadoras citoplasmáticas que también contienen dominios TIR. El dominio adaptador TIR mejor estudiado es la proteína de MyD88 (molécula de diferenciación mieloide primaria) que traduce señales para todos los TLR conocidos, excepto TLR3 (Takeuchi and Akira, 2002), así como receptores para IL-1, IL-18 e IL-33, por lo que, los ratones deficientes en el funcionamiento de MyD88 están básicamente desprovistos de las funciones de los TLRs (Takeuchi and Akira, 2002). Al menos existen otros tres dominios TIR que contienen moléculas adaptadora MyD88: Mal, también conocida como TIRAP, TRIF también conocida como Ticam1 y TRAM1. (Fitzgerald et al., 2003) Mal/TIRAP se requiere para funciones de TLR2 y TLR4, mientras que TRIF es empleado por TLR3 y TLR4 (Yamamoto et al., 2002). TRAM se requiere únicamente para la función de TLR4 (Fig 17). (Fitzgerald et al., 2003)

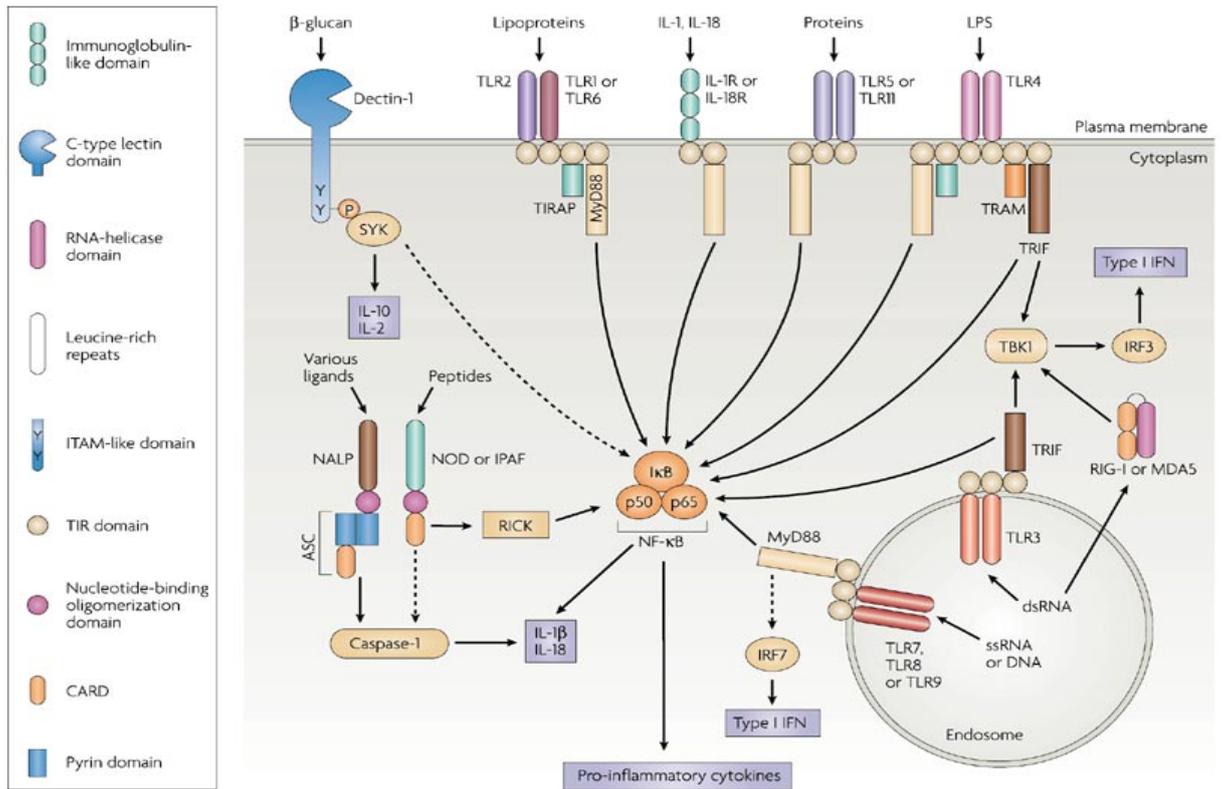


Figura 17. Representación esquemática de las principales rutas de la familia PRR. (Trinchieri, G. Nature 2007)

1.3.1.b Activación de TLR por *Trypanosoma cruzi*

De entre todos los miembros de la familia de los receptores de reconocimiento de patrones, TLR2 es el primer receptor que se describió implicado en la respuesta inmunitaria innata desencadenada por *T. cruzi*. Los anclajes de glicofosfatidilinositol (GPI) distribuidos en la superficie de la membrana de *T. cruzi*, inducen la síntesis de citoquinas proinflamatorias y NO en células inmune innatas mediadas por TLR2 (Camargo et al., 1997). Todos los eucariotas poseen GPIs, pero algunos parásitos incluidos *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major* and *Toxoplasma gondii*, expresan del orden de 10-100 veces más GPIs que los encontrados en sus hospedadores con una estructura diferentes. La inducción de la respuesta inflamatoria como consecuencia de los GPI de *T. cruzi* se atribuye a la presencia de ácidos grasos insaturados en la 2ª posición de un componente alquililglicerólípido y un glicano central (Almeida et al., 2000). Estudios *in vitro*, usando células de ovario de hámster (CHO) expresan TLR2 y CD14 y revelan que los anclajes de *T. cruzi* inducen activación

NF- κ B a través de la señalización dependiente de TLR2. Además, *ex vivo*, los macrófagos de ratones TLR2^{-/-} (deficientes del gen TLR2, pero no del gen TLR4) no responden a anclajes de GPI de *T. cruzi* (Campos et al., 2001).

La proteína parasitaria secretada como Tc52, ha sido también identificada como un potente inductor de la activación de TLR2 en células inmunitarias innatas humanas y de ratón (Ouaissi et al., 2002). Tc52 abarca dos dominios homólogos, que contienen un sitio de unión glutatión (sitio G) y una región C-terminal hidrofóbica (sitio H), que son esenciales para la supervivencia del parásito y virulencia. Se observa que en ratones control y no en ratones TLR2^{-/-}, Tc52 derivada de *T. cruzi* induce la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citoquinas / quimioquinas que, junto con la activación de NF- κ B, provoca la maduración de células dendríticas (CD). En presencia de glutatión exógeno, Tc52 impide la maduración de CD y la producción de quimioquinas a pesar de una unión normal de Tc52 a los CD, lo que indica que el sitio G de Tc52 es responsable de la activación de la vía de señalización TLR2 más que del lugar de unión a TLR2 (Ouaissi et al., 2002).

Estudios anteriores, indican que TLR4 no está involucrado en el reconocimiento de los anclajes de GPI (Campos et al., 2001). Sin embargo los compuestos glycoinositolfosfolípidos (GIPLs) de *T. cruzi*, han sido descritos como activadores de las vías de señalización a través de CD14 y TLR4 (Oliveira et al., 2004). En ratones de cepas C57BL/10ScCr y C3H/HeJ que son TLR4^{-/-}, los GIPLs indujeron una reducción de la producción de quimioquinas y quimiotaxis de neutrófilos reducidos en comparación con los ratones control. Por otra parte, los ratones TLR4^{-/-} C3H/HeJ son más susceptibles a la infección por *T. cruzi*, (Oliveira et al., 2004). Estos hallazgos sugieren la implicación de TLR4 en el reconocimiento de los anclajes de GPI de *T. cruzi*. Sin embargo, ratones de C57BL/6 TLR4^{-/-} mostraron resistencia normal a la infección por *T. cruzi* (Trinchieri and Sher, 2007). Lo que indica una posible participación entre la función del TLR4 y otros receptores. La participación de TLR4 en el reconocimiento de *T. cruzi* no está clara.

El otro TLR implicado en el reconocimiento de *T. cruzi* es TLR9. Los ratones TLR9^{-/-} muestran parasitemia elevada y una mayor susceptibilidad después de la infección por *T. cruzi* en comparación con ratones control. Los ratones TLR9^{-/-} exhibieron una disminución de las concentraciones séricas de IL-12p40 e IFN- γ (Bafica et al., 2006). En relación a este hecho, se ha publicado que los ADN de varios parásitos protozoarios, incluyendo *T. cruzi*, ejercen funciones reguladoras

que estimulan el sistema inmune (Shoda et al., 2001). Por lo tanto, el genoma de *T. cruzi* parece contener abundantes motivos CpG que inducen a la activación de las células inmunes innatas a través de TLR9. De hecho, los macrófagos derivados de ratones TLR9^{-/-} presentan una reducción de TNF- α , IL-6, IL-12p40, y NO en respuesta al ADN genómico de *Trypanosoma brucei* (Drennan et al., 2005). Por otra parte, análisis *in silico* identificaron motivos CpG inmuno estimulantes para el ratón en los genes VIPER de *T. cruzi* y glicoproteínas similares a mucinas para el TLR9 humano. Los oligonucleótidos sintéticos correspondientes contienen las secuencias correspondientes inducen IL-12p40, TNF α y la producción de NO en CD de médula ósea en ratones control, pero no en ratones TLR9^{-/-} (Bartholomeu et al., 2008). Se ha demostrado que TLR9 se expresa en el retículo endoplasmático, donde se encuentra con su ligando antes de su traslocación, al compartimento endo-lisosomal, donde se activa tras una asociación con ADN con motivos CpG (Latz et al., 2004). De acuerdo con este mecanismo, la translocación *T. cruzi* mediada por TLR9 en el lisosoma y la colocalización de TLR9 y los parásitos ha sido observada en las CD de la médula ósea (Bartholomeu et al., 2008).

TLR2, TLR4 y TLR9 cooperan en la activación de las células inmunes hacia el control a una regulación de la infección parasitaria. Dado que el protozoo parásito *T. gondii* ha sido capaz de señalizar activación a través de TLR11 (Yarovinsky et al., 2005), es posible que existan TLRs adicionales que son activados por *T. cruzi* y que todavía no han sido identificados (Fig 18).

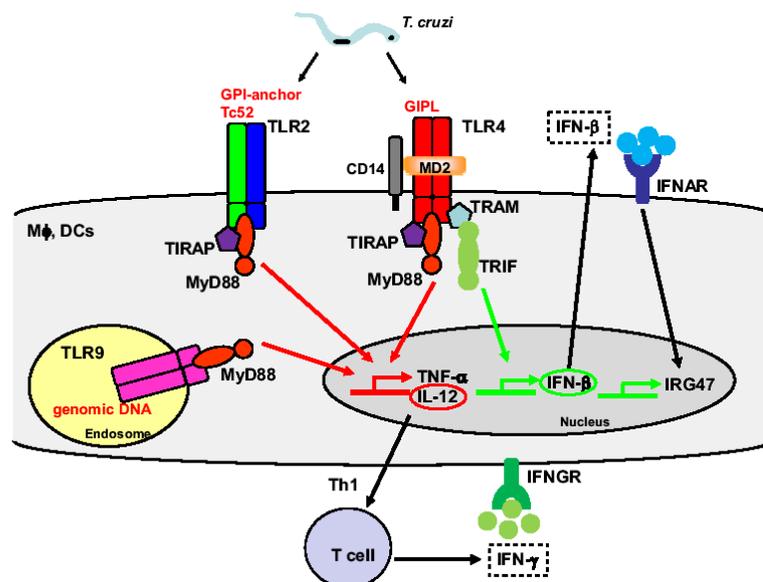


Figura 18. TLRs desencadenados frente la invasión de *T. cruzi*. (Kayama, K. 2010)

1.3.1.c Activación de la respuesta inmune durante la infección de *T. cruzi* mediante la vía dependiente MyD88

La participación crítica de los TLR en la resistencia del huésped a la infección por *T. cruzi* es aún más evidente en los ratones MyD88^{-/-} en los que la señalización dependiente de MyD88 está totalmente suprimida tras el reconocimiento de *T. cruzi* mediado por TLR. Los ratones MyD88^{-/-} son altamente susceptibles a la infección con la cepa Y de *T. cruzi*. Tras la infección, la producción de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-12p40 y la posterior producción de IFN- γ de las células Th1 disminuye severamente (Trinchieri and Sher, 2007) (Bafica et al., 2006). Estos resultados sugieren que la vía dependiente de MyD88 está implicada en la resistencia del huésped contra la infección por *T. cruzi* a través de la secreción de IL-12p40 necesaria para respuesta inmunitaria asociada a Th1.

El estudio comparativo del comportamiento de ratones MyD88^{-/-} y TLR2^{-/-} tras la infección de *T. cruzi*, evidenció como resultado que los ratones TLR2^{-/-} presentan fenotipos menos graves en lo que se refiere a mortalidad y una disminución de la producción de mediadores proinflamatorios, tales como el TNF- α , IL-12p40 y el NO (Campos et al., 2004). Estos resultados sugieren que la ausencia de TLR2 se compensa por la activación de los TLR alternativos, tales como TLR4 y TLR9, vinculados a MyD88, durante la infección por *T. cruzi*.

El estudio comparativo del comportamiento de ratones transgénicos TLR2^{-/-} o ratones TLR9^{-/-} de manera individual, evidenció una mayor susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* de los ratones TLR9^{-/-} con la parasitemia mejorada (Bafica et al., 2006). La mayor susceptibilidad de los ratones doblemente transgénicos TLR2^{-/-} y TLR9^{-/-} a la infección por *T. cruzi* fue casi comparable a la observada en ratones MyD88^{-/-}, lo que indica que TLR2 y TLR9 son los TLRs principalmente implicados en el reconocimiento de *T. cruzi*.

1.3.1.d Activación de la respuesta inmune durante la infección de *T. cruzi* mediante vías independientes de MyD88

Como ya se mencionó anteriormente, tras el reconocimiento de los componentes de *T. cruzi* a través de los TLR mediante la vía dependiente de MyD88 se desencadena la expresión de mediadores pro-inflamatorios, tales como la IL-12p40

y TNF- α . Además de esta vía dependiente de MyD88, existe otra molécula adaptadora que contienen el dominio TIR, denominada TRIF, la cual media la activación de la vía independiente de MyD88 a través de TLR3 y TLR4 y que conduce a la inducción de interferones de tipo I (IFN α/β). La infección por virus induce una fuerte expresión de IFNs de tipo I así como por varios patógenos intracelulares, como las bacterias y parásitos protozoarios (Bogdan et al., 2004). De manera similar, la infección por *T. cruzi* también induce la expresión de IFN de tipo I (Sonnenfeld and Kierszenbaum, 1981), (Kierszenbaum and Sonnenfeld, 1982). Se han propuesto diversos mecanismos para la inducción de IFNs de tipo I en macrófagos y CD en infecciones con *T. cruzi* (Vaena de Avalos et al., 2002). Los ratones deficientes en MyD88 y TRIF son altamente susceptibles a la infección con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, incluso cuando se compararon con ratones transgénicos MyD88^{-/-} correlacionándose con macrófagos y CD.

Los macrófagos de los ratones infectados con *T. cruzi* MyD88^{-/-}IFNAR1^{-/-} mostraron un incremento de la replicación intracelular de *T. cruzi* en comparación con las células de ratones MyD88^{-/-}. A pesar de que los ratones IFNAR1^{-/-} no son más susceptibles a la infección por *T. cruzi*, sin embargo apareció un deterioro en la respuesta celular citotóxica NK (Une et al., 2003), y los ratones MyD88^{-/-} IFNAR1^{-/-} fueron más susceptibles a la infección, indicando que estos resultados muestran que *T. cruzi* induce IFN- β por la vía MyD88 independiente (TRIF-dependiente) (Sakai et al., 2007).

La familia de las GTPasa p47, inducidas por IFN como LRG-47 y el IRG 47, han sido estudiadas por controlar la respuesta innata en patógenos intracelulares, incluyendo parásitos protozoarios (Taylor et al., 2004). De hecho, los ratones LRG-47^{-/-} han mostrado una alta sensibilidad a la infección con la cepa Y de *T. cruzi* (Santiago et al., 2005). Macrófagos de ratones LRG-47^{-/-} estimulados con IFN- γ mostraron intracelularmente una disminución de la lisis intracelular del parásito, a pesar de la expresión normal de TNF- α e iNOS, destacando el importante papel de LRG-47 en el control de la infección por *T. cruzi*. En ratones MyD88^{-/-} infectados con *T. cruzi* las CD y Macrófagos inducían una fuerte expresión de LRG-47 y GRI-47.

TLR3 y TLR4 se activan por la vía dependiente de TRIF. Por lo tanto, los GIPLs, que activan TLR4, sería uno de los candidatos por la que estimulan IFN- β vía dependiente TRIF. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la activación de *T. cruzi* mediada por la activación de TLR4 no está aún aclarada. Así, la

identificación de derivados de los componentes o moléculas que son responsables de la inducción de IFN de tipo I requiere más estudios.

Se ha propuesto otro mecanismo alternativo para la inducción de IFN de tipo I para *T. cruzi*. La infección con la cepa Y de *T. cruzi* induce expresión de IFN- β en fibroblastos de embriones, así como en M ϕ s de médula ósea (Chessler et al., 2008). En este estudio, la expresión de IFN- β como consecuencia de la infección con *T. cruzi*, se observó incluso en Macrófagos de ratones MyD88^{-/-} TRIF^{-/-}, indicando la presencia de los mecanismos TLR independientes para la expresión de IFN de tipo I en la infección con *T. cruzi*. La expresión de IFN- β mediado por *T. cruzi* se elimina en las células de los ratones por la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) o el factor de transcripción IFN 3 (IRF3) (Fig. 2).

Diversos trabajos sobre los mecanismos de inducción de IFN de tipo I en la infección por *T. cruzi* independientes de TLR son contradictorios. Este hecho podría ser debido a la utilización de cepas diferentes (Y o Tulahuen) en los estudio desarrollados. Puesto que existen diversidad génica entre las diferentes cepas de *T. cruzi*, la identificación de los genes responsables que afectan la expresión de IFN de tipo I resultaría para la caracterización de la naturaleza diferencial de las cepas de *T. cruzi*.

1.3.2 Respuesta inmunitaria adaptativa

Los pacientes de Chagas y animales de laboratorio sometidos a la infección por *T. cruzi* son capaces de desarrollar inmunidad adaptativa de memoria antígeno-específica, que se evidencia cuando al ser re infectados no presentan síntomas tan severos como a los presentados en una primera infección con tripomastigotes virulentos. La reinfección por *T. cruzi* se suele presentar con una reducción de síntomas, y con niveles de parasitemia bajos y de corta duración. Varios efectores de la respuesta inmunitaria adquirida permiten generar una protección frente la infección por *T. cruzi*.

1.3.2.a Respuesta adaptativa celular

Tras la etapa inicial de la infección en la que actúa el sistema inmunitario innato se produce la activación del sistema inmunitario adaptativo mediante la activación

de linfocitos T CD4⁺. Éstos tienen un papel crucial en el control de replicación del parásito promoviendo la activación y proliferación de linfocitos T CD8⁺ y linfocitos B (Brener and Gazzinelli, 1997). En este sentido se ha visto que el control de la parasitemia está claramente asociado además con la producción de anticuerpos y la respuesta T CD8⁺ (Kumar and Tarleton, 1998).

En general, la respuesta inmune desencadenada tras la infección está regulada por citoquinas producidas, principalmente, por linfocitos T CD4⁺ (Diaz et al., 2004). Dependiendo de las citoquinas secretadas, la respuesta será de tipo Th1, caracterizada por la producción de citoquinas (INF- γ , IL2 y TNF- α) que estimulan la respuesta T CD8⁺ efectora, o bien hacia una respuesta Th2 (IL4, IL5, IL13) que estimula la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Los linfocitos T CD8⁺ también pueden producir diferentes tipos de citoquinas en respuesta a la estimulación antigénica, polarizándose hacia perfiles Th1/Th2 (Woodland and Dutton, 2003), aunque las vías de polarización de estas poblaciones son menos conocidas.

Recientemente ha sido descrito otro grupo de linfocitos T cooperadores denominados Th17, caracterizados por la producción de la citoquina proinflamatoria IL-17, que parecen estar asociados a enfermedades autoinmunes y algunas infecciones (Jin et al., 2008); (Ouyang et al., 2008). Se ha visto que esta citoquina puede ser secretada por linfocitos T CD8⁺ sugiriéndose que la diferenciación de estas células proviene del mismo precursor que diferencia a los linfocitos TCD8⁺ productores de INF- γ . (Kondo et al., 2009).

En el caso de la infección aguda de la patología chagásica, la respuesta inmune por células Th1, caracterizada por las citocinas IL-2, TNF- α e INF- γ se considera protectora (Brener and Gazzinelli, 1997; Briceno and Mosca, 1996). Por otro lado la inducción de una respuesta mayoritaria por parte de las células Th2 se caracteriza por el aumento de la producción de IL4 lo que hace al hospedador más susceptible a la infección por *T. cruzi* (Montiel and Díaz, 2002). En este sentido, IL10 parece tener un importante papel en la mediación de la enfermedad de Chagas aguda dado que puede bloquear tanto la producción de IFN- γ como sus efectos sobre la replicación intracelular de *T. cruzi* en macrófagos peritoneales de ratón (O'Garra et al., 2004). Esta importante citoquina supresora es producida por un gran número de células del sistema inmune, incluyendo los linfocitos T reguladores (Treg), tanto CD4⁺ como CD8⁺ (Lu and Cantor, 2008), los cuales limitan el daño colateral asociado a la respuesta desencadenada (Shevach, 2001). Se han encontrado variaciones en la producción y secreción de citoquinas en relación con el grado de

afección tisular del paciente y a la susceptibilidad a la infección. En este sentido, en dos cepas de ratones se demostró un rápido aumento de los niveles de IL12 e IFN- γ en la fase aguda de la infección experimental por *T. cruzi*. Sin embargo, se observó un incremento diferencial en los niveles de IFN- γ entre las mismas, sugiriendo que la respuesta Th1 es determinante en la relación huésped – parásito, asociándose a un fenotipo de baja susceptibilidad a la infección (Planelles et al., 2003). Adicionalmente, este patrón de citoquinas observado en respuesta a la infección con *T. cruzi*, fue asociado con la patología cardíaca observada en el huésped, encontrando cepas con una afinidad a desarrollar una respuesta Th1 por producción de IFN γ , y otras cepas con afinidad para desarrollar una respuesta Th2 con producción de IL4, observando grandes diferencias en la miocarditis desarrollada por ambos (Briceno and Mosca, 1996; Montiel and Díaz, 2002). Estos resultados demuestran que en esta patología parece ser importante que se mantenga un balance adecuado en la respuesta Th1/Th2 desencadenada favoreciéndose así un equilibrio entre los mecanismos inmunitarios que controlan al parásito y los mecanismos inmunitarios que inducen la patología (Abrahamsohn, 1998).

En cuanto a la fase crónica de esta patología, se ha sugerido que la sintomatología clínica observada está vinculada de una manera directa a la eficiencia de la respuesta observada. Una mayor severidad clínica ha sido reportada en pacientes con una baja frecuencia de células T CD8⁺ específicas de *T. cruzi* productoras de INF γ , en relación a pacientes asintomáticos. Estas diferencias son principalmente asociadas a un incremento en la frecuencia de diferenciación a células T CD8⁺ de memoria (CD27-CD28-CD45RA-) así como síntomas de agotamiento clonal y un aumento en la tasa de apoptosis en la población de células T CD4⁺ periféricas en aquellos sujetos con una infección de *T. cruzi* crónica severa (Albareda et al., 2009). En este sentido son numerosos los trabajos que han demostrado la relevancia de los linfocitos T en la resistencia a *T. cruzi* (Tarleton, 2007); (Bustamante et al., 2008; Padilla et al., 2009). Las células T CD8⁺ son predominantes en infiltrados inflamatorios de tejidos parasitados, y han mostrado la capacidad de actuar como linfocitos T citotóxicos (CTL) contra células infectadas con el parásito en modelos murinos (Fonseca et al., 2005). En ausencia de linfocitos T CD8⁺ funcionales se ha observado un incremento en la carga parasitaria en tejidos, así como la incapacidad de sobrevivir a la infección por *T. cruzi*, sugiriéndose que el papel protector de dichos linfocitos en la enfermedad de

Chagas reside tanto en su actividad citotóxica como en la secreción de citocinas tipo Th1, especialmente INF γ y TNF α (Martin and Tarleton, 2004).

1.3.2.b Respuesta adaptativa humoral

En respuesta típica a un antígeno, las células B proliferan y se diferencian en células secretoras de anticuerpos en presencia de las células T ayudadoras (Th). La respuesta humoral producida frente a los antígenos del parásito permite controlar la propagación de *T. cruzi* en el hospedador (Sepulveda et al., 2000). De hecho, existen trabajos que indican que la diferenciación celular y la secreción de anticuerpos son necesarios para el control de la parasitemia (Acosta-Rodriguez et al., 2004). No obstante, la respuesta inmune inducida naturalmente durante la infección no parece ser suficiente para aclarar completamente el patógeno y, por tanto, evitar la entrada en la fase crónica.

Existen evidencias que muestran que los factores humorales juegan un papel en el control del parásito en la fase inicial de la infección, a pesar de que *T. cruzi* escapa rápidamente infectando células no fagocíticas, principalmente células musculares, donde permanece inaccesible a factores líticos de suero. La acción de protección transitoria de anticuerpos contra la infección ha sido demostrada en ratones. El pre-tratamiento de ratones con suero inmune que contiene alto título de IgM, IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 reveló que los anticuerpos protectores son de la subclase IgG2, particularmente IgG2b. IgM e IgG1 no parecen estar relacionados con protección o esta es mínima (Tafari et al., 1973). Así, los ratones atímicos tratados con suero inmune tenían un nivel de parasitemia bajo y una supervivencia prolongada en comparación con ratones atímicos hipersensibles a la infección control que recibieron suero normal y que mostraron altos niveles de parasitemia y mortalidad en un corto período de tiempo (Trischmann et al., 1978). Además, la deficiencia de linfocitos B generada mediante la inyección de anticuerpos anti-Ig en el período neonatal indujo una susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* en ratones que acompañaba por una baja producción de IgG e IgG2a (Rodriguez et al., 1981). La lisis mediada por el complemento desempeña un papel crítico en el control de las infecciones por *T. cruzi*. Anticuerpos específicos de tripomastigotes pueden detectarse mediante ensayos de lisis mediada por complemento en el curso de una infección activa (Gomes et al., 1995). Los tripomastigotes en sangre pueden ser muy susceptibles a la lisis mediada por complemento por tratamiento con

tripsina y, en menor grado, con sialidasa. Sugiriendo que el escape de los tripomastigotes de la lisis mediada por complemento está mediado por moléculas reguladoras susceptibles a la digestión por tripsina y sialidasa en la membrana del parásito (Kipnis et al., 1981). A este hecho, se suma que el factor activador del complemento liberado por las formas de *T. cruzi* en cultivo inactiva los factores líticos en el suero humano. La administración de este factor a ratones redujo la actividad hemolítica del complemento contra el *T. cruzi* en un 50%. (Cunningham et al., 1978)

En pacientes, los primeros estudios relacionados con la respuesta inmunitaria de los pacientes de Chagas se centraron en la respuesta humoral. La detección de anticuerpos reactivos frente al parásito fue y es una importante herramienta de diagnóstico de la infección en humanos y, ante esa asociación, se han realizado investigaciones para caracterizar mejor la respuesta humoral de los pacientes chagásicos crónicos (Otani et al., 2009).

Se han encontrado los anticuerpos reactivos a epítopes de galactosa que pueden mediar la lisis de formas tripomastigotes se encontraron en el suero de pacientes crónicos. Los “anticuerpos líticos” (AL) se encontraban en niveles más elevados en el suero de pacientes con la forma indeterminada que aquellos en la forma cardíaca de la enfermedad, sugiriendo tendría un papel protector frente a la infección (Kierszenbaum and Lima, 1983). Estudios relativos a otras clases de anticuerpos, por un lado, sugieren su participación en la patogenia de la enfermedad, ya que anticuerpos reactivos contra diversas estructuras del hospedador se encuentran en pacientes chagásicos crónicos. También se han descrito que en el suero de pacientes crónicos, existían anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* eran capaces de estimular la proliferación de linfocitos T y B de pacientes de Chagas. Es posible que los anticuerpos desempeñen un importante papel en la evolución clínica de la enfermedad de Chagas. Tal vez, el hecho de que la destrucción tisular observada en los pacientes de Chagas crónicos esté asociada a la presencia de infiltrados inflamatorios haya contribuido a que la mayoría de los estudios inmunológicos realizados en pacientes de Chagas se centren en la respuesta celular. Considerando la complejidad de las interacciones parásito-hospedador, es poco probable que un solo componente del sistema inmunológico esté asociado en exclusividad a la evolución de la enfermedad.

1.3.2.b.1 Generalidades de los antígenos de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi presenta una elevada complejidad antigénica, existiendo una gran heterogeneidad a nivel de antígenos entre cepas, clones (Alves et al., 1987) e incluso entre las distintas formas que adopta en su ciclo de vida (Rangel-Aldao et al., 1986). La interacción e internalización del parásito en la célula hospedadora son fenómenos complejos y no bien conocidos, en los que resulta esencial el establecimiento de estrechas interacciones entre las membranas de ambas células que finalmente llegan a fusionarse (Andrews and Colli, 1982). Como otros tripanosomátidos, *T. cruzi* tiene la peculiaridad como otros tripanosomátidos de adaptarse a ambientes muy diferentes. Desarrolla varios mecanismos de protección tanto pasiva como activa con el fin de sobrevivir a las distintas condiciones que presentan las células hospedadoras. *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado, debe entrar en la célula hospedadora para dividirse y como se ha comentado tiene la capacidad de invadir un amplio rango de células, tanto fagocíticas como no fagocíticas. *T. cruzi* es capaz de invadir células esencialmente no fagocíticas, tales como fibroblastos, en un proceso que constan de dos fases: una primera fase de adhesión y otra posterior de internalización activa en el interior de la célula parasitada (Van Voorhis et al., 1991). Hay claras evidencias de la existencia de receptores específicos, para moléculas del parásito en la membrana de la célula diana (Araujo, 1989). Las glicoproteínas de superficie juegan un papel relevante en los procesos infectivos (Gazzinelli et al., 1990), (Villalta et al., 1998), pero se desconoce en gran medida la regulación de su expresión génica, así como los mecanismos de respuesta inmunológica a las mismas.

1.3.2.2.b.2 Proteínas antigénicas de *T. cruzi*

- **KMP11** (kinetoplastid membrane protein 11kDa) es una glicoproteína de la membrana de kinetoplástidos de 11 kDa. Se expresa abundantemente en todos los estadios del ciclo de vida del parásito con una mayor abundancia en las formas parasitarias que interactúan con el insecto vector.

Es específica de tripanosomátidos manteniendo un alto grado de homología y conservación entre todos ellos y no encontrándose en eucariotas superiores. Se encuentra asociada tanto a la membrana del parásito, al citoesqueleto y al flagelo y

posee una alta capacidad inmunogénica (Goel et al., 1999),(Thomas et al., 2000),(Thomas et al., 2001),(Carvalho et al., 2005). Todas estas características sugieren que esta proteína tiene un papel importante en la biología de tripasomátidos.

Los primeros estudios sobre esta proteína se hicieron con promastigotes de *Leishmania donovani* donde se aisló de extractos totales del parásito encontrándose asociada a lipofosfoglicano (LPG) y en la membrana celular del parásito.

El gen codificante de KMP11 está organizado en una agrupación formada por 4 unidades génicas colocadas en tándem y localizada en un cromosoma de 1,9 Mb. (Thomas et al., 2000). La abundancia de KMP11 de *T.cruzi* está regulada a nivel de traducción.

Una característica fundamental de esta proteína es que desempeña funciones inmunológicas muy importantes en la infección. Estas funciones son: inmunoestimulación de células específicas B (inducción de proliferación celular y respuesta citotóxica e inmunoprotección en modelos animales (Planelles et al., 2002), (Thomas et al., 2001), (Lasso et al., 2010).

Además, se ha descrito la existencia de una fuerte respuesta humoral generada frente a la proteína KMP11 en pacientes de Chagas (Flechas et al., 2009), siendo estos anticuerpos principalmente de isotipo IgG 1 y en menor proporción los isotipos IgG 2, 3, 4.

Los epítopes de células T y B presentados en la proteína KMP11, están conservados en las proteínas homólogas presentes en otros tripanosomátidos como es el caso de KMP11 de *T. rangeli* (Diez et al., 2005).

- **HSP70** (Heat Shock Protein 70kDa) es una proteína de choque térmico de 70 kDa. Pertenece a la familia de las chaperonas que tienen una potente actividad moduladora de la conformación de proteínas (Craig et al., 1993) y adyuvante tanto endógena como exógena (Asea et al., 2002), (Vabulas et al., 2002). La capacidad adyuvante de HSP70 se debe a la interacción específica de HSP70 con los receptores de células dendríticas y macrófagos, estimula tanto la respuesta inmune innata y una respuesta adaptativa con la intervención del complejo mayor de histocompatibilidad.

La HSP70 de tripanosomátidos se localiza en el citoplasma y en la mitocondria. En condiciones de choque térmico la proteína citoplasmática migra masivamente al núcleo (Martin et al., 1993) o a la membrana celular (Giambiagi-deMarval et al., 1996), mientras que la HSP70 mitocondrial queda confinada en el kinetoplasto en

las mismas condiciones (Olson et al., 1994). Se ha descrito, además que HSP70 de *T. cruzi*, participa en procesos de tolerancia celular a choques químicos y térmicos.

Los genes que codifican la HSP70 de *T. cruzi* se encuentran agrupados en tándem (Requena et al., 1988), y la extracción de sus mensajeros se induce en epítomastigotes a 37°C, al igual que en fase estacionaria de crecimiento (Requena et al., 1992). La HSP70 de *T. cruzi* mantiene un 88% de identidad a nivel de secuencia de nucleótidos con su homóloga en *Trypanosoma brucei* (Requena et al., 1988).

Se ha descrito una fuerte capacidad de inducción de una respuesta humoral antígeno específica para la proteína HSP70 de *T. cruzi*. Interesantemente, no existe reconocimiento cruzado con la proteína homóloga humana. Este resultado resulta sorprendente puesto que la vista de que la homología entre ambas proteínas de choque térmico es del orden del 75% (Requena et al., 1992).

Se ha descrito que HSP70 de *T. cruzi* tiene la capacidad de estimular esplenocitos o células linfoides de ratones sin restricciones de haplotipo.

Se ha mostrado in vitro que la proteína HSP70 de *T. cruzi* tiene per se un singular efecto estimulador sobre células de bazo y ganglio de ratones naive (Maranon et al., 2000), el cual da lugar a una rápida e intensa estimulación de células T, seguida de un proceso de internalización de los receptores CD3+ y TCR $\alpha\beta$ y un proceso de apoptosis no dependiente de Fas/L. Asimismo, se evidencia que la inmunización de ratones de distinto haplotipo con un vector vacuna que porta el gen KMP11 de *T. cruzi* (Thomas et al., 2000) fusionado al codificante para la proteína HSP70 induce una producción de anticuerpos IgGs de isotipo IgG2a, específicos para KMP11. Además, los ratones C57BL/6-A2 inmunizados con la proteína de fusión KMP11-HSP70, pero no los inmunizados con la proteína KMP11 aislada, inducen una respuesta CTL frente a células Jurkat-A2/Kb expresando la proteína KMP11, así como frente a dichas células cargadas con distintos péptidos de KMP11 de probada unión a la molécula A2. Así, se ha evidenciado la existencia en el antígeno KMP11 de *T. cruzi* de un epítipo A2 inmunodominante y un epítipo A2 crítico (Maranon et al., 2001). Interesantemente, los ratones inmunizados con el gen quimérico se protegen en un 50% frente a la infección experimental tardía, tres meses post-última inmunización, con formas infectivas de *T. cruzi* (Planelles et al., 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que la proteína HSP70 de *T. cruzi*, tanto sola como fusionada a la KMP11, así como un fragmento de la HSP70, es capaz de

madurar células dendríticas murinas y humanas (Planelles et al., 2002); (Cuellar et al., 2008). Asimismo, se ha evidenciado que la proteína HSP70 de *T. cruzi*, a diferencia de las procedentes de otros organismos, es capaz de inducir in vivo e in vitro, frente al hapteno asociado, una respuesta inmunológica mixta (IgG1 e IgG2a) la cual, interesantemente, resulta ser independiente de los receptores TLR2 y TLR4 (Qazi et al., 2007). Asimismo, se han identificado cuatro epítopes inmunodominantes restringidos a clase I en la secuencia de la proteína Hsp70 de *T. cruzi* siendo, dos de ellos, además, reconocidos por CTLs de pacientes chagásicos (Maranon et al., 2011). En resumen, todos estos datos son una evidencia clara de que las HSPs juegan un importante papel en la activación y modulación de la respuesta inmunitaria, quedando la puerta abierta a una nueva tecnología con aplicaciones tanto biotecnológicas como biosanitarias.

- **PFR2** (Paraflagellar rod 68kDa) es una proteína paraflagellar, localizada en el flagelo y bolsillo flagelar de los kinetoplastidos, euglenoides y algunos dinoflagelados, y se postula que está implicado en la movilidad del parásito (Clark et al., 2005),(Bastin et al., 1998). El filamento paraflagelar del parásito está formado por proteínas filamentosas que no se parecen a otras proteínas caracterizadas del citoesqueleto. Son exclusivas de protistas y no se han encontrado en eucariotas superiores, lo que las convierte en un potencial blanco para el desarrollo de medicamentos. Se encuentra altamente conservada en los tripanosomátidos de *T. brucei* y *T. cruzi* (Machado and Ayala, 2001).

PFR2 ha sido identificada como un antígeno protector, muestra alta conservación entre cepas de tripanosomátidos (Luhrs et al., 2003). PFR2 resulta esencial para la viabilidad de *T. brucei* (Bastin et al., 1998). También se ha descrito que el gen homólogo a la PFR2 de *T. cruzi* juega un papel crítico en la movilidad y supervivencia del parásito de *Leishmania mexicana* (Santrich et al., 1997).

Por otra parte, se ha descrito que las infecciones experimentales con PFRs inducen inmunidad protectora frente a *T. cruzi*, en ratones inmunizados con estas proteínas PFR purificadas de la fracción flagelar del parásito, sugiriéndose que tal efecto estaría mediado por una respuesta celular (Wrightsmann and Manning, 2000). Además, se ha comprobado que en los ratones infectados se generan linfocitos T CD8+ frente a epítopes presentes en esta proteína y que la inmunización con vacunas que portan el gen codificante de PFR2 es protectora (Morell et al., 2006). La proteína PFR2 proporcionan inmunidad protectora cuando

se aplica individualmente sola como se ha descrito en *Leishmania mexicana* (Saravia et al., 2005) o co-administrada junto PFR1-PFR3 frente a la infección experimental por *T. cruzi* (Luhrs et al., 2003).

- **gp63** (glycoprotein 63kDa) es una glicoproteína de superficie con actividad proteasa (metaloproteasa). Se une a la membrana del parásito mediante anclaje GPI (Glicosilfosfatidilinositol). En *Leishmania*, esta proteína se localiza en la superficie del parásito en una gran densidad y está muy conservada entre las distintas especies de *Leishmania*.

Esta molécula se identificó inicialmente en el estadio promastigote del parásito, y posteriormente, se vio que también se encontraba presente en el estadio amastigote intracelular.

La actividad de la proteína varía dependiendo de los distintos estadios. Así, en el estadio amastigote, la actividad de la misma es un 1% menor que la observada en el estadio promastigote. La proteína es también procesada de distinta forma según el estado del ciclo: en promastigotes se localiza en la superficie celular, mientras que en amastigotes se encuentra mayoritariamente en el bolsillo flagelar aunque una pequeña parte esté presente en la membrana celular, pudiendo encontrarse también en la fracción lisosomal. En *T. cruzi*, se ha descrito la actividad metaloproteasa de gp63 preferentemente en el estadio epimastigote frente a los estadios tripomastigote y amastigote (Kulkarni et al., 2009).

A pesar de ello, la función precisa de gp63 no es del todo conocida, aunque se sabe que es un factor de virulencia muy importante de *Leishmania*. Es una proteína de superficie abundante en promastigotes, suponiendo un 1% de las proteínas totales. Participa en la unión del parásito al macrófago debido a la interacción con el receptor CR3, siendo esta función independiente de la actividad proteolítica. Distintos estudios sugieren que gp63 permite al parásito utilizar la capacidad de opsonización del complemento para así entrar en el macrófago evitando los efectos líticos de éste. Así, parásitos deficientes en gp63, presentan una supervivencia mucho menor dentro de los macrófagos que los parásitos con expresión de gp63 sin mutar (Kulkarni et al., 2006).

La proteína gp63 de *Leishmania* presenta estructuralmente tres dominios bien diferenciados. En la región central de la proteína está directamente implicada en la interacción con el macrófago (Puentes et al., 1999) y se ha publicado que esta parte de la Tgp63 es la que posee reconocimiento antigénico (Fernandez-Villegas et al., 2011). Este fragmento tiene un tamaño de 28kDa

▪ **TcCA-2** es una proteína de membrana de *T. cruzi* con alta capacidad inmunogénica de tamaño 85 kDa. Se expresa en los estadios tripomastigote y epimastigote. Esta proteína se caracteriza por tener en sus extremos C-terminal y secuencias peptídicas de 12 aminoácidos organizadas en tándem. Las proteínas parasitarias con motivos repetidos han mostrado una gran capacidad antigénica evidencian por el alto número de pacientes con Chagas con anticuerpos específicos, alcanzando una especificidad del 99% y sensibilidad del 93% (Umezawa et al., 1999),(Gruber and Zingales, 1993).

Esta proteína fue identificada enfrentando sueros de individuos infectados frente a una librería de expresión de *T. cruzi* construída en el fago λ gt11 (Hoft et al., 1989), (Ibanez et al., 1988), (Levin et al., 1989).

Trabajos anteriores han descrito homólogos de esta proteína, el antígeno TCR39 y B13, que se caracterizan porque son altamente reconocidos con alta sensibilidad por sueros de pacientes de Chagas en fase crónica (Duranti et al., 1999; Ibanez et al., 1988). Otros autores han utilizado péptidos de esta proteína (Almeida et al., 1990), (Krieger et al., 1992),(Levin et al., 1991) y también mezcla de ellos o construcción de quimeras que aumenta la sensibilidad en el serodiagnóstico de pacientes de Chagas (Camussone et al., 2009).

La proteína TcCA-2 contiene el epítipo específico de *T. cruzi* (TcMe) que se ha detectado en la internalización del parásito en la célula hospedadora (Martin et al., 1997).

1.4 BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Como ya se ha indicado después de la fase aguda, la tripanosomiasis americana puede derivar a una etapa denominada indeterminada o bien desarrollar cardiomiopatía crónica o alteraciones digestivas. Actualmente, no se conocen los mecanismos que intervienen en la evolución de la enfermedad y que determinan que solo algunos pacientes desarrollen manifestaciones severas como arritmias graves y otros no (Rassi et al., 2010),(Junqueira Jr, 1991),(Laguens et al., 1999).

Por tanto, es necesario el desarrollo de marcadores tempranos que proporcionen información de la progresión de la enfermedad, que permita establecer cuándo un paciente en fase crónica indeterminada evoluciona a fase crónica con manifestaciones cardíacas o digestivas.

Los estudios realizados en modelo murino han demostrado que existe una correlación positiva entre los infiltrados inflamatorios y la enzima creatina kinasa

(CK). CK está implicada en procesos energéticos. Una de sus isoenzimas CK-MB está relacionada con músculo cardíaco y es uno de los marcadores asociados a daño miocárdial (de Souza et al., 2000; Pinazo et al., 2011).

Otros trabajos han encontrado marcadores tempranos de la evolución de la enfermedad de Chagas a través de la técnica ELISA frente a proteínas recombinantes en pacientes tratados con benznidazol. Estudios longitudinales en grupos de pacientes de Chagas utilizando antígenos de citoplasma y de la membrana, evidencian que el 100% de los pacientes incluidos en el estudio, disminuyeron el nivel de anticuerpos (Sanchez Negrette et al., 2008). El desarrollo de la técnica ELISA con una mezcla de los antígenos utilizados en el sistema SAPA (Shed acute-phase antigen) detectados en la fase aguda, antígenos 1, 2, 30 detectados en fase crónica y antígenos 13 y 36 detectados durante la fase aguda y la crónica (da Silveira et al., 2001; Ibanez et al., 1988; Vergara et al., 1991) no presentaron disminución en el nivel de anticuerpos. Por el contrario la realización de la técnica de ELISA con dichos antígenos recombinantes mencionados antes y ensayados individualmente, mostraron disminuciones en el nivel de anticuerpos tras el tratamiento, siendo la proteína recombinante 13 la mejor candidata para la detección de seroconversiones a lo largo del tratamiento. (Sanchez Negrette et al., 2008). Relacionado con los estudios anteriores, se ha publicado un estudio donde se analiza la respuesta post-tratamiento con benznidazol de un grupo de pacientes de Chagas, utilizando un panel de proteínas recombinantes (paraflagelares, de choque térmico, ribosomales). Se observó que los pacientes exhibían un patrón serológico individualizado muy conservado a lo largo del tiempo. Así, el estudio de la respuesta humoral en 4 pacientes post tratamiento evidenció una disminución del nivel de anticuerpos en la mayoría de los antígenos analizados. Sin embargo en 2 pacientes estudiados el patrón presentado frente a las proteínas a lo largo del tratamiento exhibió estabilidad o aumentos en algunos de los antígenos ensayados. Los autores sugieren que la estabilidad del patrón de reconocimiento o el aumento del nivel de anticuerpos a lo largo del tratamiento podría asociarse a fallo terapéutico (Cooley et al., 2008).

Diversos trabajos han propuesto las proteínas CRA (antígenos del citoplasma de las formas epimastigote y amastigote) y FRA (antígenos del flagelo de las formas tripomastigote y epimastigote) como biomarcadores o moléculas indicadoras de las distintas fases de la enfermedad. Así, Vercosa y colaboradores, describieron que el nivel de anticuerpos de isotipo IgG2 frente al antígeno FRA es capaz de distinguir pacientes en fase IND y CARD (Vercosa et al., 2007).

Vaconcelos y colaboradores utilizaron también dichas proteínas y mediante ELISA, cuantificaron el nivel de anticuerpos de isotipo IgA, demostrando que, tanto las proteínas CRA como FRA, son capaces de discernir pacientes en fase Indeterminada (IND) de pacientes con manifestaciones clínicas cardíacas y digestivas (CARD-DIG), IND frente DIG, CARD frente CARD-DIG y CARD frente DIG (Vaconcelos et al., 2010). Los niveles de anticuerpos IgA diferencian los pacientes en fase crónica asintomática y fase crónica sintomática.

Más recientemente, VMB Lorena propuso que las citoquinas IFN- γ , IL4 y TNF- α podrían ser utilizadas como marcadores inmunológicos de la forma clínica cardíaca de la enfermedad de Chagas. Esta afirmación es consecuencia de los resultados obtenidos tras analizar, por citometría de flujo, la cantidad de citoquinas producidas por linfocitos y monocitos tras estimular con la proteína CRA y FRA en donantes sanos, IND, CARD de tipo I y CARD de tipo II. Los autores observaron que la liberación de citoquinas IFN- γ y TNF- α frente a la proteína CRA es mayor en pacientes crónicos cardíacos que en pacientes crónicos indeterminados. (Lorena et al., 2010)

Investigaciones en inmunidad celular antígeno-específica han mostrado que la frecuencia de IFN- γ producidas por linfocitos protectores de IFN- γ tras estimulación con proteínas totales del parásito, se asoció con una exposición reciente al parásito y la forma clínica en los pacientes en fase crónica. Las respuestas celulares observadas frente a proteínas totales del parásito revelan una alta frecuencia de respondedores de IFN- γ en pacientes con síntomas medios y una disminución en pacientes con síntomas más severos de la enfermedad (Laucella et al., 2004).

Por otra parte, el estudio fenotípico de los linfocitos T CD8⁺ circulantes mostró un aumento en el número total de células efectoras/memoria en sujetos con dolencias cardíacas frente a individuos no infectados. Estos resultados fueron consistentes con la hipótesis de un agotamiento gradual clonal en la población CD8⁺, quizás como resultado de una estimulación continua antigénica por células infectadas (Albareda et al., 2006).

Estudios del perfil de secreción de citoquinas en leucocitos en fase crónica *ex vivo*, mostraron que, en ensayos *ex vivo*, los pacientes IND presentaban una producción espontánea de citoquinas inflamatorias, mientras que los pacientes CARD presentan un perfil proinflamatorio (Vitelli-Avelar et al., 2008). Estudios del fenotipo de las células T en diferentes formas clínicas de la enfermedad, evidenciaron que *in vivo* los pacientes IND poseen células T reguladoras aumentadas sugiriendo que IL10 controla la enfermedad en pacientes IND (de Araujo et al., 2011).

Otros estudios han descrito potenciales biomarcadores en autoanticuerpos que reaccionan frente a receptores autonómicos (RA) betaadrenérgicos y colinérgicos muscarínicos caracterizados porque están asociados al miocardio. La presencia de anticuerpos antirreceptores-RA se asoció significativamente con la fase de la enfermedad, ya que los pacientes de Chagas con cardiopatía presentaban, de manera más frecuente, anticuerpos anti-RA que los pacientes crónicos en fase indeterminada. La presencia de anticuerpos antirreceptores autonómicos podría ser un marcador de miocardiopatía chagásica y podría asociarse con arritmias y alteraciones de la variabilidad de la frecuencia cardíaca. (Borda ES and May;54(2);, 1996) Relacionado con estos estudios en niños en fases tempranas de la infección con *T. cruzi*, se observó que los pacientes de Chagas ya reconocían al receptor anti-RA y además secretaban IFN- γ de manera significativamente mayor que los donantes sanos. Cuando se realizó el estudio post-tratamiento con benznidazol, los pacientes de Chagas presentaron una disminución significativa tanto del nivel de anticuerpos frente al receptor RA como de la secreción de IFN- γ . Los resultados revelaron la importancia de este marcador para evaluar el efecto del tratamiento con benznidazol así como la predisposición de los pacientes a desarrollar la enfermedad en fase crónica cardíaca (Cutrullis et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La enfermedad de Chagas cursa con una fase aguda que frecuentemente es subclínica. En ausencia de tratamiento la enfermedad se cronifica, cursando inicialmente con un estadio asintomático (fase indeterminada), frecuentemente de larga duración (15-25 años) y caracterizada por la existencia de un balance entre la respuesta inmune del hospedador y la replicación del parásito. Este equilibrio es sumamente frágil, pudiendo desembocar (aproximadamente, 30-40% de los casos) en una proliferación del parásito en los tejidos, dando lugar a las patologías graves de la enfermedad (fase crónica sintomática, especialmente cardíaca y/o digestiva). Así, la base etiológica de la fase crónica de la enfermedad de Chagas está regida por el daño causado por la persistencia tisular de *Trypanosoma cruzi*.

Actualmente se dispone, esencialmente, de dos fármacos para tratar la enfermedad de Chagas: nifurtimox y benznidazol. Estos fármacos han mostrado ser muy efectivos en pacientes en fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, su eficacia en la fase crónica está bajo estudio y existen ciertas controversias sobre la misma y, consecuentemente, sobre su utilización de forma generalizada. Ambos fármacos tienen, frecuentemente, efectos secundarios adversos caracterizados por manifestaciones digestivas, cutáneas y hematológicas de diferente grado de intensidad.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se realiza, principalmente, mediante técnicas serológicas convencionales las cuales tienen una alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, estos métodos de diagnóstico no son eficaces para determinar el estatus clínico del paciente en su fase crónica, ni evaluar su evolución tras el tratamiento y por tanto para determinar la eficacia del mismo. La técnica molecular de PCR si bien ha mostrado ser útil para detectar fallos terapéuticos, tiene el serio inconveniente de presentar un alto porcentaje de falsos negativos.

Sobre la base de los anteriores considerando se establecieron los siguientes objetivos:

1. Identificar moléculas capaces de evaluar, mediante tests serológicos, el estado de patología de pacientes de Chagas en fase crónica de la enfermedad.
2. Identificar marcadores serológicos que permitan detectar, a corto plazo, el impacto terapéutico del benznidazol en pacientes con Chagas crónico.
3. Establecer sistemas de diagnóstico útiles en clínica para determinar la eficacia terapéutica.
4. Determinar la eficacia de los marcadores identificados en el diagnóstico de la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* y estudiar el papel de la capacidad de respuesta innata en dicha transmisión.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Productos químicos

Se utilizaron reactivos procedentes de las firmas Merck, Sigma, Roche, Promega, Gibco, PAA, Invitrogen, Thermo Scientific y Bio-Rad. Las membranas para la inmovilización de macromoléculas se obtuvieron Millipore (PVDF). Las películas autorradiográficas utilizadas fueron de las casas Kodak y Agfa.

Tampones

- Laemmli: Tris-HCl 50mM pH=6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10% (Laemmli, 1975).
- Tampón de carga de ácidos nucleicos 10x geles agarosa: glicerol 70% (v/v), sarcosil 5 %, azul de bromofenol (BPB) 2 % (P/V), EDTA 0,1 M pH 8.
- Tampón de electroforesis de proteínas 10x: Tris-base 30,3g/l, glicina 144,2 g/l, SDS 10g/l.
- Tampón de transferencia de proteínas 1x: Tris base 25mM, glicina 14,4mM, 0,1% SDS, metanol 15%.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,13M, Na₂HPO₄ 0,07M, NaH₂PO₄ 0,003M pH 7,2.
- Tampón SSC 20x: NaCl 3M, citrato sódico 0,3M pH 7,2.
- Tampón TAE 50x: Tris-ClH 2M pH=7,2, EDTA 50mM pH=8, bromuro de etidio 10mg/ml, ácido acético hasta pH=7,2 y agua destilada hasta 1l.
- Tampón TBS1x: Tris-ClH 10mM, pH=7,5, NaCl 150mM.

Soluciones

- Mezcla clorofórmica: Cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1.
- Fenol: el fenol destilado se saturó y equilibró con Tris-ClH 0,1M pH=8. En el momento de utilizar se añadió 8-hidroxiquinoleína hasta 0,1% y se almacenó a 4°C.

Enzimas

- Lisozima de clara de huevo (Sigma)

- *High Fidelity Taq* ADN polimerasa (Roche)
- ADN Polimerasa de *Termus acuaticus* (Taq) (Boehringer)
- Proteínasa K (Boehringer)

Anticuerpos

- Goat Anti Human IgG horseradish peroxidase (Invitrogen)
- Anti-Mouse IgG acoplado a peroxidasa (Sigma)

Medios de cultivo

- Medio LB (Luria Bertani): Bactotripton 10g/l (Sigma), extracto de levadura 5g/l (Difco), NaCl 10g/l, pH 7-7,2.
 - Medio LB-agar: Medio LB líquido y agar al 15% (p/v).
 - Medio LIT (Liver infusion tryptose): NaCl 4g, KCl 0,4g, Na₂HPO₄ · 7 H₂O 15g, glucosa 2g, infusión de hígado 3g, tripton 5g, hemina 2g, llevar con H₂O destilada hasta 1 litro. Se añade 10% de suero bovino fetal inactivado.
 - Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium): con L-Glutamina y suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado.
- Medio SOC (Super Optimal broth with Catabolic repressor): 20g/l tripton, 5 g/l extracto de levadura, 0,5 g/l NaCl, 0,25 mM KCl, glucosa 20 mM, pH 7.

Cepas bacterianas

Todas las cepas bacterianas empleadas son de la especie *Escherichia coli*.

- XL1-blue (genotipo: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, F'proAB, Tn10(tet^R), LacI^a M15), para la transformación y propagación de los plásmidos.
- M15 (NaIS StrS rifS lac- ara- mtl- F- recA+ uvr+ pREP4) para la expresión de proteínas recombinantes.
- BL21 (F-dcm omp T hsdS(rB-mB)-gal)

Líneas celulares

- LLCMK2: línea fibroblastoide procedentes de riñón de mono

Cepas de *Trypanosoma cruzi*

- Los estudios descritos en este trabajo han sido realizados en la cepa Y de *Typanosoma cruzi*

Proteínas utilizadas

- KMP11 (Kinetoplastid Membrane Protein 11kDa)
- HSP70 (Heat Shock Protein 70kDa)
- PFR2 (Paraflagellar rod 68kDa)
- Tgp63 (Truncated glycoprotein 28kDa)

Péptidos

Tabla M1. Péptidos de la proteína TcCA-2

PÉPTIDO	SECUENCIA	Pm
3972	FGQAAAGDKPPP	1047,3
6303	FGQAAAGDKPAP	1327,4
3973	FGQAAAGDKPSL	1053,4
3963	FGQAAAGDKLSL	1069,5
6173	FGQAAAGGKPSL	1103,4
6175	AGQAAAGDKPSL	1085,3
6380	FAQAAAGDKPSL	1189,4
6383	FGAAAAGDKPSL	1104,5
3964	FGQAAAGHKPAP	1043,4
3965	FGQAAEGDKPPP	1043,7
3966	FGQAAAADKPSL	1067,4
3974	FGQAAAGDLPSP	1022,3
6174	FGQAAAGDGPSL	1090,3
6382	AAQAAAGDKPSL	1056,4
6304	FAQAAAADKPSL	1387,4
6172	FGQAAAGERPSL	1203,4
6381	AAAAAAGDKPAA	998,3
6302	FAQAAAADKPAA	1329,4
6385	QAAAGDKPSLFG	1161,4
6384	AAGDKPSLFGQA	1161,4

Patrones de peso molecular para electroforesis

i) Electroforesis de ADN

- Marcador de ADN de 1Kb (1Kb DNA Ladder, Bioron). Fragmentos: 10,0, 8,0, 6,0, 5,0, 3,0x2, 2,5, 2,0, 1,5, 0,5 y 0,25 Kb.
- Marcador de ADN de 100pb (100pb DNA Ladder, Bioron). Fragmentos: 1000 (190ng), 900 (170ng), 800 (150ng), 700 (90ng), 600 (110ng), 500x2 (130ng), 400 (80ng), 300 (40ng), 100 x 2 (40ng).

ii) Electroforesis de proteínas

- "Precision Plus Protein" (Bio-Rad): Aproximadamente 250000, 150000, 100000, 75000, 50000, 37000, 25000 y 20000 Da.
- "Prestained SDS-PAGE Standars" (Bio-Rad): Aproximadamente 200000, 116250, 97400, 45000, 31000, 21500, 14600 y 6500 Da.

Oligonucleótidos sintéticos

- pQE forward -5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG-3'
- pQE reverse -5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'
- TCZ1 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3
- TCZ2 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG- 3'

Sujetos a estudio

Tabla M2. Cohorte de pacientes empleada para el estudio de la respuesta humoral frente a las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y Tgp63 de pacientes de Chagas bajo tratamiento con benznidazol.

Individuos	Media de edad en años(rango)	Hombres (%)	Mujeres (%)	Origen (%)
Donantes sanos (n=22)	31.5 (18-54)	14 (63,6)	8 (36,4)	15 Bolivia (70); 7 Ecuador (30)
Chagas IND (n=15)	33.5 (22-56)	14 (93,3)	1 (6,67)	13 Bolivia (86,6); 1 Brasil (6,3); 1 Paraguay (6,7)
Chagas CCC (n=16)	44.1 (27-68)	9 (56,3)	7 (43,7)	14 Bolivia (87,5); 1 Brasil (6,3); 1 Argentina (6,3)
Chagas DIG (n=15)	39.1 (24-56)	10 (66,6)	5 (33,4)	14 Bolivia (93,3); 1 Argentina (6,7)
Lupus (n=6)	-	-	-	6 España (100)
Celíacos (n=4)	-	-	-	4 España (100)
Artritis reumatoide (n=5)	-	-	-	5 España (100)
Lepra (n=8)	-	-	-	8 Colombia (100)
Tuberculosis (n=8)	-	-	-	8 Colombia (100)
Malaria (n=8)	-	-	-	8 Tanzania (100)

Tabla M3. Cohorte de pacientes empleada para el estudio diferencial de la fase de la enfermedad de Chagas

Individuos	Media de edad en años(rango)	Hombres (%)	Mujeres (%)	Origen (%)
Donantes sanos (n=30)	30.6 (24-50)	6 (20,7)	23 (79,3)	26 Bolivia (86,6); 4 Ecuador (13,3)
Chagas IND (n=28)	31.5 (12-47)	8 (28,6)	20 (71,4)	27 Bolivia (96,4)
Chagas CCC (n=38)	40.0 (28-74)	16 (42,1)	22 (57,9)	38 Bolivia (100,0)
Chagas DIG (n=21)	33,7 (12-54)	8 (38,0)	13 (62,0)	21 Bolivia (100,0)
Chagas agudo (n=11)	6 (4-6)	5 (45,5)	6 (55,5)	11 Venezuela (100,0)
Cardiopatías no chagásicas (n=38)	-	-	-	38 España (100,0)
Lupus (n=6)	-	-	-	6 España (100,0)
Celíacos (n=4)	-	-	-	4 España (100,0)
Artritis reumatoide (n=5)	-	-	-	5 España (100,0)
Leishmania (n=21)	-	-	-	21 Colombia (100,0)
Tuberculosis (n=11)	-	-	-	11 Colombia (100)
Malaria (n=11)	-	-	-	8 Tanzania (100)

Tabla M4. Cohorte de pacientes para el estudio de la inmunología innata y adquirida de 2 pacientes pediátricos de Chagas infectados vía congénita

Individuos	Edad en meses	Hombres	Mujeres	Origen
Donantes sanos (n=10)	6	8	2	España
Chagas congénitos (n=2)	6	2	0	España

3.2 MÉTODOS

Cultivo de formas tripomastigotes de *T.cruzi*

La obtención de formas tripomastigotes *in vitro* se realizó infectando líneas celulares epiteliales LLC-MK2 (Andrews and Colli, 1982). Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado y se crecieron en monocapa a 37°C y 5% de CO₂. Alcanzada la semiconfluencia, los cultivos se infectaron con una proporción de tripomastigotes de 3:1. A partir del cuarto día de incubación se empezó a recoger del sobrenadante las formas tripomastigotes del parásito y se lavó 3 veces con solución salina PBS.

Extracción de proteínas totales de formas tripomastigotes y amastigotes de *T.cruzi*

La obtención del lisado de antígenos solubles de *T.cruzi* (STcA) se realizó utilizando formas tripomastigotes de la cepa Y, obtenidas de ratones infectados, para infectar monocapa de fibroblastos LLC-MK2 a una multiplicidad de infección de 5:1 durante 12 h. Las células se lavaron para retirar los parásitos que no habían infectado las células y se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% CO₂. Se obtuvo una mezcla de parásitos amastigotes:tripomastigotes (3:1) del sobrenadante de las mismas, que se lavó con PBS. Los parásitos se resuspendieron en buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,05% NP-40, 50mM NaCl, 1mM PMSF, 1µg/ml leupeptin) y la muestra se sometió a 3 ciclos de sonicación de 5s a una frecuencia de 50-62 KHz. El extracto se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante, que se conservó en alícuotas a -80°C hasta su uso.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La separación de los fragmentos de ADN se realiza sobre geles de agarosa entre 0,8-2% (p/v) con 100µg/ml de bromuro de etidio, en cubetas de desarrollo horizontal. Como tampón de carga de alta densidad se utilizó el descrito como de tipo II (Sambrook et al., 1989). El tampón de electroforesis utilizado fue TAE 1X y las condiciones de electroforesis fueron 100V durante una hora. Para la

visualización de los ácidos nucleicos con luz ultravioleta se utilizó el Transiluminador (Transiluminador Universal hoodII, Bio-Rad).

Cuantificación de ácidos nucleicos

Las mediciones se realizaron en el Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer empleando directamente 1µl ó 2µl de la muestra. El instrumento cuantifica la concentración de ácidos nucleicos de la muestra midiendo la absorbancia de las mismas a 260nm y tomando como coeficiente de extinción $50 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para ADN. Determina la pureza del ácido nucleico según la relación $A_{260}:A_{280}$, aceptándose como suficientemente puro si dicha relación es superior 1,8.

Asimismo, la relación $A_{260}:A_{230}$ también determina el grado de pureza de la muestra. Dicha relación suele ser a menudo mayor que la relación $A_{260}:A_{280}$. Si la relación $A_{260}:A_{230} \leq 1,8-2,2$ puede indicar la presencia de contaminantes.

Transformación de ADN en *E. coli*

- Preparación de células de *E. coli* competentes

A partir de un pequeño cultivo crecido durante toda la noche, se realizó una dilución 1:50 en medio LB. Las bacterias se crecieron hasta una densidad óptica de 0,2-0,4 a 600nm, y se recogieron mediante centrifugación a 1500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Por último, fueron suspendidas en 1/20 del volumen original en una solución 0,1M de CaCl_2 y se dejaron en hielo. Transcurridos al menos 30 minutos se añadió 30% de glicerol y una vez bien mezcladas las células, se alícuotearon en tubos de centrifuga y se almacenaron a -80°C.

- Choque Térmico del ADN en células de *E. coli* competentes

Las bacterias competentes que se encuentran almacenadas a -80°C en alícuotas de 100µl se descongelaron sobre hielo. Se añadió el ADN a las células, se mezclaron suavemente y se dejaron en hielo. Transcurridos 30 minutos las bacterias se introdujeron en un baño a 42°C durante 45 segundos y rápidamente de nuevo se colocaron en hielo durante 3 minutos. A continuación, se añadió 900µl de medio LB o SOC (a temperatura ambiente o 37°C) y se incubaron en un baño a 37°C. Transcurrida aproximadamente una hora, las células se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico de selección adecuado y se incubaron a 37°C de 12-16 horas.

En plásmidos que portan el gen de resistencia a la ampicilina, como los originados a partir de pQE, la selección de los transformantes se basó en el hecho de que solamente las células transformadas pueden crecer en un medio que contenga este antibiótico. Las colonias obtenidas en los distintos clonajes se cultivaron en medio LB líquido con ampicilina, con la finalidad de extraer el ADN plasmídico y verificar la presencia del inserto y la orientación del mismo mediante digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción y posterior secuenciación.

Selección de colonias en plásmidos de expresión

La serie de plásmidos de expresión pQE permite una alta expresión de proteínas recombinantes mediante la inserción de un ADN codificante en fase con una cola de seis histidinas, que faculta su purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel. La expresión de esta proteína queda bajo el control del promotor T5 que tiene asociada dos secuencias el operador lac0 y es, por tanto, inducible por IPTG. Para seleccionar clones que expresan una proteína en cuestión, las colonias crecidas después de la transformación de la bacteria por choque térmico se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa, que se coloca sobre otra placa de LB-agar con IPTG 2mM. Esta placa se incubó durante 4 horas para permitir la inducción de la proteína recombinante. A continuación la membrana se despegó de la placa, y las proteínas bacterianas se fijaron a la nitrocelulosa colocando el filtro con las colonias hacia arriba sobre diversos papeles Whatman 3MM impregnados con:

SDS 10%: 10 minutos

Solución de desnaturalización: NaOH 0,5M, NaCl 1.5M. 5 minutos dos veces.

SSC 2X: 15 minutos.

Los filtros se dejaron secar al aire y se lavaron dos veces con TBS1X. Se incubó durante 1 hora con solución de bloqueo (5% de leche desnatada, 0,1% de Tween-20 en TBS1X). A continuación, se realizaron dos lavados de 10 minutos con solución de lavado (0,1% de Tween-20 en TBS1X). La incubación con el anticuerpo monoclonal anti6xhistidina en solución de bloqueo fue durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de lavar de nuevo, se incubó con el anticuerpo secundario, *anti-mouse* IgG acoplado a peroxidasa en solución de bloqueo, 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con TBS-Tween, el filtro se reveló con *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante y se tomaron imágenes autorradiográficas. Como

control se incluyó un filtro en el que se fijaron bacterias transformadas con el plásmido sin inserto.

Purificación de proteínas recombinantes

- Purificación de la proteína recombinante KMP11

Se realizó a partir de células M15 de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE₃₀-KMP11, disponible en el laboratorio (Thomas et al., 2000). La inducción de la proteína recombinante se realizó mediante la adición al cultivo de 0,1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C. La masa bacteriana se recogió mediante centrifugación. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento bacteriano se resuspendió en proporción 50:1 en tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 0,3 M, PMSF 100 mM y lisozima 1mg/ml). Después de agitar durante 1 hora a 4°C, la resuspensión se sonicó 8 minutos a intervalos del 50% y se centrifugó. El extracto de proteínas solubilizadas se incubó con la resina Ni²⁺ NTA equilibrada en tampón fosfato a pH 8 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras empaquetar la resina en columna, esta se lava con tampón de lavado (CINa 0,3 M, NaH₂PO₄ 50 mM, PMSF 1 mM y βME 10 mM) a pH 8, pH 7,5, pH 6 y 5,5. La proteína se eluye en este mismo buffer a pH 4. Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 16%.

- Purificación de la proteína recombinante HSP70

Se realizó a partir de células M15 de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE70, disponible en el laboratorio (Maranon et al., 2000). La inducción de la proteína recombinante se realizó mediante la adición al cultivo de 0,1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C. La masa bacteriana se recogió mediante centrifugación. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento bacteriano se resuspendió en proporción 20:1 tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 0,3 M, PMSF 100 mM y lisozima 1mg/ml). Después de agitar durante 1 hora a 4°C, la resuspensión se sonicó durante 8 minutos y se centrifugó. En el sobrenadante quedan las proteínas solubles, y la proteína HSP70 queda en la fase insoluble, en forma de cuerpos de inclusión.

Esta fracción insoluble se extrajo resuspendiéndola en tampón de sonicación (Tampón fosfato 50mM, NaCl 60mM, SDS 0,025%, pH 8) y agitándola

en frío durante al menos 2 horas. Después de sonicación, las fases soluble e insoluble se separaron mediante centrifugación en frío.

Para la unión de la proteína a la resina Ni²⁺ NTA, el extracto soluble se llevó a concentraciones finales de NaCl 0,3M, MgCl₂ 5mM, Glicerol 10%, β-mercaptoetanol 10mM, PMSF 1mM.

La resina se equilibró con la misma solución (tampón de purificación). La unión HSP70-resina se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación. La resina se empaquetó en una columna, y el eluido se volvió a pasar varias veces por la misma. La resina se lavó con tampón de purificación pH 6 sin β-mercaptoetanol, y la resina se lavó con el mismo tampón a pH 4. Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 12%.

- Purificación de la proteína recombinante PAR2

Se realizó a partir de bacterias *E. coli* BL21 transformadas, con el plásmido pCAL-n-EK-PAR2 disponible en el laboratorio (Morell et al., 2006). La inducción de la proteína recombinante se realizó mediante la adición al cultivo de 0,1 mM de IPTG durante 5 horas a 28°C. La masa bacteriana se recogió mediante centrifugación. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento bacteriano se resuspendió en proporción 20:1 en un tampón con la siguiente composición: Tris 50mM, NaCl 150mM, β-mercaptoetanol 10mM, Mg(AcO)₂, Imidazol 1mM, CaCl₂ 2mM, pH 8). Se procedió a la sonicación en dos ciclos de 8 minutos con un intervalo de reposo de unos 10 minutos y se centrifugó.

El extracto de proteínas solubilizadas se incubó con la resina Ni²⁺ NTA durante toda la noche a 4°C y durante 3 horas más a temperatura ambiente.

Se comenzó la elución utilizando un tampón que contiene Tris 50mM, β-ME 10mM, EGTA 2mM, pH 8. En este proceso de elución se incubó la resina con 3ml del tampón en agitación durante 1 hora con el fin de separar la mayor cantidad de proteína de la resina. Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 10%. Esta proteína purificada fue dializada frente a tampón fosfato salino durante toda la noche (12-16 h).

- Purificación de la proteína Tgp63Li

La sobreexpresión de la proteína Tgp63Li se realiza en la cepa M15 de *E. coli* en el plásmido pQE30 disponible en el laboratorio (Fernandez-Villegas et al., 2011). La inducción de proteína recombinante se realizó mediante la adición de 0,1

mM de IPTG al cultivo y se creció en agitación durante 3 horas a 37°C. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación. Se realizaron tres solubilizaciones en tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM). En la primera se añadió lisozima y se agitó durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se sonicó durante 8 minutos con pulsos al 40%. Cada uno de los extractos de proteínas solubilizadas se incubaron con la resina equilibrada en tampón fosfato a pH 8 durante toda la noche a temperatura ambiente. La resina Ni²⁺ NTA se lavó con tampón fosfato suplementado con PMSF 1 mM, βME 10 mM y Glicerol 10%, de pH 8 a pH 6. La elución de la proteína se realiza a pH 4.5 (mismo tampón sin glicerol y sin βME). Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 16%.

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida se empleó el sistema Mini-Protean III Cell (Bio-Rad). La concentración de geles variaba en función del tamaño de la proteína que se quería discriminar. Por ello, se usaron geles de un rango de concentración de 10-16%, usando el protocolo descrito por Sambrook y col (Sambrook et al., 1989). A las muestras se les añadió 1 volumen de tampón Laemmli y se hirvieron 5 minutos antes de cargarlas en el gel. Una vez finalizada la electroforesis se utilizó el método Fairbanks de tinción rápida. En este método se emplean un total de 4 soluciones: la primera de ellas contiene isopropanol al 25%, ácido acético al 10% y azul coomassie 0,05%. El gel se introdujo en esta solución en un recipiente ventilado, y se calentó en el microondas a máxima potencia durante unos 2 min (hasta ebullición). Se dejó enfriar en agitación a temperatura ambiente unos 5 minutos.

Se retiró esta solución y se lavó con agua. Se añadió ahora una solución con isopropanol al 10%, en la que se incluyó un 0,005% de azul coomassie. Se volvió a calentar en el microondas hasta ebullición. Se retiró la solución, se lavó y añadió la tercera solución que contenía sólo ácido acético (10%) y azul coomassie (0,002%). Se calentó en microondas y dejó enfriar. Se lavó con agua y se añadió la última solución que contiene un 10% de ácido acético y no incluía azul coomassie. Nuevamente se calentó en el microondas. Con esta solución en frío se puede dejar de 15 minutos hasta toda la noche. En el recipiente también se incluye una esponja con el fin de retirar los restos de colorante para desteñir por completo el gel. Un vez finalizado el proceso de tinción.

En aquellos casos en los que se transfirió el gel a membranas, se procedió directamente a la transferencia justo después de la electroforesis, obviando el proceso de fijación y tinción.

Inmunodetección de proteínas fijadas en membranas

Para transferir proteínas desde geles de acrilamida hasta membranas, se utilizó el sistema de transferencia semi-seca de Bio-Rad, y la membrana de PVDF (Millipore), usando tampón de transferencia 1x, y transfiriendo durante 45-50 min a 15V.

La membrana PVDF a la que se transfieren las proteínas se bloqueó entre 1 y 15 horas con solución de bloqueo (leche desnatada 5%, Tween-20 0,1% en PBS1x) con fuerte agitación. La incubación con el primer anticuerpo a la dilución adecuada se realizó en solución de incubación (leche desnatada 1%, Tween-20 0,1% en PBS1x), durante al menos 3 horas o toda la noche. Posteriormente, se lavó la membrana tres veces durante 20 segundos con solución de lavado (Tween-20 0,1% en PBS1X) con fuerte agitación. Entonces se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón o conejo) conjugado a peroxidasa en una solución de incubación a la dilución indicada por el fabricante, durante 1 hora. Después de lavar tres veces durante 20 segundos con solución de lavado con fuerte agitación, se procedió al revelado por el método de la peroxidasa con *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas en las diferentes muestras se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). En cada determinación se utilizó una curva patrón de concentración tomando como proteína de referencia la albúmina.

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos se sintetizaron en el laboratorio del Dr. M.E. Patarroyo y de Dr. O. Noya utilizando la metodología de fase sólida (Woolley and Merrifield, 1963) con las variaciones del sistema de síntesis múltiple en fase sólida

(Houghten, 1985) y se purificaron con éter etílico. La pureza se analizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna semipreparativa C18 en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo de 10-40%. Para verificar el proceso de síntesis se determinó el tiempo de retención de cada péptido mediante HPLC utilizando como control un péptido de secuencia conocida. A continuación, la correcta síntesis de los péptidos se verificó mediante secuenciación automática utilizando un secuenciador en fase líquida Beckman 890M.

Obtención de muestras biológicas

Se recogieron muestras de sangre venosa en EDTA-K3 al inicio del tratamiento (T0) y a intervalos regulares a lo largo de varios años, T1: tres, T2: seis, T3: nueve, T4: doce, T5 quince meses post-inicio del tratamiento. Las muestras se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a su obtención. A partir de la sangre se sin anticoagulante se obtuvo el suero mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el suero se alicuoteó y almacenó a -80°C con 50% glicerol, hasta su posterior uso.

Determinación de anticuerpos frente a proteínas recombinantes y lisado de antígenos soluble de *T. cruzi* (STcA) mediante ELISA

Las determinaciones de títulos de anticuerpos frente a las proteínas recombinantes KMP11, HSP70, PFR2 y Tgp63 se realizaron utilizando la técnica de ELISA (Thomas et al., 2001). Se fijó en cada pocillo de la placa (Nunc) 0,5µg de proteína, disuelta en 100µl de solución NaHCO₃/Na₂CO₃ 10mM, pH 9,6 y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con 200µl de PBS 0,05% Tween-20 y se incubaron durante 2 horas con solución bloqueante (PBS al 5% en leche en polvo desnatada). Después, se añadieron los sueros de pacientes a dilución 1/800 (para HSP70, PFR2 y Tgp63), 1/3200 (para KMP11) y 1/6400 (para STcA), durante 2 horas a 37°C. Después de lavar las placas de cuatro a seis veces con PBS-Tween 0,05% se añadió 100µl de una solución del segundo anticuerpo acoplado con peroxidasa en PBS-Tween 0,05%-leche desnatada 5%, durante 1 hora a 37°C. Tras lavar los pocillos, la reacción se reveló usando ortofenildiamina (OPD, Sigma), disuelto en tampón citrato pH 5, durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2N y se realizó la medida de densidad

óptica a la longitud de onda de 492nm. En todos los experimentos se incluyeron tanto controles positivos como negativos y dos pocillos blancos, que llevan fijado el antígeno y sufren todo el proceso paralelo con las muestras de forma que nos indica el valor basal o de fondo. Las muestras fueron ensayadas por triplicado y para 2 diluciones.

Determinación de anticuerpos frente a péptidos mediante ELISA

Las determinaciones de títulos de anticuerpos frente a los péptidos de la proteína TcCA-2 se realizaron utilizando la técnica de ELISA. Se fijó en cada pocillo de la placa (Nunc) 100µl de péptido (10µg/ml disuelto en PBS) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con 200µl de PBS 0,05% Tween-20 y se incubaron durante 30 minutos con solución bloqueante (PBS al 2,5% en leche en polvo desnatada). Después, se añadieron los sueros de pacientes a dilución 1/400, 1/800 y 1/1600) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de lavar las placas de cuatro a seis veces con PBS-Tween 0,05% se añadió 100µl de una solución del segundo anticuerpo anti-human IgG (Biosource) acoplado con peroxidasa en PBS-Tween 0,05%-leche desnatada 2,5 %, a dilución 1/2000. La reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron 4-6 lavados y los pocillos se incubaron con 100µl de la solución sustrato (5ml de tetrametilbenzidina (TMB, 0,4g/l), 5 ml de peróxido de hidrógeno (0,02%) (1:1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la medida de densidad óptica a la longitud de onda de 620nm. En todos los experimentos se incluyeron tanto controles positivos como negativos y dos pocillos blancos, que llevan fijado el antígeno y sufren todo el proceso paralelo con las muestras de forma que nos indica el valor basal o de fondo. Las muestras fueron ensayadas por triplicado y para 3 diluciones.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de pacientes se analizaron, utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney. El análisis de las diferencias longitudinales post-tratamiento se realizó con el método no paramétrico de Wilcoxon. El análisis de correlación de Pearson se utilizó para evaluar la correlación entre las D.O. entre las diferentes proteínas y los distintos péptidos. Y por último la prueba de tendencia Jonckheere-Terpstra, para determinar la relación entre el reconocimiento de los diferentes antígenos y la

severidad de la enfermedad. Se consideró que las diferencias son estadísticamente significativas si $p \leq 0,05$. Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el programa informático SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

Estimulación de las células de sangre total

250µl de sangre total de pacientes pediátricos de Chagas se incubaron en una placa de 48 pocillos sin estimulación o en presencia de agentes como el Lipopolisacárido (LPS; de Escherichia coli 0111B4, Sigma-Aldrich) 10ng/ml, CpG (ODN2216, Invitrogen) 10µg/ml, o Pam (Pam3CSK4 Invivogen) 25µg/ml. Tras 24h de incubación a 37°C en atmósfera 5% CO₂, las muestras se centrifugaron a 13500rpm durante 5 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Medida de citoquinas por Multiplex

El sistema Mutiplex se basa en el uso de microesferas magnéticas teñidas con fluoróforos como soporte sólido (Fulton et al., 1997), (Kettman et al., 1998). El anticuerpo de captura está acoplado a un set de esferas de entre las 100 posibles combinaciones de color. Cada set de esferas está teñido uniformemente con una proporción distinta de fluoroforos verde y naranja. Una vez acopladas, las microesferas de cada set de esferas pueden mezclarse durante el ensayo y ser analizadas separadamente durante la adquisición de los datos en un citómetro adaptado específicamente para este uso. Los resultados se interpretan de manera que la cantidad del fluoroforo verde es proporcional a la cantidad de analito unida a la superficie. Por tanto, numerosos set de microesferas experimentos pueden realizarse y detectarse simultáneamente, permitiendo la cuantificación de múltiples analitos en el mismo pocillo. Finalmente, la concentración de cada analito puede ser determinada por interpolación de un estándar.

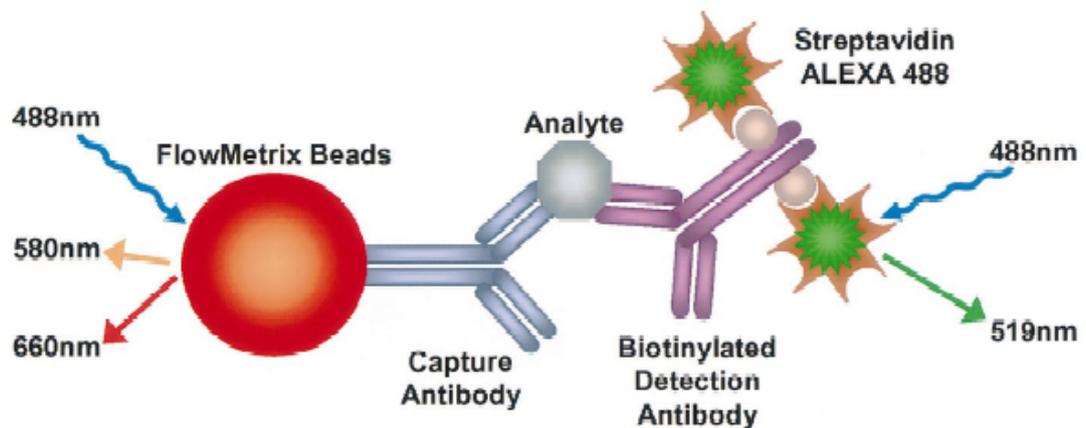


Figura M1. Representación gráfica del sistema Multiplex.

Los niveles de citoquinas se determinaron usando el sistema Bio-Plex siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la placa de 96 pocillos se cubrió con la mezcla de esferas (50µl/pocillo en PBS). Se lavaron 2 veces los pocillos con PBS-0.05% Tween -20. Se añadieron los estándares y las muestras (50µl/pocillo en PBS) y se incubaron en agitación durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después de 3 lavados, se añadió (25µl/well in PBS 1% BSA) anticuerpo IgG conjugado con biotina y se incubó con agitación durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Finalmente, las esferas se lavaron 3 veces y se revelaron con SAPE (S-Streptavidin R-Phycoerytrin) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un aparato Bio-Plex 200 adquiriendo al menos 100 esferas por analito y pocillo y las citoquinas se cuantificaron para cada muestra usando Bioplex Manager software 5.0 (Bio-Rad). Los límites de detección en nuestros ensayos fueron los siguientes: IL1β and IL12, 0,6 pg/ml; para IL6, 0,1 pg/ml; for IL10, 0,5 pg/ml; para TNF-α, 1,2 pg/ml; para IFN-α, 19,6 pg/ml.

Detección de parásitos en sangre mediante PCR

Para obtener DNA de parásitos circulantes se completaron 6 tubos de microhematocrito con 50 µl de sangre total. Se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min. En la interfase entre el empaquetado de hematíes y el plasma, se encuentra una capa de leucocitos donde se concentran los tripomastigotes, que es la que se recogió tras cortar el capilar. Esta fracción se recogió por centrifugación a 6000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los sedimentos parasitarios se

resuspendieron en clorhidrato de guanidina 6M y fueron digeridos durante 15 min a 100°C.

Posteriormente, se añadió proteinasa K (20µg/µl), buffer NET (10mM NaCl, 10mM EDTA, 10 mM Tris HCl) y SDS 10% y se incubó a 60°C durante 1 hora. A continuación, se añadió resina CHELEX-100 Resin (Bio-Rad) 10% y se incubó durante 30 minutos a 60°C. Por último, se añadió isopropanol (7%) y glicógeno (20mg/ml) para precipitar el ADN(Feilij et al., 1983).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación mediante PCR, a excepción de las de secuenciación, se realizaron en los termocicladores: geneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) ó Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems), usando las enzimas Pfu ADN polimerasa de Biotools (0,5U/reacción) o la mezcla de enzimas modificadas "Expand High Fidelity PCR System" de Biotools (1U/reacción) de ADN Taq polimerasa, 2mM MgCl₂, 0,5µM de cada cebador y 200nM de desoxinucleótidos. El programa de PCR tiene un paso previo de 94°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. El amplicón 330pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio.

Cada producto de PCR en 50µl de mezcla de reacción contenía aproximadamente 200ng de DNA genómico, 0,5 µM de *T.cruzi* 195-bp satélite oligonucleótido de DNA específico (TCZ1 5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3', and TCZ2 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG- 3'), 1 mM MgCl₂, 200nM de desoxinucleótidos y 1 U of Taq DNA polymerase. El programa tiene un paso inicial desnaturizante a 95°C durante 5 minutos seguido por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos con un paso final de extensión a 72°C durante 10 minutos. Los productos 195 bp productos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Como control se incluyó una mezcla de reacción sin ADN, un tubo con ADN de un paciente no infectado y otro tubo con ADN de un paciente infectado.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS INCLUIDAS EN LA TESIS DOCTORAL

.

Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers.

Fernández-Villegas A, Pinazo MJ, Marañón C, Thomas MC, Posada E, Carrilero B, Segovia M, Gascón J, López MC.

BMC Infect Dis. 2011 Jul 31;11:206.

PMID: 21801456

Índice de impacto: 2,83

Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology.

Thomas MC, Fernández-Villegas A, Carrilero B, Marañón C, Saura D, Noya O, Segovia M, Alarcón de Noya B, Alonso C, López MC.

Clin Vaccine Immunol. 2012 Feb;19 (2):167-73. Epub 2011 Dec 7.

PMID: 22155766

Índice de impacto: 2,471

Nuevos indicadores serológicos

López MC, Fernández-Villegas A, Marañón C, Carrilero B, Pinazo MJ, Gascón J, Segovia M, Thomas MC.

Enfermedades emergentes. 2011 Mar. Volumen 13. Suplemento 1.

Índice de impacto: 0,256

4.1 SHORT-TERM FOLLOW-UP OF CHAGASIC PATIENTS AFTER BENZNIDAZOLE TREATMENT USING MULTIPLE SEROLOGICAL MARKERS.

Fernández-Villegas et al. *BMC Infectious Diseases* 2011, **11**:206
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/206>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers

Ana Fernández-Villegas¹, María Jesús Pinazo^{2†}, Concepción Marañón^{1†}, M Carmen Thomas¹, Elizabeth Posada², Bartolomé Carrilero³, Manuel Segovia³, Joaquim Gascon² and Manuel C López^{1*}

Abstract

Background: Conventional serological tests, using total soluble proteins or a cocktail of recombinant proteins from *T. cruzi* as antigens, are highly sensitive for Chagas disease diagnosis. This type of tests, however, does not seem to be reliable tools for short- and medium-term monitoring of the evolution of patients after antiparasitic treatment. The aim of the present study was to search for immunological markers that could be altered in the sera from Chagas disease patients after benznidazole treatment, and therefore have a potential predictive diagnostic value.

Methods: We analyzed the reactivity of sera from chagasic patients during different clinical phases of the disease against a series of immunodominant antigens, known as KMP11, PFR2, HSP70 and Tgp63. The reactivity of the sera from 46 adult Chronic Chagas disease patients living in a non-endemic country without vector transmission of *T. cruzi* (15 patients in the indeterminate stage, 16 in the cardiomyopathy stage and 16 in the digestive stage) and 22 control sera from non-infected subjects was analyzed. We also analyzed the response dynamics of sera from those patients who had been treated with benznidazole.

Results: Regardless of the stage of the sickness, the sera from chagasic patients reacted against KMP11, HSP70, PFR2 and Tgp63 recombinant proteins with statistical significance relative to the reactivity against the same antigens by sera from healthy donors, patients with autoimmune diseases or patients suffering from tuberculosis, leprosy or malaria. Shortly after benznidazole treatment, a statistically significant decrease in reactivity against KMP11, HSP70 and PFR2 was observed (six or nine month). It was also observed that, following benznidazole treatment, the differential reactivity against these antigens co-relates with the clinical status of the patients.

Conclusions: The recombinant antigens KMP11, PFR2, Tgp63 and HSP70 are recognized by Chagas disease patients' sera at any clinical stage of the disease. Shortly after benznidazole treatment, a drop in reactivity against three of these antigens is produced in an antigen-specific manner. Most likely, analysis of the reactivity against these recombinant antigens may be useful for monitoring the effectiveness of benznidazole treatment.

Background

Chagas disease or American trypanosomiasis is a complex anthrozoosis caused by the flagellate protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. This sickness affects around 8 million people in Latin-America despite the

intensive programs implemented to control the illness-transmitting vectors [1-3]. In addition, the increasing number of migrants from Latin-American countries has globally spread the *T. cruzi* infection to non-endemic areas [4,5]. Nowadays, other ways of infection such as congenital transmission, blood transfusion and organ transplantation are becoming prevalent and relevant from a public health point of view in both endemic and non-endemic countries [6].

The disease passes through various different clinical stages. The parasite can be visualized in the blood

* Correspondence: mclopez@pb.csices

† Contributed equally

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud - Avda. del Conocimiento s/n. 18100-Granada, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Fernández-Villegas et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

stream during the acute stage and eventually detected by PCR in the chronic stages of the disease. In absence of treatment, the acute phase is followed by an indeterminate stage in which the parasites are present into specific tissues [7]. In 30% of patients, the infection leads to a symptomatic chronic phase. Despite low mortality during this symptomatic stage, serious cardiac and/or digestive alterations are present [7,8]. Arrhythmias, electrocardiographic abnormalities together with cardiomegaly and/or systolic dysfunction may appear when there is cardiac damage [9,10]. Megaesophagus or megacolon are indicative of gastrointestinal damage and, although these clinical manifestations are usually not highly severe, they are associated to morbidity [11].

Anti-trypanosomal treatment is strongly recommended for all cases of the acute, congenital and reactivated infection of *T. cruzi*, and for the treatment of young chronic patients [3]. However, its efficacy for treatment of adult patients in the chronic phase of the disease is under consideration [12,13]. New drugs are being currently examined, some now in the advanced stages of development [14].

At present, the most widely used serological tests for Chagas disease diagnosis are based on homogenates of total parasite proteins or combinations of recombinant proteins as antigens [15-17]. Although all these techniques are very sensitive for the diagnosis of Chagas disease [18], the evaluation of the evolution of the patients under and following treatment is ambiguous since some *T. cruzi* antibodies are long lasting [19] and a significant seroconversion occurs only several years post treatment [11,20]. Thus, conventional serological tests are not useful for short- and medium-term post-treatment monitoring as they do not allow early recognition of a therapeutic failure [21-23]. Consequently, reliable tools for the evaluation of the therapeutic efficacy of the drugs are needed.

The aim of the present study was to search for immunological markers, against which the reactivity of sera from Chagas disease patients could be modified by benznidazole treatment, thus providing potential predictive diagnostic value.

Methods

Human sera

Serum samples from 46 adult Chagas disease patients and 22 control sera from healthy adult donors (HD) were collected at the Hospital Clínic in Barcelona and Hospital Virgen de la Arrixaca in Murcia (Spain). All patients and healthy donors came from endemic areas and were Spanish residents in whom *T. cruzi* reinfection does not occur (Table 1). The patients included in the study had never received benznidazole/nifurtimox treatment.

Following WHO criteria, Chagas disease diagnosis was made using two different commercial serological tests (ELISA-Bioelisa Chagas, Biokit (Barcelona, Spain) and IFI-Inmunofluor Chagas, Biocientífica, Argentina) previous to inclusion. All patients were at the chronic stage of the disease and were classified into three main categories. Chagasic patients were considered at the Indeterminate stage (IND, n = 15) when there was no evidence of cardiac or gastrointestinal disorders; the Chronic Chagas Cardiomyopathy stage (CCC, n = 16) was catalogued into G1 to G3 stages of Kuschner classification [24] according to clinical criteria and radiological, electrocardiographic and echocardiography analyses; the digestive stage (DIG, n = 15) was established when mega-esophagus and/or megacolon abnormalities in the gastrointestinal tract were detected by barium enema and esophagogram. All IND and CCC and 10 DIG chagasic patients were treated with benznidazole (5 mg/kg/day for 60 days) and clinically followed up during the period of this study. No changes in the clinical status of the patients were observed during this follow-up period.

Blood samples were collected prior to treatment administration (T0) and at regular time intervals of three (T1), six (T2) and nine (T3) months post-treatment. Aliquots of the sera were stored at -80°C in 50% glycerol.

Serum samples from patients with different autoimmune diseases or patients suffering an infectious disease other than Chagas disease were also included in this study. Sera were collected from 15 patients suffering autoimmune diseases from non-endemic areas: Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (n = 6), celiac disease (n = 4) and rheumatoid arthritis (n = 5). Sera were collected from Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) as well as 24 serum samples from patients suffering leprosy (n = 8), tuberculosis (n = 8) and malaria (n = 8) from the Institute of Tropical Medicine (Caracas-Venezuela).

Ethical considerations

The protocols were approved by the Ethical Committees at Hospital Clínic, Hospital Virgen de la Arrixaca and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spain). A signed informed consent was obtained from all individuals prior to their inclusion in the study.

Gene cloning and protein purification

The DNA sequence coding for the gp63 protein fragment (Tgp63) [25] was amplified by PCR using *Leishmania infantum* genomic DNA as template and Q5'gp63Li (5'CAAGGGTACCGGAACGACCTGCCAG 3') and Q3'gp63Li (5'CTGAAGCTTACCCCGGCC-CACG 3') primers which bear *Kpn*I and *Hind*III restriction sites, respectively. The 483 nucleotide fragment

Table 1 Characteristics of the population under study

SUBJECTS ^a	MEAN AGE IN YEARS (range)	MALE (%)	FEMALE (%)	ORIGIN (%)
HD (n = 22)	31.5 (18-54)	14 (63.6)	8 (36.4)	15 Bolivia (70); 7 Ecuador (30)
IND (n = 15)	33.5 (22-56)	14 (93.3)	1 (6.7)	13 Bolivia (86.6); 1 Brasil (6.7); 1 Paraguay (6.7)
CCC (n = 16)	44.1 (27-68)	9 (56.3)	7 (43.7)	14 Bolivia (87.5); 1 Brasil (6.3); 1 Argentina (6.3)
DIG (n = 15)	39.1 (24-56)	10 (66.6)	5 (33.4)	14 Bolivia (93.3); 1 Argentina (6.7)

^a HD: Healthy donors. IND: Chronic chagasic patients at indeterminate clinical form of the disease. CCC: Chronic cardiac chagasic patients. DIG: Chronic chagasic patients with abnormalities in the gastrointestinal track

coding for the highly conserved region of the protein which is implicated in the molecular interaction with the macrophage surface molecules [26] was digested with *Kpn*I and *Hind*III enzymes and subcloned into the pQE30 plasmid (Qiagen, California, USA) digested with the same enzymes.

Tgp63 recombinant protein was overexpressed in the *Escherichia coli* M15 strain by addition of 0.1 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and grown at 37°C for 3 h. Proteins were solubilized in resuspension buffer (0.3 M NaCl and 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, pH 8) by sonication. The Tgp63 protein was bound overnight to the Ni²⁺ NTA resin (Qiagen, California, USA) at 4°C with gentle shaking. After extensive washing with resuspension buffer at pH from 8 to 6, the Tgp63 protein was subsequently eluted with the same buffer at pH 4-5. *T. cruzi* KMP11 [27], HSP70 [28], PFR2 [29] recombinant proteins were overexpressed in bacteria and purified as described previously.

To obtain soluble total protein extract (STcA), *T. cruzi* trypomastigote forms (Y strain) obtained from *T. cruzi* infected mice were used to infect monolayers of LLC-MK2 fibroblast cells at parasite:cell ratio of 5:1 for 12 hours. Cell cultures were washed to remove the parasites that were not able to infect cells and incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. Amastigote/trypomastigote parasites (ratio 3/1) were recovered from infected-culture supernatants and washed in PBS. Parasites were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 0.05% NP-40, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptin) and sonicated. Soluble protein extracts were obtained after centrifugation at 10,000 rpm for 20 min at 4°C.

ELISA measurement

ELISA tests were carried out as described in Thomas et al. [30]. Briefly, ELISA 8-well strips (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 0.5 µg of protein and stored in a dry atmosphere at -20°C until use. Subsequently, the wells were washed twice with 200 µL of PBS-0.05% Tween-20 and incubated for one hour with blocking solution (5% nonfat dried milk powder in PBS).

Afterwards, the antigen-coated wells were incubated with patient sera at 1/800 dilution (for HSP70, PFR2 and Tgp63), 1/3,200 (for KMP11), and 1/6,400 for STcA, for two hours at 37°C. Selection of serum dilutions was established for individual antigens using a pool of sera from 6 patients with Chagas disease who lived in endemic areas. The dilution at which each antigen was assayed corresponds to the linear part of the curve after a titration analysis. As a secondary antibody, an affinity-isolated goat anti-human IgG antibody peroxidase-conjugated (Biosource, New York, USA) at dilution 1:2,000 was used. The reaction was incubated for 1 h at 37°C. After washing, the reaction was developed using orthophenylenediamine for 5 minutes in the dark at room temperature. The reaction was stopped by addition of 2N sulfuric acid and the absorbance was measured at 492 nm. Serum samples were assayed in triplicate and at two dilutions. Positive and negative control sera were included in all plates. The cut-off values represent the mean value of the reactivity of a pool of sera from healthy donors (sensitivity) or from patients with autoimmune or infectious diseases other than Chagas disease (specificity), plus two standard deviations.

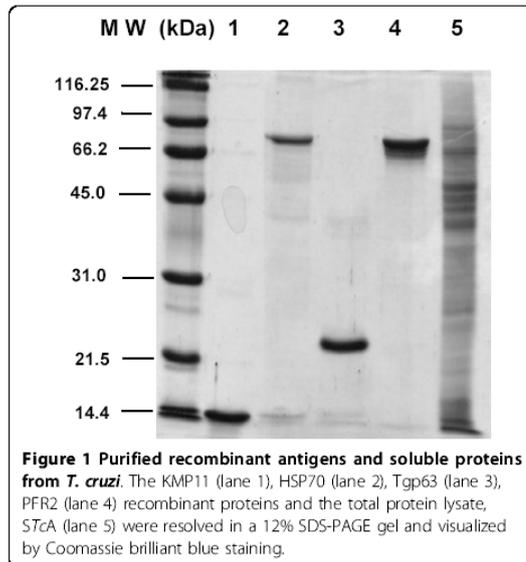
Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical package version 15.0 (Spss Inc., Chicago Illinois). The Mann Withney U test was used to carry out comparisons among groups of patients. The Wilcoxon test was used to study post-treatment evolution. Statistical significance was assigned at a value of $p \leq 0.05$. Pearson correlation analyses were used to evaluate the correlation between reactivity levels against KMP11, HSP70, PFR2 and Tgp63. Significant correlation was assigned at a value of $p \leq 0.05$.

Results and Discussion

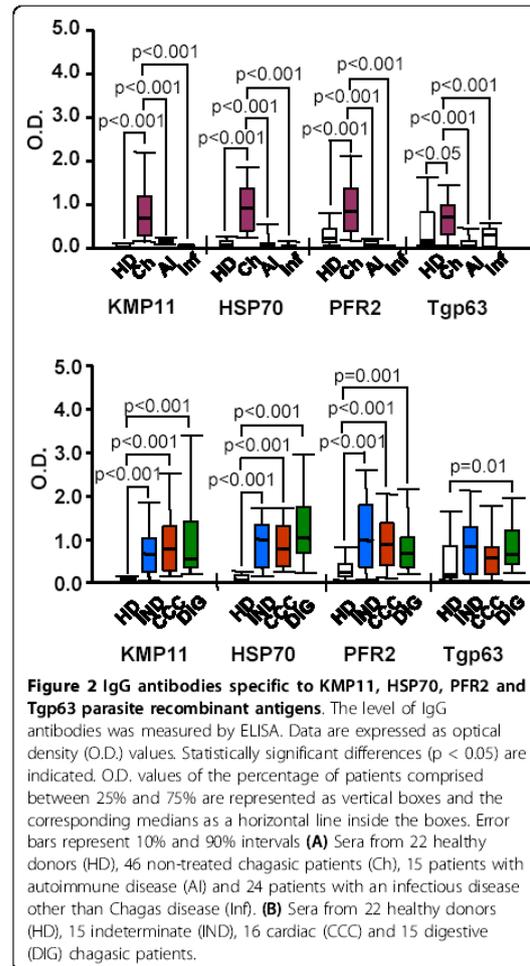
Recognition of KMP11, HSP70, PFR2, Tgp63, and STcA by sera from chagasic patients

The *T. cruzi* KMP11, HSP70, and PFR2 proteins, and the *L. infantum* Tgp63 fragment (Figure 1, lanes 1-4)



were selected among several recombinant proteins because in previous reports [26,30,31] and in preliminary laboratory screening they proved to be immunodominant antigens in chagasic patients. For comparison, a *T. cruzi* total soluble protein extract (STcA) (Figure 1, lane 5) was also included in the study. As shown in Figure 2A, the KMP11, HSP70, PFR2 and Tgp63 recombinant proteins are recognized with statistical significance by the sera from chagasic patients ($n = 46$) relative to that from healthy donors (HD, $n = 22$). Furthermore, these antigens do not react with sera from patients with autoimmune diseases (SLE, celiac disease and rheumatoid arthritis) (AI, $n = 15$) or patients suffering from tuberculosis, leprosy or malaria (Inf, $n = 24$). However, it is worth mentioning that the sera from patients with leishmaniasis recognize Tgp63 and KMP11 [30,32]. Thus, the specificity and sensitivity is 85% and 90% for KMP11, 85% and 90% for HSP70, 92% and 75% for PFR2 and 70% and 30% for Tgp63.

When the reactivity data were analyzed in relation to the clinical stage of Chagas' disease, it was observed (Figure 2B) that the sera from IND, CCC and DIG groups recognize with statistical significance the KMP11, HSP70, PFR2 recombinant proteins when compared with healthy donors (HD). These antigens are recognized by sera from chagasic patients regardless of the stage of the illness. In DIG patients, the reactivity level against Tgp63 was also higher than that detected in the sera from HD. The results presented suggest that these antigens could be used to detect *T. cruzi* infection in any clinical form of Chagas disease. It has been



recently described that the sera from CCC and IND chagasic patients living in endemic areas recognize the *T. cruzi* KMP11 and *Trypanosoma rangeli* HSP70 [33].

In order to determine whether there is any correlation between the reactivity detected in the sera from each one of the chagasic patient against the antigens tested, a paired correlation analysis was carried out. A statistically significant correlation was observed between reactivity against KMP11 and HSP70, with values of $r = 0.518$ ($p = 0.048$) in CCC patients and $r = 0.632$ ($p < 0.02$) in patients with digestive clinical manifestations. Moreover, a statistically significant correlation was also observed in DIG patients in their response against KMP11 and PFR2, with values $r = 0.719$ ($p < 0.005$). No correlation was observed in the IND patients between any of the antigens under study. This differential reactivity

References

- Guhl F, Lazdins-Helds JK: **The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)**. 2007, 97.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R: **The future of Chagas disease control**. *Trends Parasitol* 2006, **22**:583-588.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marín-Neto JA: **Chagas disease**. *Lancet* 2010, **375**:1388-1402.
- Munoz J, Gomez I, Prat J, Gallego M, Gimeno F, Trevino B, López-Chejade P, Ribera O, Molina L, Sanz S, Pinazo MJ, Riera C, Posada EJ, Sanz G, Portús M, Gascon J: **Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain)**. *Acta Trop* 2009, **111**:51-55.
- Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F, Loutan L, Gervais A: **Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland**. *Emerg Infect Dis* 2009, **15**:601-603.
- Munoz J, Coll O, Juncosa T, Vergés M, del Pino M, Fumado V, Bosch J, Posada EJ, Hernandez S, Fisa R, Bogaña JM, Gállego M, Sanz S, Portús M, Gascon J: **Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain**. *Clin Infect Dis* 2009, **248**:1736-1740.
- Prata A: **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease**. *Lancet Infect Dis* 2001, **1**:92-100.
- Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM: **The clinical immunology of human Chagas disease**. *Trends Parasitol* 2005, **21**:581-587.
- Rassi A Jr, Rassi A, Little WC: **Chagas' heart disease**. *Clin Cardiol* 2000, **23**:883-889.
- Punkollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC: **Clinical aspects of the Chagas' heart disease**. *Int J Cardiol* 2007, **115**:279-283.
- Pinazo MJ, Cañas E, Elizalde JJ, García M, Gascon J, Gimeno F, Gomez J, Guhl F, Ortiz V, Posada Ede J, Puente S, Rezende J, Salas J, Saravia J, Torrico F, Torrus D, Treviño B: **Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic**. *Gastroenterol Hepatol* 2010, **33**:191-200.
- Viotti R, Vigilano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A: **Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial**. *Ann Intern Med* 2006, **144**:724-734.
- Marín-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S: **Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis**. *Am Heart J* 2008, **156**:37-43.
- Urbina JA: **Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches**. *Acta Trop* 2010, **115**(1-2):55-68.
- Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, Medina M, Ward BJ: **Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains**. *Transfus Med* 2006, **16**:419-431.
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES: **Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp.** *Clin Vaccine Immunol* 2007, **14**:1045-1049.
- Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, del Pozo A, Sands A, Vercauteren G, Sabino EC: **WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease**. *Transfusion* 2009, **49**:1076-1082.
- WHO: **Control of Chagas disease**. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2002, **905**:i-vi, 1-109, back cover.
- Cancado JR: **Long term evaluation of etiologic treatment of chagas disease with benznidazole**. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002, **44**:29-37.
- Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V, Fernandes O: **Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, **96**:823-826.
- Solarí A, Ortiz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, Salinas P, Rojas A, Schenone H: **Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR**. *J Antimicrob Chemother* 2000, **48**:515-519.
- Sánchez Negrette O, Sánchez Valdéz FJ, Lacunza CD, García Bustos MF, Mora MC, Uncos AD, Basombrio MA: **Serological evaluation of specific antibody levels in patients treated for chronic Chagas' disease**. *Clin Vaccine Immunol* 2008, **15**:297-302.
- Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, Manning T, Haney M, Postan M, Laucella S, Tarleton RL: **High Throughput Selection of Effective Serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection**. *PLoS Negl Trop Dis* 2008, **2**(10):e316.
- Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequaz C, Ledesma R, Brunetto J: **Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy**. *Arg Bras Cardiol* 1985, **45**:249-256.
- Bouvier J, Etges RJ, Bordier C: **Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes**. *J Biol Chem* 1985, **260**:15504-15509.
- Puentes F, Guzmán F, Marín V, Alonso C, Patarroyo ME, Moreno A: ***Leishmania*: fine mapping of the Leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization**. *Exp Parasitol* 1999, **93**:7-22.
- Thomas MC, García-Pérez JL, Alonso C, López MC: **Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level**. *DNA Cell Biol* 2000, **19**:47-57.
- Maranon C, Planelles L, Alonso C, López MC: **HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis**. *Int Immunol* 2000, **12**:1685-1693.
- Morell M, Thomas MC, Caballero T, Alonso C, López MC: **The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection**. *Vaccine* 2006, **24**:7046-7055.
- Thomas MC, Longobardo MV, Carmelo E, Marañón C, Planelles L, Patarroyo ME, Alonso C, López MC: **Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera**. *Clin Exp Immunol* 2001, **123**:465-471.
- Requena JM, Soto M, Guzman F, Maekelt A, Noya O, Patarroyo ME, Alonso C: **Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals**. *Mol Immunol* 1993, **30**:1115-1121.
- Shreffler WG, Burns JM Jr, Badaró R, Ghalib HW, Button LL, McMaster WR, Reed SG: **Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species**. *J Infect Dis* 1993, **167**:426-430.
- Flechas ID, Cuellar A, Cucunubá ZM, Rosas F, Velasco V, Steindel M, Thomas MC, López MC, González JM, Puerta C: **Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients**. *BMC Infect Dis* 2009, **9**:186.
- Rocha GM, Teixeira DE, Miranda K, Weissmüller G, Bisch PM, de Souza W: **Structural changes of the paraflagellar rod during flagellar beating in *Trypanosoma cruzi***. *PLoS One* 2010, **5**:e11407.
- Viotti R, Vigilano C, Armenti H, Segura E: **Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up**. *Am Heart J* 1994, **127**:151-162.
- Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G, Alvarez MG, Cooley G, Viotti R, Albareda MC, Lococo B, Postan M, Armenti A, Tarleton RL: **Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy**. *Clin Infect Dis* 2009, **49**:1675-1684.
- García S, Ramos CO, Senra JF, Villas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB: **Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations**. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:1521-1528.
- Fernandez MC, Gonzalez Cappa SM, Solana ME: ***Trypanosoma cruzi*: Immunological predictors of benznidazole efficacy during experimental infection**. *Exp Parasitol* 2010, **124**:172-180.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/206/prepub>

doi:10.1186/1471-2334-11-206

Cite this article as: Fernández-Villegas et al: Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC Infectious Diseases* 2011 **11**:206.

4.2 CHARACTERIZATION OF AN IMMUNODOMINANT ANTIGENIC EPI TOPE FROM *TRYPANOSOMA CRUZI* AS A BIOMARKER OF CHRONIC CHAGAS' DISEASE PATHOLOGY.



Characterization of an Immunodominant Antigenic Epitope from *Trypanosoma cruzi* as a Biomarker of Chronic Chagas' Disease Pathology

M. Carmen Thomas,^a Ana Fernández-Villegas,^a Bartolomé Carrilero,^b Concepción Marañón,^a Daniel Saura,^c Oscar Noya,^d Manuel Segovia,^b Belkisyolé Alarcón de Noya,^d Carlos Alonso,^e and Manuel Carlos López^a

Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada, Spain;^a Hospital Virgen de la Antixaca, Unidad Regional de Medicina Tropical^b and Servicio de Cardiología,^c El Palmar, Murcia, Spain; Biotelmintiasis and Inmunología Laboratorios Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela^d; and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain^e

Nowadays, the techniques available for chronic Chagas' disease diagnosis are very sensitive; however, they do not allow discrimination of the patient's clinical stages of the disease. The present paper describes that three out of the five different repeats contained in the *Trypanosoma cruzi* TcCA-2 membrane protein (3972-FGQAAAGDKPPP, 6303-FGQAAAGDKPAP, and 3973-FGQAAAGDKPSL) are recognized with high sensitivity (>90%) by sera from chronic Chagas' disease patients and that they are not recognized by sera from patients in the acute phase of the disease. A total of 133 serum samples from chagasic patients and 50 serum samples from healthy donors were tested. In addition, sera from 15 patients with different autoimmune diseases, 43 serum samples from patients suffering an infectious disease other than Chagas' disease, and 38 serum samples from patients with nonchagasic cardiac disorders were also included in this study. The residue 3973 peptide shows a specificity of >98%, as it is not recognized by individuals with autoimmune and inflammatory processes or by patients with a nonchagasic cardiomyopathy. Remarkably, the levels of antibody against the 3973 epitope detected by the sera from Chagas' disease patients in the symptomatic chronic phase, involving cardiac or digestive alterations, are higher than those detected by the sera from Chagas' disease patients in the indeterminate phase of the disease. It is suggested that the diagnostic technique described could also be used to indicate the degree of pathology. The amino acids F, Q, and DKP located in the peptide at positions 1, 3, and 8 to 10, respectively, are essential to conform to the immunodominant antigenic epitope.

Chagas' disease (ChD) is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted by hematophagous Reduviidae vectors and infects many wild animal reservoirs. Despite the intensive programs implemented to control the illness-transmitting vectors, this neglected tropical sickness affects about 8 million people located in the poorest regions of developing countries in Latin America and the Caribbean (31, 32). In these areas, there is a high level of exposure and transmission due to the poor housing and living conditions, together with ecological factors that have led to the adaptation of the triatomine vectors. In addition to congenital transmission, blood transfusion, and organ transplantations, there are other ways of infection, such as oral transmission through ingestion of contaminated food, currently considered an important route of transmission (2). Due to the increase of immigrants, high numbers of imported ChD cases are now being detected in areas where the disease is not endemic (18, 24). Therefore, ChD is acquiring relevance from a public health point of view both in countries where the disease is endemic and in countries where it is not endemic, where children and pregnant women are the most vulnerable populations (23).

The disease courses with different clinical forms. The acute phase appears shortly after infection. In this phase, the parasite can be visualized in the bloodstream. In the absence of treatment, the acute phase is followed by an indeterminate stage in which the parasites persist in specific tissues (28). In about one-third of these individuals, the infection leads to a symptomatic chronic phase, characterized by cardiac and digestive involvement (8, 28). Cardiac manifestations of the disease include arrhythmias, electrocardiographic abnormalities, cardiomegaly, and/or systolic dysfunction

(29, 30). Digestive manifestations of the disease include aperistalsis megasophagus and megacolon. Although these clinical manifestations are usually not highly severe, they are associated with morbidity (27).

Nowadays, ChD is diagnosed mostly by serological tests. These tests are based on the detection of specific antibodies against homogenates of the parasite's total proteins or combinations of recombinant proteins as antigens. Although these techniques are very sensitive, they do not allow differentiation of the clinical phases of the disease. Moreover, these techniques do not seem to be reliable tools for monitoring the evolution of the disease in patients after treatment (3, 5, 26, 37). In this context, potential biomarkers for therapeutic efficacy have recently been described (9, 38). Detection of the parasite in the bloodstream of treated patients by PCR does not allow prediction of treatment success, since even repeated negative PCR results do not necessarily indicate parasitological cure (31). However, diagnosis by PCR may constitute a tool to highlight the impact of treatment and the reduction of the parasitic load (25).

Received 4 November 2011. Returned for modification 17 November 2011.
Accepted 28 November 2011.

Published ahead of print 7 December 2011.

Address correspondence to Manuel Carlos López, mclopez@ipbsic.es.

M. C. Thomas and A. Fernández-Villegas contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/CVI.00566-11

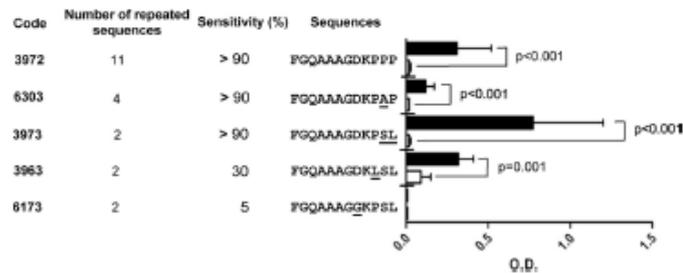


FIG 1 Reactivity of sera from Chagas' disease patients against five 12-mer peptides present in the *T. cruzi* TcCA-2 protein. The amino acid divergences of the different peptides representing the most abundant repeat are underlined. Data are expressed in optical density (O.D.) values. The horizontal bars represent the median optical density values and standard deviations obtained against 35 sera from chagasic patients (■) and 20 serum samples from healthy donors (□). Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated. Sera were assayed at a 1:400 dilution.

the reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C. As a secondary antibody, affinity-isolated goat anti-human IgG antibody, peroxidase conjugated (Biosource, Spring Valley, NY), was used at a dilution of 1:2,000. The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C. After the reaction mixture was washed, the reaction was developed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; 0.4 g/liter) and hydrogen peroxide (0.02%) (1:1) for 10 min at room temperature. The absorbance was measured at 620 nm. Serum samples were assayed in triplicate. Hyperimmune sera from mice immunized with each peptide coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH; Sigma) and sera from a healthy donor were included in all plates as positive- and negative-control sera, respectively.

Statistical analysis. The Mann-Whitney U test was used to carry out comparisons among groups of patients. Pearson correlation analyses were used to evaluate the correlation among levels of antibody against the 3973 peptide and 6302 peptide. The relation between level of antibody against the 3973 peptide and Kuschner stage was tested with the Jonckheere-Terpstra statistic on trend. Statistical significance was assigned at a two-sided P value of ≤ 0.05 . Statistical analyses were performed using the SPSS statistical package, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago IL).

RESULTS

Antigenicity and sensitivity of natural peptides contained in TcCA-2 antigen. The reactivity of sera from 35 Latin American residents at the chronic phase of ChD against a series of peptides that correspond to different 12-mer tandem repeats present in the TcCA-2 immunodominant antigen of *T. cruzi* (GenBank accession number [EAN97076](#)) was analyzed. These tandem repeats differ in their amino acid compositions, affecting 1 or 2 amino acids located at position 8, 10, 11, or 12 of the repeat. The number of repeats ranges from 2 to 11. Thus, five peptides of 12 amino acids in length that correspond to these repeats were synthesized. As shown in Fig. 1, peptides 3972, 6303, and 3973 are recognized by at least 90% of chagasic patient sera. Sequence divergences among these three natural peptides are on positions 11 and 12. Peptide 6303 differs from peptide 3972 in the amino acid located at position 11, as it bears alanine instead of proline. Peptide 3973 bears serine and leucine amino acids at positions 11 and 12 instead of the prolines in peptide 3972.

A single amino acid divergence in another position of the repeat resulted in an important reduction of the percentage of patients' sera that recognized the peptide. Thus, peptide 3963 was recognized by only 30% of the chronic chagasic sera. This drop in the percentage of patients' sera that recognized the peptide is due to the difference in amino acid composition at position 10, as

peptide 3963 bears lysine instead of proline in peptides 3972, 6303, and 3973. A drastic decrease in the percent recognition was detected when peptide 6173 was tested. This peptide contains a single modification that affects position 8 of the repeat. Peptide 6173, which bears glycine instead of aspartic acid, was recognized by only 5% of the serum samples. These data indicate that small differences in the amino acid composition of the repeats strongly influence the antigenic nature of these sequences. The highest reactivity was detected when the repeat present in peptide 3973 was tested (Fig. 1). Consequently, the 3973 peptide was selected for further studies.

Specificity against 3973 peptide and correlation of serum reactivity with sickness severity. The reactivity of a larger number of serum samples from chagasic patients against the 3973 peptide was analyzed. It was also determined whether the reactivity against the 3973 peptide is correlated with the disease form and the cardiac severity phase and whether 3973-specific antibodies are present in the sera from patients with other *T. cruzi*-related infectious diseases and with other related pathologies. Sera from 87 chronic ChD adult patients and 30 control serum samples from healthy adult donors from areas of endemicity (at present, Spanish residents) were assayed for reactivity against peptide 3973. Sera from 11 patients at the orally acquired acute phase that were collected at the Instituto de Medicina Tropical (Caracas, Venezuela) were also assayed for reactivity against the same peptide. The results show that most chronic ChD patients (94.25%) had antibodies against the 3973 epitope and that in most of them the reactivity was high (Fig. 2A). However, the sera from the above-mentioned patients at the acute phase did not recognize the 3973 peptide (Fig. 2A), an indication that the presence of anti-3973 antibodies is directly correlated with the establishment of the chronic pathology. The high level of specificity (>98%) of recognition of peptide 3973 by the sera from chagasic patients at the chronic phase was clearly shown by the observation that none of the sera from patients with leishmaniasis ($n = 21$), tuberculosis ($n = 11$), and malaria ($n = 11$) recognized this peptide (Fig. 2A).

To address the question whether the anti-3973 reactivity could correlate with the different phases of the sickness in terms of the pathology severity, the presence of antibodies in patients presenting different clinical forms of the disease was evaluated. Thus, sera from patients at the indeterminate phase (IND; $n = 28$) and from patients at the chronic phase who presented chronic cardiac dam-

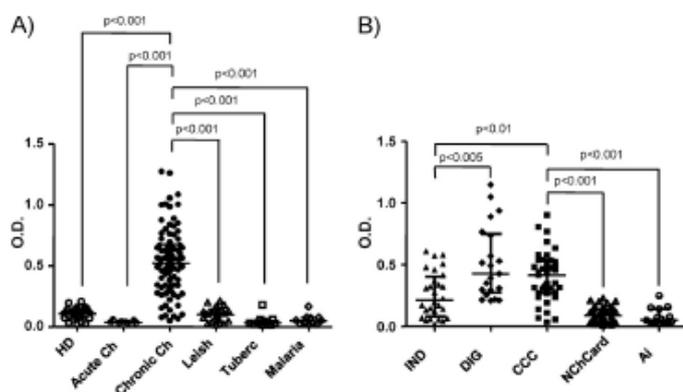


FIG 2 Specificity of IgG antibodies against 3973 peptide. The IgG reactivity against the 3973 peptide was measured by ELISA. Data are expressed as the optical density (O.D.). Horizontal lines on each group represent the median and interquartile range. Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated. (A) Sera from 30 healthy donors (HD, ○), 11 acute Chagas' disease patients (Acute Ch, ●), 87 chronic Chagas' disease patients (Chronic Ch, ●), 21 leishmaniasis patients (Leish, △), 11 tuberculosis patients (Tuberc, □), and 11 malaria patients (◇). The sera were assayed at 1:800 dilution. (B) Sera from 28 patients with the indeterminate form (IND, ▲), 21 patients with the digestive form (DIG, ◆), 38 patients with the cardiac form (CCC, ■), 38 patients with nonchagasic cardiac disorders (NChCard, △), and 15 patients with autoimmune disorders (rheumatoid arthritis [AI], ●). Sera were assayed at 1:1,600 dilution.

age (CCC; $n = 38$) or digestive alterations (DIG; $n = 21$) were analyzed by ELISA. The data indicate that the reactivity against peptide 3973 detected in the sera from patients with ChD in the chronic form (both DIG and CCC) is higher, with statistical significance, than that detected in sera from patients with the IND form (Fig. 2B). No statistically significant differences were observed when the reactivity against 3973 in DIG patients was compared to that in CCC patients. There was no correlation between the patients' age and the level of reactivity against the 3973 peptide (data not shown).

In order to rule out the possibility that the recognition of the 3973 epitope is due to other clinical manifestations of cardiac damage or inflammatory processes not associated with ChD, sera from patients with cardiomyopathy or other heart disorders (NChCard) and sera from patients with autoimmune pathologies such as SLE, celiac disease, and rheumatoid arthritis (AI; $n = 15$) were assayed for reactivity against peptide 3973. As shown in Fig. 2B, the reactivity against 3973 is significantly higher in the sera from chagasic patients having clinical cardiac or digestive manifestations than in the sera from patients with nonchagasic cardiac disorders and patients having autoimmune and inflammatory processes such as SLE, rheumatoid arthritis, or celiac disease. In addition, we found a positive trend ($P < 0.01$, Jonckheere-Terpstra test) in the relation between the reactivity against peptide 3973 by chronic ChD patient sera and the severity of the cardiac damage determined by the Kuschner classification value (G0 to G2/G3) or the presence of digestive disorders ($P = 0.001$) (Fig. 3). Thus, the data presented suggest that the detection of antibodies against the *T. cruzi* 3973 peptide in sera from chronic chagasic patients may well be used as a serological marker for follow-up of the evolution of the disease from an asymptomatic stage to a cardiac or digestive symptomatic form, thus having a prognosis value.

Identification of amino acid composition and localization of the epitope contained in the 3973 peptide that is recognized by sera from chagasic patients. To identify the position and nature

of the amino acids present in the 3973 epitope to which the antibodies are directed, a series of peptides bearing amino acid substitutions along the sequence was synthesized and assayed by ELISA. Simple, double, and multiple modifications (comprising up to 4 amino acid substitutions) were included in the amino acid sequences of peptide 3973 tested. The presence of specific antibodies in the sera from 35 chronic chagasic patients living in Latin America was determined. The results show (Fig. 4) a drastic reduction in the recognition level when the 1st, 3rd, 8th, 9th, and 10th positions were mutated in the repeat, as the sensitivities dropped to less than 50% (6175 peptide), 20% (3964 peptide), 10% (6383, 3974, 6174, and 6382 peptides), and 5% (6172, 6381, 6385, and 6384 peptides). However, modification of amino acids located at positions

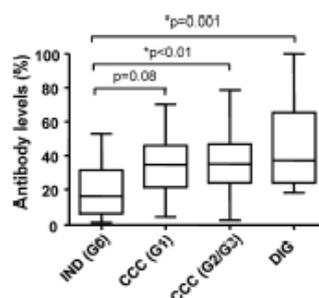


FIG 3 Correlation analysis by Jonckheere-Terpstra test. The level of IgG-specific antibodies against the 3973 peptide in sera from 28 patients with the indeterminate form, 12 patients with the early cardiac form (G1), 26 patients with an advanced cardiac form (G2-G3), and 21 patients with the digestive form were measured by ELISA. The antibody levels were correlated with clinical forms by the Jonckheere-Terpstra test. Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated and marked with an asterisk. The lower and upper limits of the box indicate the 25th and 75th percentiles, respectively; the line within the box depicts the median, and the whiskers indicate the lower and upper adjacent values.

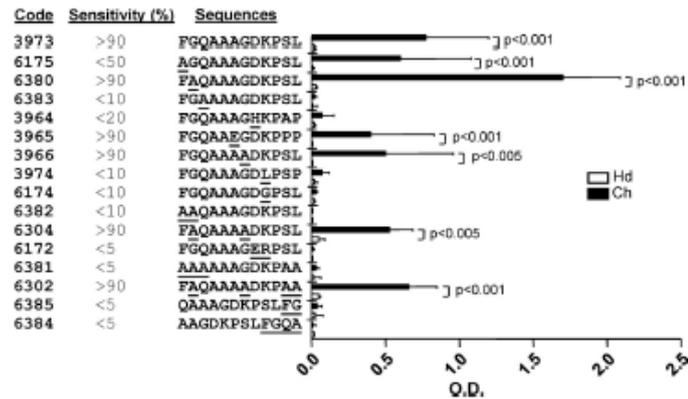


FIG 4 Identification of minimal residues that conform to the antigenic epitope recognized by the chagasic patients' serum samples. Reactivity of sera from Chagas' disease patients against 15 12-mer-long peptides derived from the 3973 peptide contained in the protein TcCA-2. Mutated positions are underlined. The horizontal bars represent the median values with interquartile range of 35 serum samples from chagasic patients (■) and 20 serum samples from healthy donors (□). Data are expressed in optical density (O.D.) values. Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated.

2 (peptide 6380), 6 (peptide 3965), and 7 (peptide 3966), including double mutations at positions 2 and 7 (peptide 6304), did not affect the level of recognition, as they were recognized by at least 90% of the ChD patients' sera. Peptide 6380 revealed the highest (optical density) reactivity of all the different peptides assayed. All these peptides share the amino acids phenylalanine (F) at the 1st position, glutamine (Q) at the 3rd position, aspartic acid (D) at the 8th position, lysine (K) at the 9th position, and proline (P) at the 10th position. The relevance of these amino acids at these particular positions was confirmed by synthesizing a peptide that maintains invariable the amino acids at positions 1, 8, 9, and 10 in peptide 3973 and bears alanine at the other positions. The pattern of recognition of peptide 6302 was similar to that of 3973 as an indication that the consensus sequence FXQXXXDKPXX defines the minimal sequence structure required for a proper recognition. More than 90% of the sera recognized peptide 6302.

In order to determine whether there is any correlation between the reactivity detected against peptides 3973 and 6302, a paired correlation analysis was carried out. The results shown in Table 2 indicate the existence of a statistically significant correlation in the recognition of these peptides, with values of r of 0.691 ($P < 0.001$) for chagasic patients, 0.568 ($P < 0.005$) for patients with cardiac clinical manifestations, and 0.578 ($P < 0.001$) for patients with digestive clinical manifestations.

TABLE 2 Correlation between the reactivity of sera against peptides 3973 and 6302

Subject group ^a	Correlation for 3973 vs 6302	
	P value	r
Chagasic patients	<0.001	0.691
IND	<0.001	0.556
CCC	<0.005	0.568
DIG	<0.001	0.578

^aIND, chronic Chagas' disease patients with indeterminate clinical form of the disease; CCC, chronic cardiac Chagas' disease patients; DIG, chronic Chagas' disease patients with abnormalities in the gastrointestinal tract.

DISCUSSION

Several serological methods for diagnosis of ChD have been developed and are being used across the world, as they have proven high rates of sensitivity ranging from 88 to 100% and specificity near 95% (26). The cross-reactivity of the mentioned methods is mainly due to the recognition of shared antigens present in *Leishmania* and *Trypanosoma rangeli* parasites (5). Given that a few infected patients do not seem to be properly diagnosed, WHO recommends that the diagnosis be made using two serological tests and positive results by the two tests be considered evidence of infection (11, 31). Many antigens of *Trypanosoma cruzi* that contain highly repetitive immunogenic amino acid motifs have been used in diagnostic tests for Chagas' disease. These repetitive motifs provide markedly improved specificity compared to that obtained using conventional tests (14). In the study described in the present paper, we analyzed the reactivity of sera from Chagas' disease patients at different clinical phases of the disease against five 12-mer peptides that correspond to different tandem repeats from the TcCA-2 immunodominant antigen of *T. cruzi* (4). The data presented show that three out of the five different repeats contained in a TcCA-2 membrane surface protein, peptide 3972 (sequence, FGQAAAGDKPPP), peptide 6303 (sequence, FGQAAAGDKPAP), and peptide 3973 (sequence, FGQAAAGDKPSL), are recognized with high sensitivity (>90%) by sera from symptomatic and nonsymptomatic chronic ChD patients. These peptides are not recognized by sera from patients in the orally acquired acute phase of the disease.

The level of recognition detected against each one of the assayed repeats is not related to the abundance of the epitopes in the TcCA-2 protein (GenBank accession number [EAN97076](#)), since the highest level of reactivity is directed against the 3973 epitope, which is the least represented repeat in the protein (2 repeats). A similar recognition level was observed with sera from different regions where ChD is endemic (laboratory data). It has been described that the homologous tandemly repetitive sequences present in the B13 antigen from *T. cruzi* (Y strain) can be presented for T-cell recognition in the context of at least three distinct HLA class

II molecules (1). Furthermore, our results also show that a single amino acid divergence in a particular position of the repeat (P in position 10 replaced by L or D in position 8 replaced by G) resulted in a dramatic reduction of the percentage of patients' sera that recognized the peptide, an indication of the essential role that certain amino acids may play in the conformation of the immunodominant antigenic epitope. Moreover, a dramatic reduction in the recognition level was also detected when the amino acids F, Q, and K at the first, third, and ninth positions were mutated in peptide 3973. However, amino acid substitution at positions 2 (G replaced by A), 6 (A replaced by E), 7 (G replaced by A), 11 (S replaced by P or A), and 12 (L replaced by P or A) are irrelevant in terms of the recognition level.

The 3973 epitope does not cross-react with sera from patients with leishmaniasis and other related infectious diseases, showing a degree of specificity higher than 98% when tested against the sera from ChD patients. Moreover, the level of recognition of the 3973 peptide by sera from patients at the symptomatic chronic phase involving cardiac or digestive alterations is higher ($P < 0.01$ and $P < 0.005$, respectively) than that by sera from patients at the indeterminate phase of the disease. The data presented here also show that the 3973 epitope is not recognized by the sera from individuals with SLE, rheumatoid arthritis, or celiac disease or patients with a nonchagasic cardiomyopathy. The results suggest the presence of the parasite in tissues from chronic ChD patients and its essential role in the pathogenesis of the chronic phase of this disease (20, 28, 33).

The higher level of 3973 epitope-specific antibodies observed in sera from symptomatic chronic ChD patients than in sera from asymptomatic patients may be associated with parasite proliferation in the infected tissues due to a breaking off of the fragile equilibrium between the host immune response and the proliferation of parasites in patients at the indeterminate phase of the disease. In fact, an association between the parasite load and sickness severity has been described (22). However, the possibility cannot be excluded that during the infection the mimicry of parasite antigens with host self-antigens might lead to immune confusion and activation of the response against particular antigenic epitopes of the parasite. Supporting this assumption, it has been described that CD4⁺ T-cell clones that infiltrated the hearts of CCC patients cross-recognize human cardiac myosin and the *T. cruzi* B13 protein (17).

We believe that regardless of the cause of the variation in reactivity against the 3973 peptide during instauration and progression of chronic ChD, the results described here have an important value for the follow-up of patients with this disease and for the evaluation of tissue damage progression. In fact, a positive trend (Jonckheere-Terpstra test) was found between the level of reactivity against the 3973 peptide in sera from chronic ChD patients and the severity of the cardiac damage determined by the Kuschnir classification (G0 to G2/G3), as well as between patients with digestive alterations of ChD and patients at the indeterminate phase. Thus, the diagnostic technique described has demonstrated high sensitivity and specificity, and its results can correlate with the degree of pathology of chronic ChD and define when a ChD patient in the indeterminate phase may progress toward a phase with cardiopathy or digestive disorders. Currently, the treatment with benznidazole or nifurtimox has been shown to be effective in patients at the acute phase of the disease, but its efficacy in adult patients at the chronic phase is under consideration (21, 39).

There is a pressing need for useful tools that may discriminate between different grades of disease severity to help the clinician to decide whether or not to treat a particular chronic ChD patient and to make a favorable posttreatment follow-up.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. E. Patarroyo (Fundación Instituto de Inmunología, Bogotá, Colombia) and Henry Bermudez, María Angelita Lorenzo, and Adriana Gauna (Instituto de Medicina Tropical, Venezuela) for providing some of the synthetic peptides, as well as L. Murcia and A. Iborra from the Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia, Spain) for their assistance in collecting biological samples. We also thank C. Juárez and M. A. Martínez from the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) for their help in collecting serum samples from patients suffering autoimmune diseases and A. López-Barajas (IPBLN-CSIC) for technical assistance in serological tests. M.C.T., O.N., B.A.d.N., and M.C.L. are members of the NHEPACHA network (Latin America Network for Chagas' disease).

This study was supported by grants P08-CVI-04037PAI (Junta de Andalucía), BFU2010-1670 from Plan Nacional I+D+i (MICINN), RD06/0021/0014 and RD06/0021/1007-ISCIII-RETIC (MICINN, Spain), and FEDER. M.S. and B.C. were supported by grant FIS, 2009SGR385, from ISCIII (MICINN, Spain).

REFERENCES

- Abel LC, et al. 2005. T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes Infect.* 7:1184–1195.
- Alarcon de Noya B, et al. 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J. Infect. Dis.* 201:1308–1315.
- Berzibetta M, et al. 2006. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfus. Med.* 16:419–431.
- Buschiazzo A, et al. 1992. Sequence of the gene for a *Trypanosoma cruzi* protein antigenic during the chronic phase of human Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54:125–128.
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. 2007. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:1045–1049.
- Cunha-Neto E, et al. 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:3541–3545.
- da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 17:286–291.
- Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. 2005. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* 21:581–587.
- Fernandez-Villegas A, et al. 2011. Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC Infect. Dis.* 11:206.
- Frasch AC, Cazzulo JJ, Aslund L, Pettersson U. 1991. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol. Today* 7:148–151.
- Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. 2009. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(Suppl 1):115–121.
- Goto Y, Carter D, Reed SG. 2008. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *Infect. Immun.* 76:3967–3974.
- Gruber A, Zingales B. 1993. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp. Parasitol.* 76:1–12.
- Hernandez P, et al. 2010. Highly effective serodiagnosis for Chagas' disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 17:1598–1604.
- Hoff DF, et al. 1989. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect. Immun.* 57:1959–1967.

16. Houghten RA. 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:5131–5135.
17. Iwai LK, Juliano MA, Juliano L, Kaldi J, Cunha-Neto E. 2005. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *J. Autoimmun.* 24:111–117.
18. Jackson Y, et al. 2009. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 15:601–603.
19. Kuschnir E, et al. 1985. Evaluation of cardiac function by radiolabeled angiography, in patients with chronic Chagascardiopathy. *Arq. Bras. Cardiol.* 45:249–256.
20. Marcon GE, et al. 2011. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106:85–91.
21. Marin-Neto JA, et al. 2008. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the Benzimidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomatids (BENEFIT). *Am. Heart J.* 156:37–43.
22. Martin D, Tarleton R. 2004. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Rev.* 201:304–317.
- 22a. Martin F, et al. 1997. Identification of a *Trypanosoma cruzi* membrane epitope implicated in the infectivity of fibroblast LLC-MK2 cells. *Parasitol. Res.* 83:226–232.
23. Munoz J, et al. 2009. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin. Infect. Dis.* 48:1736–1740.
24. Munoz J, et al. 2009. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop.* 111:51–55.
25. Murcia L, Carrilero B, Munoz MJ, Iborra MA, Segovia M. 2010. Usefulness of PCR for monitoring benzimidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1759–1764.
26. Otant MM, et al. 2009. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion* 49:1076–1082.
27. Pinazo MJ, et al. 2010. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterol. Hepatol.* 33:191–200.
28. Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 1:92–100.
29. Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. 2007. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol.* 115:279–283.
30. Rassi A, Jr, Rassi A, Little WC. 2000. Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol.* 23:883–889.
31. Rassi A, Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *Lancet* 375:1388–1402.
32. Schofield CJ, Janntin J, Salvatella R. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22:583–588.
33. Tarleton RL. 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31:550–554.
34. Reference deleted.
35. Thomas MC, et al. 2001. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clin. Exp. Immunol.* 123:465–471.
36. Umezawa ES, et al. 1999. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J. Clin. Microbiol.* 37:1554–1560.
37. Umezawa ES, et al. 2004. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J. Clin. Microbiol.* 42:449–452.
38. Viotti R, et al. 2011. Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e1314.
39. Viotti R, et al. 2006. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benzimidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann. Intern. Med.* 144:724–734.

4.3 NUEVOS INDICADORES SEROLÓGICOS

POINENCIA

Manuel Carlos López¹
Ana Fernández-Villegas¹
Concepción Maraño¹
Bartolomé Carrilero²,
María Jesús Pinazo³,
Joaquim Gascón³,
Manuel Segovia²,
M^a Carmen Thomas¹

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra –CSIC– Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Avda. del Conocimiento S/N. 18100 Armilla, Spain.

²Hospital Virgen de la Arrixaca. Murcia, Spain.

³Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain.

Correspondencia:
Manuel Carlos López
E-mail: mclopez@ipb.csic.es

Nuevos Indicadores serológicos

Resumen

En este estudio, se analiza el reconocimiento de los antígenos recombinantes KMP11, PFR2, HSP70 y Tgp63 del parásito *Trypanosoma cruzi*, así como un péptido contenido en la proteína TcMa del mencionado parásito, por sueros de 24 pacientes adultos en diferentes fases de la enfermedad de Chagas que viven en un país no endémico. Se analiza la dinámica del reconocimiento de estos antígenos en cada paciente tras el tratamiento con benznidazol. Los resultados obtenidos evidencian una disminución, estadísticamente significativa, del nivel de anticuerpos específicos frente a los antígenos KMP11, HSP70 y PFR2, la cual ocurre rápidamente post-tratamiento (tres o seis meses). Asimismo, se muestra que las modificaciones observadas en el patrón de respuesta humoral frente a los antígenos bajo estudio tras el tratamiento son diferentes dependiendo del estadio de la enfermedad del paciente. Así, en este manuscrito se describe un sistema indicador serológico potencialmente útil para analizar la evolución de la enfermedad de Chagas post-tratamiento y una herramienta que, probablemente, pueda permitir una detección temprana del fracaso terapéutico.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Antígenos recombinantes. Respuesta humoral. Benznidazol.

Summary

In this study, it is analyzed the recognition of KMP11, PFR2, HSP70 and Tgp63 recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi* and a TcMa protein-derived peptide from this parasite by sera from 24 adult Chagas disease patients at different stages of the sickness who live in a non-endemic country. It has also been explored the dynamic of humoral recognition of individual antigens by each patient after benznidazol treatment. The obtained results evidence that shortly post-treatment (three or six months) a statistically significant decrease of the level of specific antibodies against KMP11, HSP70 and PFR2. Moreover, we observed that the humoral response patterns to specific antigens in chagasic patients after benznidazol treatment changes in a different way depending on the status of the sickness. Consequently, in this paper it is described a potential useful serological marker system for monitoring the evolution of Chagas disease after treatment and a tool that probably may allow an early detection of therapeutic failure.

Key words: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Recombinant antigens. Humoral response. Benznidazol.

Introducción

La enfermedad de Chagas es endémica del continente americano, y afecta con elevados índices de morbilidad y mortalidad a más de 10 millones de personas¹⁻³. El agente etiológico es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, que se transmite principalmente por un insecto hematófago vector. El actual intenso flujo migratorio de personas de América Latina hacia el territorio español ha hecho de ésta una enfermedad emergente en nuestro entorno^{4,5}, en el que la transmisión vertical (congénita) y por transfusión sanguínea son las vías de contagio prevalentes. La enfermedad de Chagas involucra tres fases distintas: una fase aguda, inaparente en la mayoría de los casos, una fase indeterminada asintomática, que compromete cerca del 60% de los casos serológicamente positivos, y una fase crónica sintomática, que se caracteriza por la aparición de cardiomegalia, anomalías electrocardiográficas, arritmias, aperistalsis, megaesófago y megacolon, pudiendo llegar a causar la muerte⁶⁻⁸.

El tratamiento con benznidazol es muy efectivo en pacientes en fase aguda, controlando la enfermedad y/o disminuyendo la probabilidad de progresión a fase crónica, sin embargo en esta fase crónica su efectividad no está aún firmemente demostrada^{9,10}. Actualmente, el diagnóstico se realiza principalmente mediante técnicas serológicas. Los tests diagnósticos comerciales utilizan extractos de proteínas totales del parásito, o bien combinaciones de antígenos recombinantes^{11,12}. En general, estos sistemas tienen una alta sensibilidad y especificidad pero resultan poco útiles para evaluar la evolución de los pacientes bajo tratamiento, ya que el título de anticuerpos detectado frente a proteínas totales o mezcla de antígenos se mantiene durante largo tiempo⁹. Probablemente, el tratamiento induce la disminución de la concentración de algunos anticuerpos debido a la disminución de la carga parasitaria pero, al mismo tiempo, la destrucción del parásito conduce a la exposición al sistema inmune de componentes resultantes de la destrucción parasitaria, con la consiguiente inducción de anticuerpos con otras especificidades. Conjuntamente, estos dos efectos conllevan a una aparente estabilidad del nivel de anticuerpos medido frente a lisados de proteínas totales o mezcla de antígenos.

En el presente trabajo estudiamos la dinámica del nivel de anticuerpos existente en pacientes chagásicos frente a específicos antígenos recombinantes de *T. cruzi* (KMP11, PFR2, HSP70 y Tgp63), así como frente a un péptido correspondiente a una secuencia repetida contenida en la proteína TcMa, denominado 3973. El análisis se ha realizado en cada paciente pre- y post-tratamiento con benznidazol. Los resultados obtenidos ponen en evidencia la existencia de singulares patrones de reconocimiento de los mencionados antígenos, observándose que el nivel de anticuerpos frente a éstos se modifica tras el tratamiento con benznidazol y de forma diferente dependiendo del estadio de la enfermedad

Métodos y materiales

Sujetos a estudio

Se recogieron muestras de 24 pacientes adultos de Chagas del Hospital Clínic en Barcelona y del Hospital Virgen de la Arrixaca en Murcia. Todos los pacientes residían en España y procedían de zonas endémicas. Los pacientes incluidos en el estudio no habían recibido previamente tratamiento con benznidazol/nifurtimox. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se realizó mediante el uso de al menos dos tests serológicos comerciales (ELISA -BioElisa Chagas, Biokit S.A., Spain; Ortho-*T. cruzi* Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, USA) e IFI (Inmunofluor Chagas, Biocientífica S.A., Argentina) y los pacientes se consideraron indeterminados cuando eran seropositivos sin sintomatología ni signos de afectación cardiológica o digestiva. Los pacientes de Chagas crónico con sintomatología cardíaca, se clasificaron de acuerdo a la descripción descrita por Kuschner y colaboradores, en grupos de G1 a G3, en grado creciente de gravedad¹³.

Tras la extracción de las muestras de sangre periférica, todos los pacientes fueron tratados con benznidazol (5mg/kg/día durante 60 días). Posteriormente se extrajeron muestras de sangre a intervalos regulares de tiempo y a lo largo de un año, T1 = tres, T2 = seis, T3 = nueve meses post-tratamiento. Los protocolos empleados fueron aprobados por los Comités Éticos del Hospital Clínic, del Hospital Virgen de la Arrixaca y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Todos los participantes firmaron un formulario de consentimiento informado previo a la inclusión en el estudio.

Purificación de proteínas y síntesis péptidica

Las proteínas de *Trypanosoma cruzi*, KMP11, HSP70 y PFR2 se sobreexpresaron en *Escherichia coli* usando vectores de expresión procarionota y se purificaron a homogeneidad siguiendo la metodología previamente descrita¹⁴⁻¹⁶. El fragmento Tgp63 de *Leishmania infantum* se clonó en el plásmido pQE30 y se sobreexpresó en la cepa M15 de *E. coli* con 0,1 mM de isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) durante 1,5 horas a 37°C. Tras solubilizar la proteína en tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, ClNa 300mM), se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ empleando la resina NTA (Quiagen). La proteína se eluyó en el mismo buffer a pH 4-5. Las proteínas se visualizaron en geles de poliacrilamida tras tinción con azul Coomassie. La concentración de las mismas se determinó mediante el kit Micro BCA para proteínas (Thermo Scientific).

Para la obtención del lisado de antígenos solubles de *T. cruzi* (STcA) se utilizó mezcla de formas amastigotas y tripomastigotas (1:1) obtenidos por infección de monocapas de células LLC-MK2 con tripomastigotes. Los parásitos se

lavar con PBS 1x, y el pellet se resuspendió en NET-2 (50 mM Tris HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,05% Nonidet P-40, 1 µg/ml leupeptina, 1mM PMSF). Tras sonicación, se centrifugó 20 minutos a 10,000 rpm y 4°C y se recogió el sobrenadante.

3973 peptide (12 mer) was chemically synthesized by solid phase synthesis (SPS) using Fmoc technique as described previously¹⁷. The peptide stock was maintained at 1µg/µl in PBS.

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Los tests de ELISA se realizaron siguiendo la metodología descrita en Thomas y colaboradores¹⁸. Brevemente, los pocillos de ELISA (Nunc) se cubrieron con 0,5 µg de proteína y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con 200 µl de PBS-0,05% Tween-20 y se incubaron durante dos horas con solución bloqueante (PBS al 5% en leche en polvo desnatada). Después, se añadieron los sueros de pacientes a dilución 1/800 (para HSP70, PFR2 y Tgp63), 1/3.200 (para KMP11) y 1/6.400 para STcA, durante dos horas a 37°C. Como anticuerpo secundario, se utilizó anti-IgG conjugado a peroxidasa (Biosource) a dilución 1:2.000 y se incubó durante 1h, a 37°C. Tras lavar los pocillos, la reacción se reveló usando ortofenilidiamina durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Se paró la reacción con ácido sulfúrico 2N, y se midió la absorbancia a 492 nm. Los sueros fueron ensayados por triplicado y a dos diluciones. En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos.

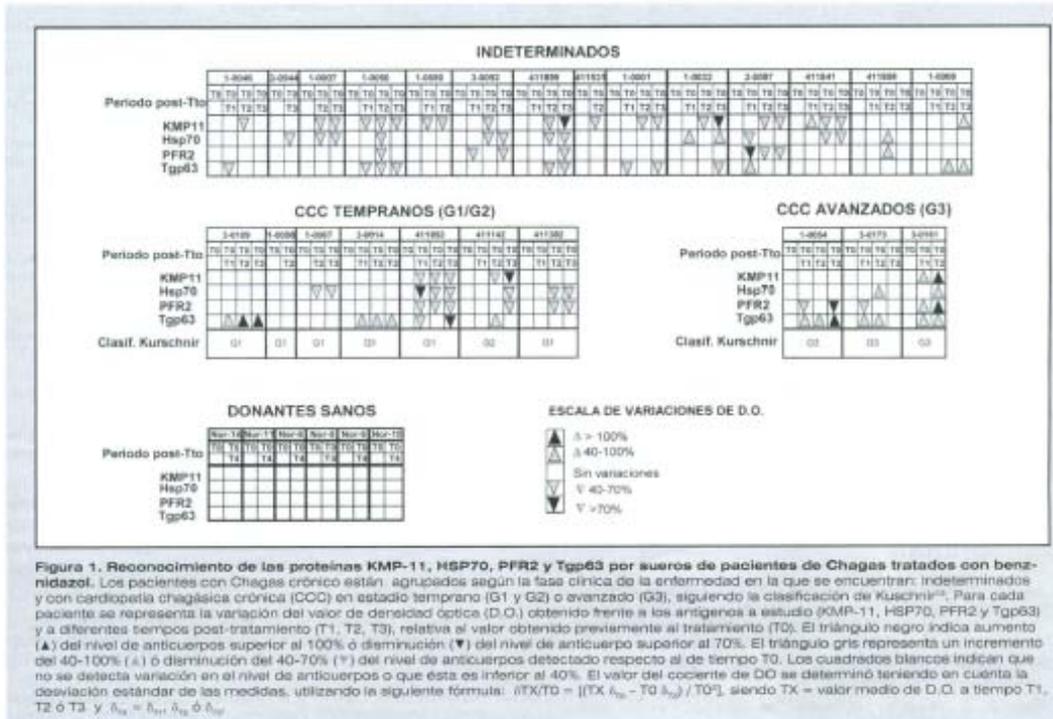
Resultados y discusión

Estudios previos del laboratorio han mostrado que el nivel de anticuerpos frente a los antígenos KMP11, HSP70, PFR2, Tgp63 de *Trypanosoma cruzi* es superior en pacientes de Chagas, y estadísticamente significativo, al existente en donantes sanos. Considerando el estadio de la patología chagásica, se observa que, tanto los pacientes con Chagas crónico en fase indeterminada como aquellos con sintomatología cardíaca o digestiva presentan un nivel de anticuerpos, frente a los mencionados antígenos, estadísticamente superior que aquél detectado en donantes sanos ("observaciones no publicadas" - Fernández-Villegas, Pinazo, *et al.*, 2010. Sometido tras revisión). Recientemente hemos caracterizado una secuencia peptídica, denominada 3973, que es reconocida por enfermos de Chagas con alta especificidad y sensibilidad ("observaciones no publicadas" - Thomas, Fernández-Villegas, *et al.* 2010. Sometido). Dicha secuencia está contenida en la proteína de membrana TcMa de *T. cruzi* la cual es homóloga a los antígenos TcCA219, TCR3920 o B13²¹. Esta proteína contiene el dominio TcMe el cual se ha descrito que está implicado en el proceso

de internalización del parásito en la célula hospedera²². Recientemente, hemos observado que los pacientes en fase crónica sintomática (CCC y DIG) presentan una tasa de anticuerpos frente a la mencionada secuencia peptídica estadísticamente superior a la presente en los pacientes crónicos en fase indeterminada (IND) ("observaciones no publicadas" - Thomas, Fernández-Villegas, *et al.*, 2010. Sometido). Estos datos sugieren que esta molécula pueda ser un indicador de progresión de la enfermedad de Chagas.

Con el objetivo de estudiar la evolución de la respuesta humoral frente a los mencionados antígenos de *T. cruzi* en pacientes de Chagas en distinta fase de la enfermedad y tras tratamiento con benznidazol, se determinó el nivel de anticuerpos existentes frente a ellos en sueros de pacientes chagásicos pre- y post-tratamiento con benznidazol y se analizó el patrón de reconocimiento y variación de éste a lo largo del tratamiento. Así, los pacientes de Chagas a estudio mostraron un descenso, estadísticamente significativo, en el nivel de anticuerpos específicos frente a los antígenos KMP11, HSP70 y PFR2 a los seis y nueve meses post-tratamiento. Sin embargo, el reconocimiento de los antígenos totales solubles del parásito (STcA), resultó invariable en los pacientes. Los resultados obtenidos frente a STcA están de acuerdo con los datos reportados por diferentes autores que muestran que el seguimiento a corto y medio plazo de pacientes chagásicos bajo tratamiento, empleando extracto de proteínas totales de parásitos o mezcla de antígenos recombinantes no conduce a resultados concluyentes^{12,23}.

Cuando analizamos la respuesta humoral antígeno-específica en pacientes tratados con benznidazol considerando la fase de la enfermedad, observamos en términos generales, un diferente comportamiento dependiente de antígeno, evidenciándose una cierta asociación entre la fase de la enfermedad y determinados patrones de reconocimiento (Figura 1). En general, se observa una disminución en el nivel de anticuerpos frente a las proteínas KMP11, HSP70 y PFR2 en pacientes en fase indeterminada y una disminución o no modificación del nivel de anticuerpos frente a Tgp63. En pacientes crónicos con manifestación cardíaca en fase temprana (G1 o G2) se detectó, igualmente, una disminución o no variación del nivel de anticuerpos existente frente a KMP11, HSP70 y PFR2 y persistencia o aumento del nivel de anticuerpos frente a Tgp63. Sin embargo, los pacientes con manifestación cardíaca en fase avanzada no presentaron, en general, disminución del nivel de anticuerpos frente a dichas proteínas. En todos los grupos de pacientes se observan individuos que muestran patrones singulares, muy diferenciados del patrón general de su grupo (Figura 1). Un estudio minucioso de la clínica y la historia clínica de estos pacientes reveló que algunos de ellos sufrían complicaciones digestivas. En otros casos, no se han encontrado características clínicas singulares por lo que dichos pacientes están actualmente bajo seguimiento. Al analizar las modificaciones en el nivel de anticuerpos



detectado frente al péptido contenido en la proteína TcMa, evidenciamos la inexistencia de variación en el mismo en pacientes en fase indeterminada. Sin embargo, se detecta una significativa disminución en el nivel de anticuerpos frente al mencionado péptido en el 50% (6 de 12) de los pacientes chagásicos crónicos con compromiso cardíaco en fase temprana (G1/G2) y en el 90% (7 de 8) de aquellos en fase cardíaca avanzada (G3).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con benznidazol estaría influenciando, a corto plazo, el reconocimiento de antígenos específicos de *T. cruzi* dependiendo de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente. Esto podría ser una consecuencia de una exposición particular y diferenciada de cada antígeno al sistema inmune o, alternativamente, a la capacidad del sistema inmune de reconocer antígenos dependiendo de la fase de la enfermedad y producir respuesta aunque esta contribuya o no al control de la parasitemia. En este contexto, se ha descrito recientemente²⁴ el reconocimiento por sueros de pacientes de Chagas residentes en zonas endémicas de un extenso panel de proteínas recombinantes, observándose que, en general, cada suero tenía un diferente patrón de reactividad.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el establecimiento de un patrón individualizado del reconocimiento de diferentes antígenos de *T. cruzi* y su análisis pre y post-tratamiento podría asociarse al estado de la enfermedad de Chagas. En el caso de los pacientes indeterminados se observa post-tratamiento un patrón de comportamiento similar en 9 de 14 pacientes detectándose una disminución en el nivel de anticuerpos frente a, al menos, dos antígenos de los ensayados. En pacientes crónicos con compromiso cardíaco, evaluado según los índices de Kuschner¹², se pueden definir dos grupos de reconocimiento diferentes uno correspondiente a la fase temprana de la enfermedad (G1,G2) y otro a la fase avanzada (G3) de la misma. Los pacientes en fase avanzada mostraban un aumento en el nivel de anticuerpos frente a la mayoría de los antígenos estudiados. Por tanto, el estudio de la evolución de la respuesta humoral específica frente a varios antígenos, analizada de forma individual y simultánea en sueros de pacientes chagásicos pre- y post-tratamiento permite la identificación de patrones singulares que pueden ser correlacionados con el estado/ evolución de la enfermedad. Así, el sistema indicador serológico descrito en el presente trabajo probablemente será

una herramienta útil para el seguimiento de los enfermos de Chagas bajo tratamiento.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Doctor J. Muñoz y Dña E. Fosada del Hospital Clinic (Barcelona); Dña. A. Iborra del Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia), Doctores C. Juárez and M.A. Martínez del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) y Doctor. O. Noya del Instituto de Medicina Tropical (Caracas, Venezuela), por la caracterización clínica de los pacientes chagásicos y ayuda en la obtención de las muestras biológicas y síntesis del péptido 3973. Igualmente nuestro agradecimiento a Dña. A. Lopez-Barsajas (IPBLN-CSIC, Granada) por su asistencia técnica en la purificación de las proteínas recombinantes. El trabajo ha sido financiado por el Proyecto de excelencia Ref. P08-CVI-04037 (Programa PAI de la Junta de Andalucía); Proyecto Ref. RD06/0021/0014 (Programa FETIC del ISCIII- MICINN), así como por los fondos FEDER de la Unión Europea.

Bibliografía

1. The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). 2007. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico 17-20 de Abril de 2005 - Actualizado en julio de 2007. Buenos Aires, Argentina. Guhl F, Lazdins-Helds J.K. (Eds), p. 97.
2. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 2006;22:583-8.
3. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375:1388-402.
4. Muñoz J, Gomez I, Prat J, Gallego M, Gimeno F, et al. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop* 2009;111:51-5.
5. Jackson Y, Myers C, Diana, et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2009;15: 601-3.
6. Rassi A, Jr., Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Curr Cardiol* 2000;23:883-9.
7. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 2001;1:92-100.
8. Purukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 2007;115:279-83.
9. Viotti R, Vigliani C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994;127:151-62.
10. Marin-Neto JA, Rassi A, Jr., Morillo CA, et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 2006;156:37-43.
11. Brito C, Silveira C, Cardoso MA, et al. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:823-6.
12. Viotti R, Vigliani C, Lococo B, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Am Intern Med* 2006;144: 724-34.
13. Kuschnir E, Sgammari H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radionuclide angiography. In patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol* 1985;45:249-56.
14. Thomas MC, Garcia-Perez JL, Alonso C, Lopez MC. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol* 2000;19:47-57.
15. Maranon C, Planelles L, Alonso C, Lopez MC. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *Int Immunol* 2000;12:1685-93.
16. Morell M, Thomas MC, Caballero T, Alonso C, López MC. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 2006;24:7046-55.
17. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5131-5.
18. Thomas MC, Longobardo MV, Carmelo E, et al. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi*/kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clin Exp Immunol* 2001;123:465-71.
19. Buschiazzo A, Campetella DE, Macina RA, Salceda S, Frasch AC, Sanchez DO. Sequence of the gene for a *Trypanosoma cruzi* protein antigenic during the chronic phase of human Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1992;54:125-8.
20. Hoff DF, Kim KS, Otsu K, et al. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun* 1989;57:1959-67.
21. Gruber A, Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 1993;76:1-12.
22. Martin F, Thomas MC, Maranon C, et al. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigenic epitope implicated in the infectivity of fibroblast LLC-MK2 cells. *Parasitol Res* 1997;83:226-32.
23. Rassi A, Luquetti AD, Ornelas JF, et al. The impact of the extensive chemical control of *Triatoma infestans* on the incidence of acute cases and the prevalence of human Chagas disease. The example of Montalvania, Minas Gerais State). *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36:719-27.
24. Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, et al. High Throughput Selection of Effective Serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e316.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana es una zoonosis endémica del continente americano causada por el protozoo flagelado hematófilo *Trypanosoma cruzi*. El parásito es transmitido al ser humano a través de insectos hematófagos. Se estima que existen entre 8 y 10 millones de personas infectadas en el mundo y que cerca de 40 millones están en riesgo de infectarse (Schofield and Galvao, 2009) (Coura and Dias, 2009). La enfermedad presenta unos elevados índices de mortalidad y morbilidad con trastornos cardiacos y digestivos. Actualmente, debido a los movimientos migratorios, la enfermedad de Chagas está presente en zonas no endémicas, donde la transmisión por transfusiones sanguíneas, transplantes de órganos y vía transplacentaria resultan en un alto número de nuevos casos (Wendel, 2010) (Barcan et al., 2005) (Carrilero et al., 2009).

La enfermedad cursa con diferentes fases; una fase aguda subclínica en la mayoría de los casos, donde el parásito puede ser visto en sangre circulante, ocasiona la muerte en el 10% de los pacientes. A la fase aguda le sigue una fase indeterminada inaparente y una fase crónica (40% de los pacientes) en la que el parásito persiste en tejidos profundos y a la que se le asocian altas tasa de mortalidad y morbilidad. A lo largo de la fase crónica, pueden aparecer sintomatologías cardiacas como arritmias, anormalidades electrocardiográficas, cardiomegalias y/o disfunción sistólica, o sintomatologías digestivas como aperistalsis, megaesófago y megacolon, menos severas pero asociadas a alta morbilidad. En fases avanzadas, la enfermedad crónica de Chagas puede causar la muerte (Prata, 2001; Pুনুকল্লু et al., 2007).

Los dos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Benznidazol y el Nifurtimox. Ambos fármacos presentan diversos efectos secundarios, como fiebres, dolores musculares, pérdida de peso, y reacciones cutáneas. En la fase inicial aguda, la administración de estos medicamentos ayuda a controlar la enfermedad y disminuyen la probabilidad de cronicidad (Jannin and Villa, 2007), pero en fases crónicas su efectividad no está firmemente demostrada. Estudios previos han indicado que el tratamiento con benznidazol en pacientes asintomáticos retrasa la aparición de daños cardiacos (Gallerano and Sosa, 2000; Viotti et al., 1994).

Actualmente, las pruebas serológicas más utilizadas para el diagnóstico de Chagas son el ensayo de hemaglutinación (IHA), el ensayo de

inmunofluorescencia (IFI) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los antígenos que contienen estos tests son extractos de proteínas totales de parásito o una combinación de proteínas recombinantes del mismo (Britto et al., 2001; Viotti et al., 2006). Estas técnicas son capaces de detectar la respuesta de anticuerpos producida frente a las proteínas de parásitos en sueros de pacientes de Chagas, aunque nos son útiles para diferenciar entre pacientes en fase crónica indeterminada y en fase crónica sintomática de la enfermedad (WHO, 2002). Además, resultan poco útiles para evaluar la progresión de pacientes bajo tratamiento, ya que los títulos medidos con estos métodos son muy estables y persisten durante mucho tiempo (Cancado, 2002) Probablemente, el tratamiento induce la disminución de la concentración de algunos anticuerpos debido a la disminución de la carga parasitaria pero, al mismo tiempo, la destrucción del parásito conduce a la exposición al sistema inmune de componentes resultantes de la lisis parasitaria, con la consiguiente inducción de anticuerpos con otras especificidades. Por tanto, las pruebas serológicas convencionales no permiten detectar rápidamente la evolución de respuesta después del tratamiento y por tanto reconocer fallos terapéuticos.

Así, sobre la base de los anteriores consideraciones, se propusieron como objetivos la identificación de moléculas útiles como marcadores serológicos de patología de la enfermedad de Chagas en su estadio crónico, y de moléculas capaces de determinar el impacto terapéutico en dichos pacientes.

5.1 BIOMARCADOR DE PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN ESTADIO CRÓNICO.

Se han publicado diversos trabajos que describen antígenos de *T. cruzi* que contienen secuencias repetidas de aminoácidos inmunogénicas susceptibles de ser utilizadas en pruebas diagnósticas de la enfermedad de Chagas. Estas secuencias de aminoácidos repetidas proporcionan una alta especificidad mejorando notablemente la obtenida con pruebas convencionales (Hernandez et al., 2010; Valiente-Gabioud et al., 2011). Con el propósito de encontrar secuencias peptídicas que fueran capaces de discernir entre las distintas fase de la enfermedad, se analizó la reactividad de los sueros de pacientes de Chagas en las

fases clínicas de la enfermedad frente a cinco péptidos de tamaño 12-mer que corresponden a las distintas repeticiones en tándem del antígeno inmunodominante de *T. cruzi* TcCA-2 (Buschiazzo et al., 1992), de su homólogo TCR39 (Hoft et al., 1989) y antígenos de B13 (Gruber and Zingales, 1993). Así, diversos autores han descrito la existencia de una alta sensibilidad de reconocimiento de estos antígenos por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica (Abel et al., 2005; da Silveira et al., 2001). La TcCA-2 proteína también contiene el motivo TcMe que se ha descrito por estar implicado en la internalización del parásito en la célula huésped (Martin et al., 1997). Además, se ha descrito que las secuencias repetidas en tándem homólogas en el antígeno B13 de *T. cruzi* (cepa Y) pueden ser presentadas en asociación con al menos 3 moléculas distintas HLA de clase II a linfocitos T CD4⁺ (Abel et al., 2005).

Se observa que tres de los cinco péptidos contenidos en la proteína de la superficie de membrana TcCA-2; correspondientes a los péptidos 3972 (FGQAAAGDKPP), 6303 (FGQAAAGDKPAP), y 3973 (FGQAAAGDKPSL), son detectados con alta sensibilidad (>90%) por sueros de pacientes crónicos sintomáticos (crónicos con manifestaciones cardiacas o trastornos digestivos) y no por pacientes crónicos asintomáticos. Por el contrario, estos péptidos no son reconocidos por sueros de pacientes infectados por *T. cruzi* vía oral en fase aguda (Fig 1) (Thomas et al., 2012)

El nivel de reconocimiento frente a cada una de las repeticiones ensayadas no está relacionado con la abundancia de los epítopes de la proteína TcCA-2, ya que el nivel más alto de reactividad detectado es frente la secuencia 3973, que precisamente es la menos presentada en la proteína (2 repeticiones). Además, el análisis de los resultados obtenidos con el reconocimiento de las variantes naturales demuestran que cambios específicos de dos posiciones particulares de la repetición (P en posición 10 reemplazado por L ó D en la posición 8 reemplazada por G) resultan en una reducción drástica del porcentaje de los sueros de los pacientes que reconocen el péptido, indicando la función esencial que ciertos aminoácidos pueden estar implicados en la conformación del epítope antigénico inmunodominante. Por otra parte, se ha detectado una fuerte disminución en el nivel de reconocimiento cuando los aminoácidos F, Q y P en las posiciones primera, tercera y novena fueron mutados en el péptido 3973. Sin embargo, la sustitución de aminoácidos en las posiciones 2 (G sustituida por A), 6 (A sustituida por E), 7 (G sustituida por A, 11 (S sustituida por P o A), y 12 (L

sustituída por P o A) son irrelevantes en términos del nivel de reconocimiento (Fig 4) (Thomas et al., 2012).

Se realizó la síntesis del péptido 6302 con el fin de comprobar que los aminoácidos definidos como críticos eran los adecuados y que tenían la posición correcta la secuencia peptídica, para el reconocimiento de pacientes de Chagas. El péptido 6302 se caracteriza estructuralmente porque mantiene los aminoácidos de las posiciones 1, 8, 9 y 10 del péptido 3973 y las demás posiciones son sustituidas por alaninas. La estructura del péptido 6302 es FXQXXXDKPXX, siendo X aminoácido de alanina. El reconocimiento de los pacientes de Chagas frente al péptido 6302 tiene una especificidad del 90%. Debido a que el péptido 6302 presentó resultados muy similares en la respuesta humoral en enfermos de Chagas, se realizó un estudio de correlación entre la reactividad observada frente al péptido 3973 y el 6302 y se observó una correlación estadísticamente significativa tanto para el estudio realizado considerando todos los pacientes de Chagas como cuando se analizaron según la fase de la enfermedad de los pacientes (Table 2)(Thomas et al., 2012). De esta manera confirmamos que los aminoácidos definidos (F, Q, D, K, P) y su particular posición eran correctos en la secuencia peptídica, para comportarse como antígeno inmunodominante en la enfermedad de Chagas.

El péptido 3973 presenta un grado de especificidad superior al 98%. Así, el mencionado péptido usado como antígeno en ensayos de ELISA, no muestra tener reacciones cruzadas con sueros de pacientes con leishmaniasis y otras enfermedades infecciosas afines. De manera interesante, el nivel de anticuerpos frente el péptido 3973 por los sueros de los pacientes en la fase sintomática crónica que involucra alteraciones cardíacas o digestivas es más alto que el mostrado por los sueros de los pacientes en la fase crónica asintomática de la enfermedad ($p < 0,01$ y $p < 0,005$, respectivamente). Además, se muestra que el epítipo 3973 no es reconocido ni por sueros de individuos con enfermedades autoinmunes como artritis, lupus eritematoso sistémico o enfermedad celíaca, ni por pacientes con trastornos cardíacos pero no infectados con *T. cruzi*. (Fig 2) (Thomas et al., 2012). Los resultados sugieren la presencia del parásito en los tejidos de los pacientes de Chagas en fase crónica y su papel esencial en el origen de la fase crónica de esta enfermedad (Marcon et al., 2011; Prata, 2001; Tarleton, 2001).

El alto nivel de anticuerpos específicos frente al epítipo 3973 observado en los sueros de pacientes crónicos sintomáticos, y no en sueros de pacientes crónicos asintomáticos, podría estar asociados con la proliferación de los parásitos en los tejidos infectados debido a una ruptura del frágil equilibrio entre la respuesta inmune del huésped y la proliferación de los parásitos en los pacientes en la fase indeterminada de la enfermedad. Precisamente, ha sido descrita una asociación entre la carga parasitaria y la gravedad de la enfermedad (Benvenuti et al., 2008). Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que durante la infección el mimetismo de antígenos del parásito con antígenos del hospedador pudiera dar lugar a confusión inmunológica y activación de la respuesta inmune con reactividades cruzadas. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que células T CD4+ infiltradas en el corazón de pacientes crónicos con manifestaciones cardiacas presentan reacciones cruzadas entre la miosina humana y la proteína B13 de *T. cruzi* (Iwai et al., 2005).

Por otra parte, también se han realizado estudios de la respuesta humoral en pacientes de Chagas en los que se utilizó el péptido IMT1889, que contiene la secuencia del péptido 3973 repetida dos veces unidas por dos glicinas. FGQAAAGDKPSLGGFGQAAAGDKPSL. Se observa que los resultados obtenidos con el péptido IMT1889 fueron muy similares a los presentados por el péptido 3973. Se podría concluir que la secuencia de los 5 aminoácidos es imprescindible para el reconocimiento de los pacientes de Chagas y que si este epítipo se encuentra repetido en la secuencia peptídica el reconocimiento del enfermo de Chagas es muy similar (Tabla DI).

Tabla DI. Resultado de la serología con el péptido 3973 e IMT1889

	D.O. (Dilución 1/400)		D.O. (Dilución 1/800)	
	<i>IMT1889</i>	3973	<i>IMT1889</i>	3973
Paciente 1	0,896	1,033	0,802	0,830
Paciente 2	0,726	1,170	0,629	1,047
Paciente 3	0,801	0,818	0,774	0,627
Paciente 4	0,668	0,504	0,245	0,310
Donante sano 1	0,049	0,181	0,006	0,083

Pacientes de Chagas (morado) y donante sano (negro). Densidad Óptica (D.O.)

En nuestra opinión, independientemente de la causa de la variación de la reactividad frente al péptido 3973 durante la implantación y la progresión de la fase crónica de la enfermedad de Chagas, los resultados aquí descritos tienen un valor muy importante para el seguimiento de los pacientes de Chagas y para la evaluación de la progresión de daño tisular. De hecho, se encontró una tendencia positiva (prueba de Jonckheere-Terpstra) entre el nivel de reactividad frente el péptido 3973 en sueros de pacientes crónicos cardíacos y la gravedad del daño cardíaco determinado por la clasificación Kuschnir (G0 a G2/G3), así como entre los pacientes con alteraciones digestivas de la enfermedad de Chagas y los pacientes crónicos en fase indeterminada (Fig 3) (Thomas et al., 2012).

En resumen, la técnica de diagnóstico descrita se caracteriza por una alta sensibilidad y especificidad y, lo más importante, el nivel de anticuerpos detectados en pacientes de Chagas en fase crónica frente al péptido 3973 es capaz de ser correlacionado con el grado de patología crónica de la enfermedad de Chagas.

Sobre esta base, es posible que el seguimiento de la tasa de anticuerpos anti-3973 presente en pacientes de Chagas en fase crónica pueda identificar cuándo un paciente en fase indeterminada puede progresar hacia una fase con trastornos de cardiopatía o problemas digestivos. Nuevos estudios serán necesarios para poder demostrar el progreso de una fase crónica asintomática a fase crónica sintomática. Esta técnica ayudará a facilitar la labor desarrollada por el personal clínico en pacientes en estado crónico en fase asintomática, lo que permitirá detectar precozmente el comienzo de la fase crónica sintomática con trastornos cardíacos o digestivos.

5.2 MARCADORES SEROLÓGICOS ÚTILES PARA LA EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Uno de los objetivos de los trabajos desarrollados a lo largo de la presente tesis doctoral fue la búsqueda de marcadores inmunológicos susceptibles de ser sensibles al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas

y que además pudieran proporcionar un valor predictivo con valor diagnóstico. Hasta la fecha, el único criterio aceptado de cura parasitológica es la ausencia de anticuerpos medidos por ensayos convencionales frente a extractos de proteínas totales del parásito o bien mezcla de proteínas recombinantes (WHO, 2002). El factor limitante que presentan estos ensayos es que la seroconversión total es detectada a largo plazo (Cancado, 2002).

Por tanto, se exploró la respuesta humoral en pacientes de Chagas frente a un panel de antígenos del parásito: KMP11, HSP70, Th70, PFR1, PFR2, PFR3, S6, H2A, H2B, NL1Tc, C2L1Tc y Tgp63, usados como proteínas recombinantes y ensayadas individualmente. Las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y Tgp63 fueron seleccionadas para posteriores estudios porque los sueros de pacientes de Chagas mostraban el mayor grado de sensibilidad y especificidad de las moléculas ensayadas, así como una alta reproducibilidad (Fig 1.) (Fernandez-Villegas et al., 2011). Considerando el estadio de la patología chagásica, se observa que, tanto los pacientes con Chagas crónico en fase indeterminada como aquellos con sintomatología cardíaca o digestiva presentan un nivel de anticuerpos, frente a los mencionados antígenos, estadísticamente significativo, comparado con los donantes sanos (Fig 2.)(Fernandez-Villegas et al., 2011). Un resultado similar ha sido descrito para las proteínas recombinantes HSP70 de *T. rangeli* y KMP11 de *T. cruzi*, donde se mostraban además de que la respuesta generada está polarizada hacia un isotipo IgG1 (Flechas et al., 2009).

Se realizó un estudio de correlación en enfermos de Chagas entre el nivel de anticuerpos observado previamente a la administración del tratamiento con benznidazol y la edad, y se observó una correlación positiva entre el reconocimiento del antígeno PFR2 y la edad, sugiriendo que una exposición antigénica prolongada podría aumentar una activación de linfocitos B específicos de PFR2 y la secreción de IgG. Precisamente, han sido publicados que factores relacionados con el hospedador así como la edad a la cual el tratamiento es administrado son factores importantes para la variabilidad en el reconocimiento del patrón antigénico y en el éxito del tratamiento (Sanchez Negrette et al., 2008; Umezawa et al., 1999). Previamente al tratamiento, se estudió la correlación entre el reconocimiento de los diferentes antígenos y se observó una correlación significativa entre la detección de KMP11 y HSP70 por pacientes en fase crónica con manifestaciones cardíacas ($r=0,518$ $p=0,048$) o digestivas ($r= 0,632$ $p<0,02$). Además se encontró una correlación significativa entre KMP11 y PFR2 para pacientes con trastornos digestivos ($r=0.719$, $p<0,005$). Sin embargo, en pacientes

crónicos en fase indeterminada no se observaron correlaciones significativas entre el reconocimiento de los distintos antígenos a estudio. El reconocimiento antigénico diferencial es probablemente una consecuencia de una exposición diferente y particular de cada antígeno al sistema inmunitario del hospedador debido a su localización específica en el parásito o alternativamente a la habilidad del sistema inmunitario para reconocer antígenos dependiendo del estadio de la enfermedad. El estudio del reconocimiento de un panel de 16 proteínas recombinantes de *T. cruzi* por sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas que vivían en un área endémica ha sido reportado por (Cooley et al., 2008). Estos autores, observaron que el patrón de reconocimiento antigénico por parte de los sueros de pacientes de Chagas era específico para cada paciente y susceptible de ser modificado tras el tratamiento del paciente con benznidazol (Cooley et al., 2008). Sin embargo, estos autores no estudian la relación entre los distintos patrones y las diferentes manifestaciones de la enfermedad.

Actualmente, el tratamiento con benznidazol o nifurtimox han demostrado ser eficaces en pacientes en la fase aguda de la enfermedad, pero su eficacia en pacientes adultos en la fase crónica está todavía en evaluación (Sanchez Negrette et al., 2008). Por este hecho, hay una urgente necesidad de desarrollar herramientas útiles que pueden discriminar entre diferentes grados de severidad de la enfermedad para ayudar al clínico a decidir si se debe o no tratar a un paciente en particular con enfermedad crónica de Chagas y para hacer un seguimiento eficaz post-tratamiento. Uno de los retos en la enfermedad de Chagas es la falta de marcadores tempranos de cura o progresión de la enfermedad tras tratamiento parasitario. El uso de lisado total de proteínas de *T. cruzi* (STcA) o mezcla de proteínas recombinantes casi raramente proporciona resultados fiables a corto y medio plazo en pacientes tratados (Rassi et al., 2000; Sanchez Negrette et al., 2008; Viotti et al., 1994). La técnica de la PCR podría ser una opción útil en la identificación de fallo terapéutico, pero no es adecuado porque repetidas PCR con resultado negativo no indican cura parasitológica. No existe correlación directa entre PCR negativa y cura parasitológica (Jackson et al., 2009a).

Con el objetivo de estudiar la evolución de la respuesta humoral, frente a los antígenos de *T. cruzi* seleccionados (KMP11, HSP70, PFR2, Tgp63), en pacientes de Chagas en distinta fase de la enfermedad y tras tratamiento con benznidazol, se analizó el patrón de reconocimiento de los mismos, y su variación a lo largo del tratamiento. Así, los pacientes de Chagas a estudio mostraron un descenso

estadísticamente significativo, en el nivel de anticuerpos específicos frente a los antígenos KMP11, HSP70 y PFR2 a corto plazo (tres o seis meses) tras el inicio del tratamiento con benznidazol. Sin embargo, el reconocimiento de Tgp63 y los antígenos totales solubles del parásito (STcA), resultó invariable en los pacientes (Fig 3.) (Fernandez-Villegas et al., 2011). Los resultados obtenidos frente a STcA están de acuerdo con los datos publicados por diferentes autores que muestran que el seguimiento a corto y medio plazo de enfermos de Chagas bajo tratamiento, empleando extractos de proteínas totales de parásito o mezclas de antígenos recombinantes no conducen a resultados concluyentes (Viotti et al., 1994; Viotti et al., 2006).

Cuando analizamos la respuesta humoral antígeno-específica en pacientes de Chagas tratados con benznidazol considerando la fase de la enfermedad se observó, en términos generales, un comportamiento diferente dependiente de antígeno evidenciándose una cierta asociación entre la fase de la enfermedad y determinados patrones de reconocimiento (Fig 1. Lopez et al., Enfermedades emergentes). En general, se observó una disminución en el nivel de anticuerpos frente a las proteínas KMP11, HSP70 y PFR2 en pacientes en fase indeterminada y una disminución o no modificación del nivel de anticuerpos frente a Tgp63. Dicha disminución fue estadísticamente significativa en el nivel de anticuerpos anti-KMP11 para pacientes crónicos en fase indeterminada. En pacientes crónicos sintomáticos se observa una disminución estadísticamente significativa en el nivel de anticuerpos anti-HSP70 y PFR2 en pacientes crónicos con manifestaciones cardíacas. Cuando se evaluó en detalle el estado de enfermedad de los pacientes cardíacos crónicos, se determinó que los pacientes con manifestaciones cardíacas poco severas (G1 y G2) mostraron una disminución estadísticamente significativa en el reconocimiento de KMP11, PFR2 y HSP70 y persistencia o aumento en el nivel de anticuerpos frente a Tgp63. Sin embargo, los pacientes con manifestaciones cardíacas en fase avanzada (G3), no presentaron, en general, disminución del nivel de anticuerpos frente a dichas proteínas.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con benznidazol estaría influenciando, a corto plazo, el reconocimiento de antígenos específicos de *T. cruzi* dependiendo de la fase de la enfermedad, esto podría ser una consecuencia de una exposición particular y diferenciada de cada antígeno al sistema inmune o, alternativamente, a una modificación de la capacidad del sistema inmune de reconocer antígenos dependiendo de la fase de la enfermedad. El tratamiento con benznidazol podría reducir la carga parasitaria y así reducir la cantidad de antígeno

disponible para la activación de la respuesta antigénica (Laucella et al., 2009). Ya existen datos en ratones que indican que el tratamiento con benznidazol induce una disminución en el número de parásitos circulantes (Fernandez et al., 2009; Garcia et al., 2005)]. También es probable que anticuerpos generados frente los antígenos KMP11, HSP70 y PFR2 tengan una vida media corta y por tanto podrían ser influenciados por el tratamiento.

El análisis de la respuesta humoral detectada en pacientes de Chagas frente al péptido 3973 tratados con benznidazol, evidencia aumentos del nivel de anticuerpos post-tratamiento frente al mencionado péptido en pacientes en fase crónica indeterminada de la enfermedad (29,2%) y en pacientes en fase crónica con trastornos digestivos (36,8%), pero no en pacientes con síntomas cardíacos (7,2%), entre los que al contrario se observan disminuciones del nivel de anticuerpos en el 57.1% (Tabla D2).

Tabla D2. Resultados de la serología en pacientes de Chagas bajo tratamiento con benznidazol

Modificaciones del nivel de anticuerpos (1 año post-tratamiento)	∇ (%)	Δ (%)	Sin variaciones (%)
IND n=31	37,5	29,2	33,3
CCC n=32	57,1	7,2	35,7
DIG n=20	26,4	36,8	36,8

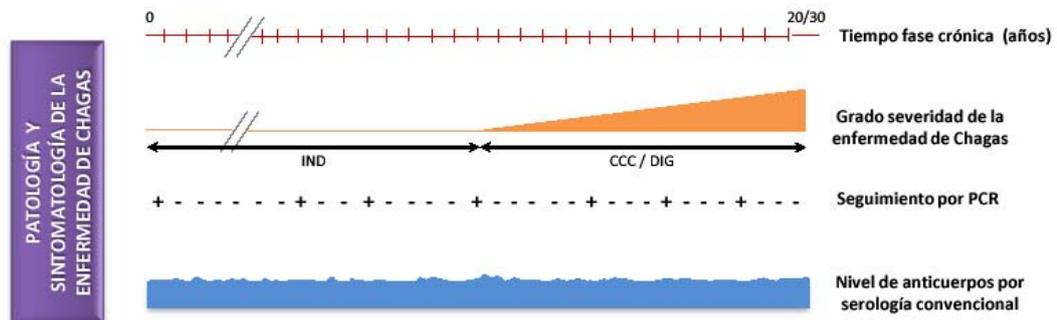
IND: Pacientes en fase crónica indeterminada, CCC: pacientes en fase crónica con manifestaciones cardíacas, DIG: pacientes en fase crónica con trastornos digestivos. ∇: disminución del nivel de anticuerpos (D.O. al año post-tratamiento<D.O. previo al tratamiento), Δ: aumento del nivel de anticuerpos (D.O. al año post-tratamiento>D.O. previo al tratamiento)

A la vista de los resultados, actualmente se continúa investigando si existe la posibilidad de que el reconocimiento a lo largo del tratamiento con benznidazol frente al péptido 3973 pudiera ser diferente dependiendo de la fase de la enfermedad, ya que los pacientes crónicos con manifestaciones cardíacas presentan una mayor disminución del nivel de anticuerpos que los pacientes crónicos indeterminados o con trastornos digestivos.

5.3 APLICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

La enfermedad de Chagas cursa por una fase aguda y posteriormente por una fase crónica donde el parásito se establece en la persona infectada de por vida. Esta fase crónica comienza con un estadio indeterminado donde no presenta ningún tipo de sintomatología aparente y puede o no alcanzar un estadio crónico con sintomatología cardíaca, digestiva o ambas (Rassi et al., 2010). A medida que transcurre el tiempo desde el momento de la infección por el parásito, el grado de severidad de la enfermedad puede aumentar en algunos casos (40% de los pacientes) Esquema D1.

Normalmente, los pacientes diagnosticados con la enfermedad de Chagas son evaluados con seguimiento por PCR y medida del nivel de anticuerpos totales del parásito, éste último se mantiene estable a lo largo del tiempo, resultando poco útiles para la evaluación de la enfermedad y del tratamiento en el caso de ser suministrado (Cancado, 2002).



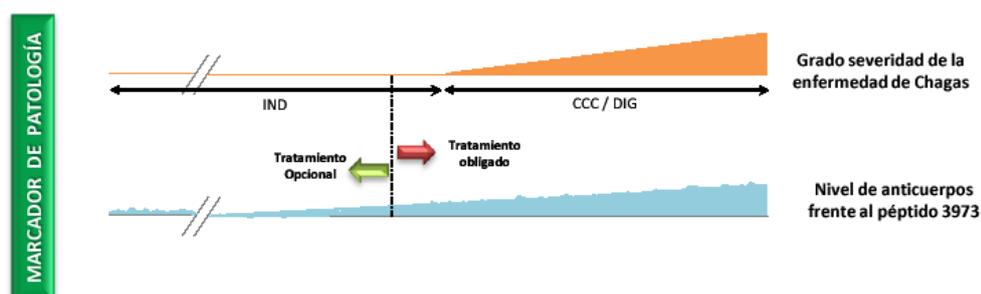
Esquema D1. Evolución de la patología y sintomatología de la enfermedad de Chagas y detección mediante serología y PCR.

El desarrollo de la enfermedad de Chagas entre la fase crónica asintomática y la fase crónica sintomática suele aparecer de manera gradual, donde en ocasiones pequeñas modificaciones son imperceptibles con pruebas clínicas.

El biomarcador desarrollado tiene la ventaja porque permite discernir entre fase crónica indeterminada y fase crónica con manifestaciones cardíacas o trastornos digestivos. Este hecho es de gran utilidad clínica ya que existe controversia de opiniones en cuanto si se debe tratar pacientes en fase crónica indeterminada o no. Así, mientras no se determine claramente la eficacia del tratamiento en fase crónica indeterminada, no necesariamente tendrían que tratarse estos pacientes,

con la excepción de que sean enfermos de Chagas en edad fértil, o con posibilidad o interés de embarazo.

Así, la implementación del biomarcador desarrollado consistiría en la medida del nivel de anticuerpos frente al péptido 3973 en pacientes en fase crónica indeterminada de periódica. La primera medida se establecería como valor de referencia y la evaluación de medidas posteriores proporcionaría información de la prognosis de la enfermedad. Por tanto, aumentos superiores al valor de referencia podrían ser asociados a evolución de la enfermedad a fase crónica sintomática y sería adecuado tratar a estos pacientes (Tratamiento obligatorio). Estabilidad del nivel de anticuerpos frente al biomarcador a lo largo del tiempo, podrían asociarse a que estos pacientes están en fase crónica indeterminada y que no existen indicios de que la enfermedad vaya evolucionar a fases crónicas (Tratamiento opcional) (Esquema D2).



Esquema D2. Evaluación del marcador de patología 3973

Por otra parte, el estudio de la evolución de la respuesta humoral específica frente a varios antígenos, analizada de forma individual y simultánea en sueros de enfermos de Chagas pre y post-tratamiento, permite la identificación de patrones singulares que pueden ser correlacionados con la fase y/o evolución de la enfermedad. El sistema de marcadores serológicos correspondientes a antígenos de *T. cruzi* (KMP11, HSP70, PFR2 y Tgp63) probablemente será una herramienta útil para el seguimiento de los enfermos de Chagas bajo tratamiento con benznidazol, ya que patrones anómalos de la respuesta de reconocimiento antigénica, podrían advertir un fallo terapéutico.

Así la implementación del sistema consistiría en la realización de pruebas serológicas frente a las proteínas KMP11, HSP70, PFR2 y Tgp63 previamente a la

administración del tratamiento como valor de referencia, y la evaluación regular de la respuesta serológica para evaluar, a través de las modificaciones de los niveles de anticuerpos de diferentes especificidades, la eficacia del tratamiento, teniendo para ello en cuenta el estadio de la enfermedad. Por tanto, aumentos superiores al valor de referencia podrían ser asociados a fallo terapéutico y se evaluaría la posibilidad de tratar de nuevo con un tratamiento alternativo. Disminuciones por debajo del valor de referencia podrían asociarse a un control del parásito por el sistema inmunitario y por tanto una buena evolución de la enfermedad debido al tratamiento administrado (Esquema D3).



Esquema D3. Comportamiento serológico del nivel de anticuerpos de pacientes de Chagas frente a los biomarcadores KMP11, HSP70, PFR2. Este comportamiento no se observa en pacientes crónicos cardíacos con cardiopatías avanzadas

5.4 CLINICAL CASE OF CONGENITAL TRANSMISSION OF CHAGAS DISEASE IN SPAIN: APLICACIÓN CLÍNICA DE LOS MARCADORES SEROLÓGICOS

Las vías de transmisión de la enfermedad de Chagas en zonas no endémicas son las vías por transfusión de sangre, trasplante de órganos y vía congénita. Hasta la fecha se han introducido protocolos de actuación en centros sanitarios y hospitales para controlar las vías por transfusión sanguínea y trasplante de órganos, sin embargo la vía congénita es impredecible, ya que aún no se conocen con claridad los mecanismos fisiológicos de la transmisión vía congénita (Shippey et al., 2005; WHO, 2002). Algunos autores sugieren que el parásito alcanza al feto a través de la placenta (Carlier, 2005; Nisida et al., 1999). Se piensa que la infección

vertical de la enfermedad de Chagas es una consecuencia de una interacción compleja entre la respuesta inmunitaria de la madre, factores de la placenta y características del parásito (Burgos et al., 2007; Carlier, 2005).

Se postula que durante la transmisión congénita, los tripomastigotes del torrente sanguíneo de la madre atraviesan la placenta. Estos tripomastigotes comienzan a infectar células que constituyen tejidos y membranas entre la madre y el feto. Una vez en el interior de las células se diferencian a amastigotes que proliferan y tras un número de ciclos de replicación los amastigotes se diferencian de nuevo a tripomastigotes, que pueden invadir a capilares fetales e incluso alcanzar al feto (Junqueira and Soares, 2002). La invasión de la placenta por tripomastigotes podría ocurrir después de la semana 20 de gestación debido a que a partir de ese momento la placenta sufre una serie de transformaciones fisiológicas y metabólicas que favorecen la invasión de patógenos (Desai et al., 2007; Rocha et al., 2004). Paralelamente a estas hipótesis existe también la posibilidad de que la transmisión ocurra en el momento del parto.

Durante el desarrollo de la tesis surgió un caso clínico de dos mellizos infectados vía congénita que permitió la aplicación con éxito de los marcadores serológicos descritos en la sección anterior (Discusión 5.2) para la evaluación del tratamiento con benznidazol en pacientes infectados vía vertical y además reveló diferencias de la actuación del sistema inmunológico innato independiente de la vía de transmisión.

El caso clínico se describe a continuación; mujer de 20 años llega a España procedente de Santa Cruz (Bolivia) hace 6 años. Tiene una hija sana de 3 años, durante el transcurso del embarazo había recibido supervisión médica, sin embargo no se le había realizado ningún test diagnóstico para la enfermedad de Chagas ni durante el embarazo ni en el momento del parto. Se vuelve a quedar embarazada y da a luz dos mellizos a las 33 semanas de gestación de manera natural. Ambos mellizos son hospitalizados durante 20 días debido a su bajo peso corporal al nacer. Este hecho es habitual en embarazos múltiples y no hubo ningún síntoma clínico típico de la enfermedad de Chagas.

Transcurridos 45 días desde el parto, el bebé I presenta serios trastornos cardíacos y digestivos y además se detecta una infección por citomegalovirus que fue tratada. A pesar de tratar la infección el neonato I presenta miocarditis con signos de fallo cardíaco.

Tras 2 meses desde la hospitalización y coincidiendo con un empeoramiento del sistema respiratorio se evidencia la existencia de un foramen oval mediante

ecocardiograma que posteriormente es cerrado mediante operación quirúrgica. Se define foramen oval como una abertura en la pared en el septo interauricular de la cavidad cardiaca que durante la vida intrauterina permite el paso de la sangre desde la aurícula derecha a la aurícula izquierda. A partir del momento del nacimiento se producen importantes transformaciones en el funcionamiento del sistema circulatorio. La placenta pierde su función y los pulmones se expanden para permitir la entrada en los mismos del aire atmosférico. Simultáneamente se produce el cierre conducto arterioso y del foramen oval que pierde su función unas horas después del nacimiento y se cierra totalmente a lo largo de varios meses. La persistencia del foramen oval en la vida adulta da lugar a una anomalía cardiaca que se conoce como comunicación interauricular (Delsing et al., 2007)

A los 5 meses de hospitalización, debido a la existencia de miocarditis y miocardiopatía dilatada, se realizan pruebas diagnósticas de la enfermedad de Chagas a través de métodos serológicos, parasitológicos y moleculares.

De acuerdo con las directrices desarrolladas por la organización Mundial de la Salud (OMS) se considera que un individuo está infectado si al menos dos test serológicos son positivos. Se realizaron inmunofluorescencia indirecta y serología frente a proteínas totales del parásito resultando ambas pruebas positivas para el bebé I. Paralelamente, se detectó la presencia del parásito mediante PCR y se aisló *T. cruzi* en hemocultivo realizado con sangre total del bebé I. Ante esta situación, se procedió a realizar las pruebas de diagnóstico tanto a la madre como al bebé II, como a la hija que había nacido en su primer embarazo. Tanto la madre como el bebé II resultaron ser positivos para la enfermedad de Chagas, confirmando la transmisión de la enfermedad vía congénita. Sin embargo, la hija del primer embarazo fue negativa para las pruebas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. A pesar de que el bebé II estaba infectado con *T. cruzi* no presentaba síntomas clínicos severos como consecuencia de la enfermedad, sin embargo cuando fue diagnosticado positivamente, en una exploración más detallada se le detectó una esplenomegalia. Tanto los mellizos (10mg/Kg por peso y día) como la madre (100mg tres veces al día) fueron tratados con benznidazol durante 60 días.

La presentación de la enfermedad con sintomatología clínica tan diferente en los mellizos, propició al estudio de la cepa infectiva. Ya ha sido publicada la distinta virulencia observada en las distintas cepas (Filardi and Brener, 1987) El análisis de la cepa resultó ser de tipo V para ambos mellizos, lo cual está de acuerdo con los estudios descritos anteriormente que indican que la cepa de tipo V predomina en

Bolivia y Argentina (Burgos et al., 2007) (Corrales et al., 2009) y que además la transmisión congénita de los neonatos presentan la misma cepa que poseen sus antecesoras (Burgos et al., 2007; Virreira et al., 2003). Hasta la fecha, no existe una asociación directa entre una cepa específica y la transmisión vertical.

A continuación, estudiamos el comportamiento del sistema inmunitario innato en los mellizos infectados con *T. cruzi*, para evaluar la respuesta primaria desencadenada tras la invasión de *T. cruzi* a través de la misma vía (congénita) aún presentando sintomatología clínica muy diferente.

Bebé II no presentaba síntomas severos sin embargo el estudio de la respuesta innata mostró la liberación de dos citoquinas proinflamatorias (IL1 β , TNF- α) vía TLR2 and TLR4. Sin embargo, el bebé I el cual presentaba alteraciones cardiacas y digestivas liberaba la citoquina antiinflamatoria IL10 y la citoquina proinflamatoria IFN- α vía dependiente de MyD88 TLR4 y TLR9.

El perfil de citoquinas observado en el paciente asintomático es la liberación de citoquinas pro inflamatorias según la vía dependiente de MyD88, corresponde a una respuesta que podría asemejarse a los donantes sanos, este hecho podría sugerir que el sistema inmunitario innato es inmunocompetente. Sin embargo el bebé I además de liberar la citoquina IL10, secreta la citoquina IFN- α . Los interferones de tipo I como IFN- α han sido descritos como una citoquina proinflamatoria desencadenada frente a ADN de patógenos (Trinchieri and Sher, 2007). Este hecho unido a que el bebé libera citoquinas antiinflamatorias, sugiere que el sistema inmunitario innato en este caso está inmunodeprimido.

La infección por *T. cruzi* no está relacionada con la competencia del sistema inmunológico innato del bebé, sin embargo la sintomatología sí que está relacionada con la competencia del sistema inmunitario innato.

Además, se observó que ambos mellizos (M+B+) liberaban la citoquina proinflamatoria IL6 en mayores cantidades que los bebés sanos de madres infectadas (M+B-). De acuerdo con esto, se ha descrito un trabajo realizado en bebés sanos de madres infectadas (M+B-) y no infectadas (M-B-). Los autores observan que los bebés sanos de madres infectadas (M+B-) secretan mayores cantidades de dicha citoquina, además nosotros hemos observado que incluso bebés infectado de madres infectadas (M+B+) producen más IL6 que los bebés sanos de madres infectadas (M+B-). IL6 juega un papel importante en el sistema inmunitario innato debido a que los bebés infectados de madres infectadas presentan mayores niveles de IL6 y que la liberación de esta citoquina está relacionada con la infección (Vekemans et al., 2000). Se sugiere que el origen de

la producción de citoquinas proinflamatorias está asociado a la activación de los monocitos y que los bebés infectados de madres infectadas presentaban monocitos hiperactivados, como respuesta a la infección por *T. cruzi*. Se podría hipotetizar que los bebés se protegen de la transmisión vertical del parásito mediante una sinergia entre anticuerpos de la madre y activación de monocitos descritos previamente por ser destructores de parásitos *in vivo* e *in vitro* (Plata et al., 1984),(Rivera et al., 1995),(Umekita and Mota, 2000).

La infección por *T. cruzi* de la madre induce la activación de los linfocitos T del feto en el útero. Los linfocitos de los neonatos no infectados, nacidos de madre con enfermedad de Chagas produjeron factores pro-inflamatorios (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y anti-inflamatorios (IL-10 y TNF-receptor) en presencia de antígeno del parásito. Esta modulación materna de la inmunidad innata podría tener efectos protectores, limitando la infección transplacentaria (Vekemans et al., 2000).

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en los neonatos de madres infectadas tiene un valor poco fiable, porque la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* en el neonato pueden ser debido a la transferencia pasiva de anticuerpos IgG maternos, que en el niño no infectado normalmente desaparecen alrededor del octavo mes de edad (Chippaux et al., 2010). Por tanto, es necesario el seguimiento mediante técnicas serológicas como el ELISA, moleculares como la PCR y observación directa en el microscopio (Chippaux et al., 2010; Freilij and Altcheh, 1995; Schijman et al., 2003).

Se ha descrito que en la fase aguda de la infección, los anticuerpos específicos disminuyen desde 2 meses post tratamiento y son indetectables en el 90% de los pacientes a los 5 meses post-tratamiento.(Cerisola et al., 1970). Se ha observado una disminución temprana del nivel de anticuerpos tras el tratamiento con benznidazol. Estudios realizados acerca de la forma de administrar el tratamiento con benznidazol en neonatos, bien 5mg/Kg al día durante 60 días o bien, 7,5mg/Kg al día durante 30 días. La disminución de los anticuerpos frente a *T. cruzi* fue independiente de la forma de administración (Chippaux et al., 2010). Recientemente, ha sido publicado un estudio con una población de niños hasta 7 años, donde se analizaron los efectos secundarios en pacientes tratados con benznidazol. Los resultados indican que los niños tratados presentaban efectos secundarios leves que no produjeron la interrupción del tratamiento y mostraron trastornos menores a los presentados en adultos. (Altecheh J, www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2010-1172)

Por otra parte, la técnica de PCR ha sido desarrollada para detectar la infección de *T. cruzi* en neonatos infectados y evaluar el tratamiento con benznidazol. Se ha demostrado que la sensibilidad de la PCR es del 100% en niños infectados menores de 6 meses (Schijman et al., 2003). Otros autores han descrito la PCR como una buena herramienta para la evaluación del tratamiento con benznidazol, donde observaron que el 100% de los pacientes de 2-19 años negativizaron la técnica de PCR a los 90 días post-tratamiento (Murcia et al., 2010)

Tras el inicio del tratamiento con benznidazol se realizaron seguimientos serológicos frente a las proteínas recombinantes KMP11, HSP70, PFR2 y Tgp63 y moleculares mediante PCR mensualmente. El estudio de la respuesta humoral en el bebé I muestra que los niveles de anticuerpos al inicio del tratamiento eran altos para todas las proteínas. Se observa una disminución del nivel de anticuerpos al mes de la finalización del tratamiento frente a las proteínas totales y frente a todas las proteínas recombinantes (KMP11, HSP70 y Tgp63) y STcA con la excepción de la proteína PFR2. Los niveles de anticuerpos frente a la proteínas paraflagelar PFR2 se mantuvieron estables a lo largo de este estudio estudio. Por otra parte, los resultados de los estudios moleculares muestran que previamente al inicio del tratamiento la PCR fue positiva tanto la realizada por el método de extracción en sangre total como la realizada mediante hematocrito. Sin embargo este resultado negativizó al mes del inicio del tratamiento. El análisis de estos resultados indica que en el bebé I, el tratamiento con benznidazol estaba siendo efectivo. El hecho de que los niveles de anticuerpos frente a la proteína PFR2 se mantuvieran a lo largo del tiempo, cuando frente a los otros antígenos no se observaba este comportamiento, nos hizo revisar la historia clínica y considerar la estructura molecular de la proteína. Al revisar la historia clínica consideramos que cabría la posibilidad que la infección vírica por citomegalovirus podría producir reacciones cruzadas con la proteína PFR2 ya que dicha proteína contenía un promotor con características víricas. Por tanto, se realizaron ensayos de serología frente a la proteína PFR2 en pacientes con citomegalovirus y negativos para Chagas. Los resultados muestran que la proteína PFR2 reconoce al 50% de los pacientes ensayados. Este resultado explicaría la estabilidad del nivel de anticuerpos frente a la proteína PFR2 para el bebé I. Los niveles de anticuerpos frente a las proteínas KMP11, HSP70, Tgp63 y STcA alcanzaron niveles por debajo del punto de corte a los 5 meses post-tratamiento.

El estudio de la respuesta humoral en el bebé II muestra que los niveles de anticuerpos al inicio del tratamiento eran altos para todas las proteínas utilizadas

como antígenos. Sin embargo, al mes tras la finalización del tratamiento el nivel de anticuerpos frente a la proteína HSP70 se mantenía alto y en los demás antígenos la caída del nivel de anticuerpos era más lenta que la presentada en el bebé I. Posteriormente a la finalización del tratamiento con benznidazol, se observó que la PCR fue positiva. A la vista de estos resultados se entrevistó a la familia para conocer si había existido algún problema durante la administración del tratamiento, y familiares del bebé aseguraban que la dosis que había recibido el bebé II era inferior a la que se había recomendado (1/3 de la administrada). A partir de este momento, se volvió a suministrar el tratamiento y se continuaron haciendo seguimiento por los métodos serológicos y moleculares. Un mes más tarde de la administración del segundo tratamiento con benznidazol, el nivel de anticuerpos frente a todas las proteínas había disminuido a niveles cercanos al punto de corte, alcanzando valores inferiores para las proteínas KMP11 y PFR2 a los 3 meses tras la finalización de la administración del segundo tratamiento. Los métodos moleculares mostraron resultados negativos hasta la finalización del estudio.

Finalmente, se puede concluir tras el análisis de los resultados que ambos bebés están infectados con la misma cepa del parásito (DTU-V). La infección por *T. cruzi* no está relacionada con la competencia del sistema inmunológico (respuesta innata) del bebé, sin embargo la sintomatología sí está relacionada con la competencia del sistema inmunitario innato. El sistema de biomarcadores multi-antígeno desarrollado en el laboratorio (Discusión 5,2) es eficaz para analizar la eficacia del tratamiento en neonatos infectados. Existen reacciones cruzadas entre anticuerpos anti citomegalovirus y la proteína recombinante LIC-PFR2.

6. CONCLUSIONES

6.CONCLUSIONES

1. Se ha identificado una molécula peptídica de 12 mer (denominada 3973) la cual es reconocida con alta sensibilidad (>90%) por sueros de pacientes de Chagas en fase crónica de la enfermedad y no por sueros de pacientes en fase aguda.
2. El péptido 3973 es reconocido con alta especificidad (>98%) por sueros de pacientes de Chagas en fase crónica de la enfermedad y no por sueros de pacientes con procesos autoinmunes e inflamatorios, ni por pacientes con cardiomiopatía no chagásica.
3. El nivel de anticuerpos frente al péptido 3973 presente en sueros de pacientes de Chagas en fase crónica sintomática, con alteraciones cardíacas y/o digestivas, es estadísticamente superior al presente en pacientes de Chagas en fase indeterminada. Ello sugiere que la técnica de diagnóstico descrita en la presente tesis, sobre la base de la utilización del péptido 3973 como antígeno, puede ser una herramienta útil para determinar el grado de patología de la enfermedad de Chagas.
4. Los amino ácidos F, Q en posición 1 y 3, así como el triplete DKP en posición 8 a 10 son esenciales en la conformación del epítipo antigénico inmunodominante.
5. Se identificaron cuatro proteínas recombinantes, correspondientes a los antígenos de tripanosomátidos KMP11, HSP70, PFR2 y Tgp63, reconocidas de forma estadísticamente significativa por sueros de pacientes de Chagas independientemente del estado clínico de la enfermedad.

6. A tiempos cortos, (6 a 9 meses) tras el tratamiento con benznidazol, los sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas en su estadio crónico, presentan una disminución en el nivel de anticuerpos frente a las proteínas recombinantes KMP11, HSP70 y PFR2. Esta caída en la reactividad no es observada frente a proteínas solubles de *T. cruzi* ni frente a otras proteínas recombinantes usadas en ensayos de diagnóstico serológico convencional.
7. La caída en la reactividad frente a las mencionadas proteínas recombinantes KMP11, HSP70 y PFR2 es mayoritariamente detectada en pacientes en fase indeterminada o en aquellos en estadios tempranos de cardiomiopatía chagásica (G1/G2). Esta disminución en la reactividad se mantiene o se incrementa (67%, 50% y 34% de los pacientes para KMP11, HSP70 y PFR2, respectivamente) durante el periodo post-tratamiento analizado (dos años).
8. La determinación de la reactividad de sueros de pacientes de Chagas frente a las proteínas recombinantes (KMP11, HSP70 y PFR2) muestra ser un sistema marcador serológico útil para monitorizar la efectividad del tratamiento en pacientes de Chagas.
9. La competencia en la capacidad de respuesta inmune innata no protege de la infección por *T. cruzi* por vía congénita, pero probablemente sí la controle, lo que se traduce en una significativa menor sintomatología.
10. El sistema de biomarcadores multi-antígeno, basado en la determinación de forma simultánea e individualizada del nivel de anticuerpos existente frente a las proteínas recombinantes KMP11, HSP70, PFR2 y TgP63 resulta ser una herramienta útil para la detección temprana del fallo terapéutico, al menos, en bebés infectados por transmisión congénita.

11. La competencia inmunológica a nivel de respuesta inmune innata no controla per se la infección por *T. cruzi*, por tanto en fases iniciales de la infección es crítico tratar al paciente.

7. ANEXOS

7.1 TITLE: CLINICAL CASE OF CONGENITAL TRANSMISSION OF CHAGAS DISEASE IN SPAIN

Ana Fernández-Villegas^a, M. Carmen Thomas^a, Concepción Marañón^a, Manuel Carlos López^{a,*}

^aInstituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Avda. del Conocimiento S/N. Armilla, 18100-Granada, Spain

*Correspondent footnote: M.C. López, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Granada, Spain. Tel: +34 958 181 661. Fax: +34 958 181 632. E-mail: mclopez@ipb.csic.es

INTRODUCTION

Chagas disease is a parasitosis produced by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and a chronic sickness endemic in 21 countries of Latin America that affects millions of people. Vectorial transmission is the main cause of infection in endemic areas where also oral transmission through ingestion of parasite-contaminated food and drinks has shown to be an important route of *T. cruzi* infection in humans which does not alter the ability of *T. cruzi* to establish infection (Alarcón de Noya et al., 2010. J Infect Dis. 201(9):1308-151; Collins et al 2011. Infect Immun 79(8):3397-406). Outside endemic countries where vectorial transmission is not possible, the infection occurs firstly by transplacental route as tests of blood donors for *T. cruzi* infection has been implemented to prevent transmission by blood transfusion and transplantation.

The transmission rate of congenital Chagas disease varies from 0.1% to 17% or more in different endemic regions (Torrice et al., 2004) (Brutus et al., 2007; Schijman, 2006; Sosa-Estani et al., 2009). In non endemic countries the vertical transmission rate is underestimated due to there is not implemented a routine screening of Latin American pregnant women and most of congenital infected neonates are asymptomatic. Therefore, to our knowledge, only ten cases of congenital transmission have been reported in non-endemic countries. Thus, one

asymptomatic case was diagnosed in Sweden, two asymptomatic cases reported in Switzerland and seven cases in Spain from which only two babies were symptomatic (Carrilero et al., 2009; Flores-Chavez et al., 2008a; Jackson et al., 2009b; Munoz et al., 2009; Munoz et al., 2007; Pehrson et al., 1981; Riera et al., 2006)

It has been shown that maternal-fetal transmission of *T. cruzi* depends on parasitic factors, such as parasitic load (Castro et al., 2005) and the *T. cruzi* infecting strain, and also on maternal factors, such as the immune response and phase of the disease. Phylogenetic differences might have relevant consequences on parasite virulence and pathology. (Macedo and Sagetto, 2010) Genotypes Tc I, Tc II, Tc V y Tc VI have been identified in congenital Chagas disease. (Burgos et al., 2007; Corrales et al., 2009; Falla et al., 2009) The Tc V genotype is predominant in Bolivia and Argentina (Burgos et al., 2007; Corrales et al., 2009). However, to date, there is not a clear evidence of a direct relationship between *T. cruzi* genotype and congenital infection (Oliveira et al.) Little is known about neonate innate immunity. It has been described a potent state of cell activation induced in uninfected neonates from *T. cruzi* chronically infected mothers, leading to the simultaneous production of pro and anti inflammatory factors in the presence of parasite' lysates. (Vekemans et al., 2000). Also, congenitally *T. cruzi* infected newborns display an early ability to produce the type I IFN- γ cytokine (Dauby et al., 2009). Early diagnosis of congenital infection results essential because of there is solid evidences of a high cure rate related to treatment administration. Conventional serological techniques for Chagas disease diagnosis in newborns do not result as efficient as they are for adults in providing early diagnosis, due to the detected anti-*T. cruzi* IgG antibodies may come from the mother by passive transfer (Blanco et al., 2000; Freilij and Altcheh, 1995; Moya et al., 1989). In infants owever, and in order to exclude a previously undetected infection the serological tests are recommended at 6-12 months after birth since over 9 months of age the maternal antibodies are absent (Chippaux et al., 2009) (Russomando et al.). Therefore, the diagnosis of congenital infections is based on the microscopic observation of bloodstream trypomastigotes, using the microhematocrit or the Strout concentration methods. Recently more sensitive molecular tools such the Polymerase Chain Reaction (PCR) have been developed to detect *T. cruzi* infection and evaluate treatment outcome (Schijman et al., 2003)

In the present manuscript, a clinical case of twin brothers who were born from a Chagas disease infected mother by bi-amniotic bichorionic delivery is studied. A successful early diagnosis of the infection and a prompt treatment

administration allowed the disease cure. Follow up along and after treatment by specific serological tests, PCR and study of innate immune of both twins allowed us to detect an interruption of treatment administration in one of the infants and to correct it for complete cure of the patient. Differences in response was observed and co-related to their cure. The type of infected strains, the innate immunological and a follow-up by PCR and serological methods employing specific recombinant proteins from *T. cruzi* has been explored.

RESULTS

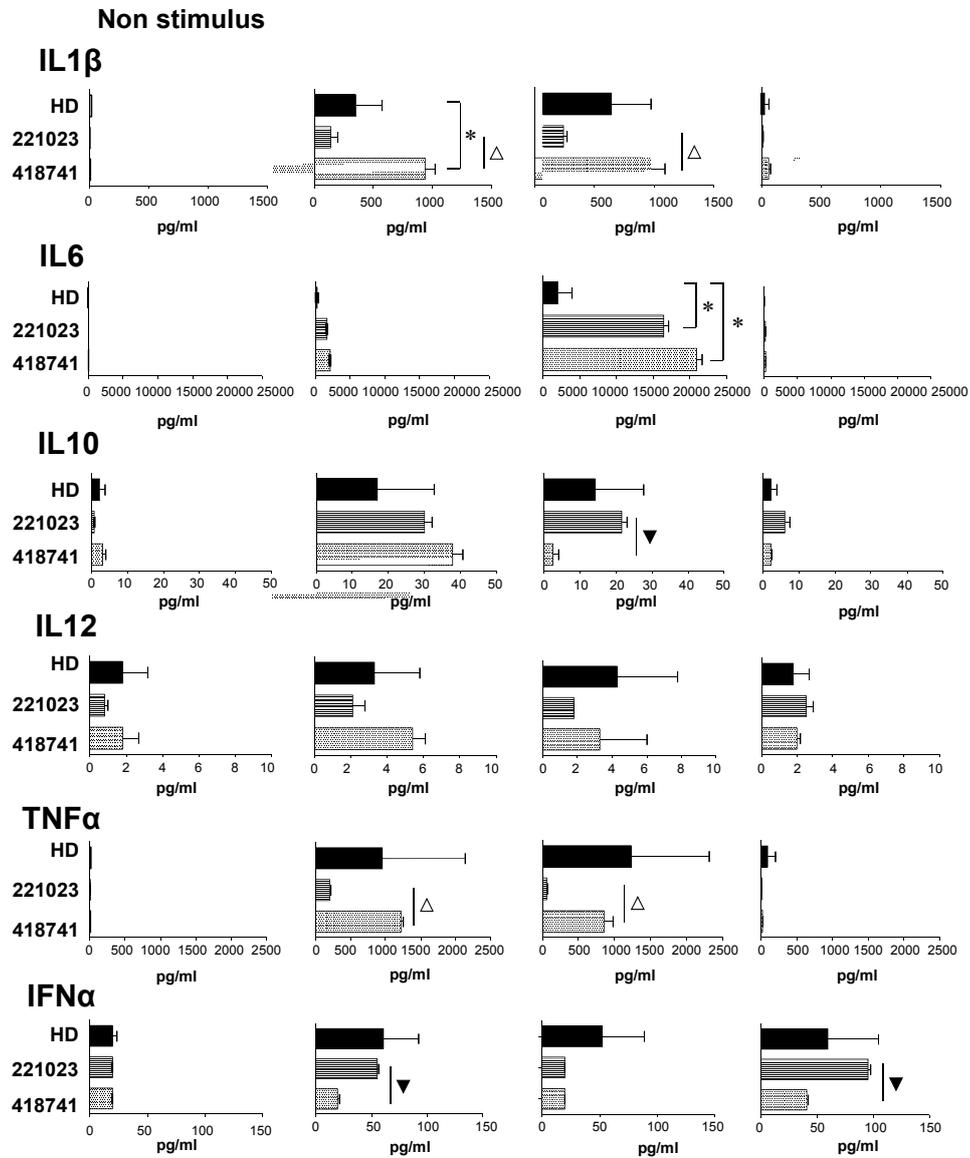


Figure 1: Measurement of pro and anti inflammatory cytokines.

Production of cytokines from infants *Trypanosoma cruzi* infected brother I, brother II and 10 uninfected infants were estimated or not for 24 hour with LPS (10ng/ml), CpG (10 μ g/ml) or Pam (25 μ g/ml) and measure by multiplex. Data are expressed as pg/ml. Bars represent mean \pm SD.

Statistical comparisons between infected and uninfected infants are indicated by (*) and statistical comparisons between infected infants are indicated (Δ \blacktriangledown).

Higher expression of cytokines from patient brother I than brother II patient (\blacktriangledown) and higher expression of cytokines from brother II than brother I (Δ).

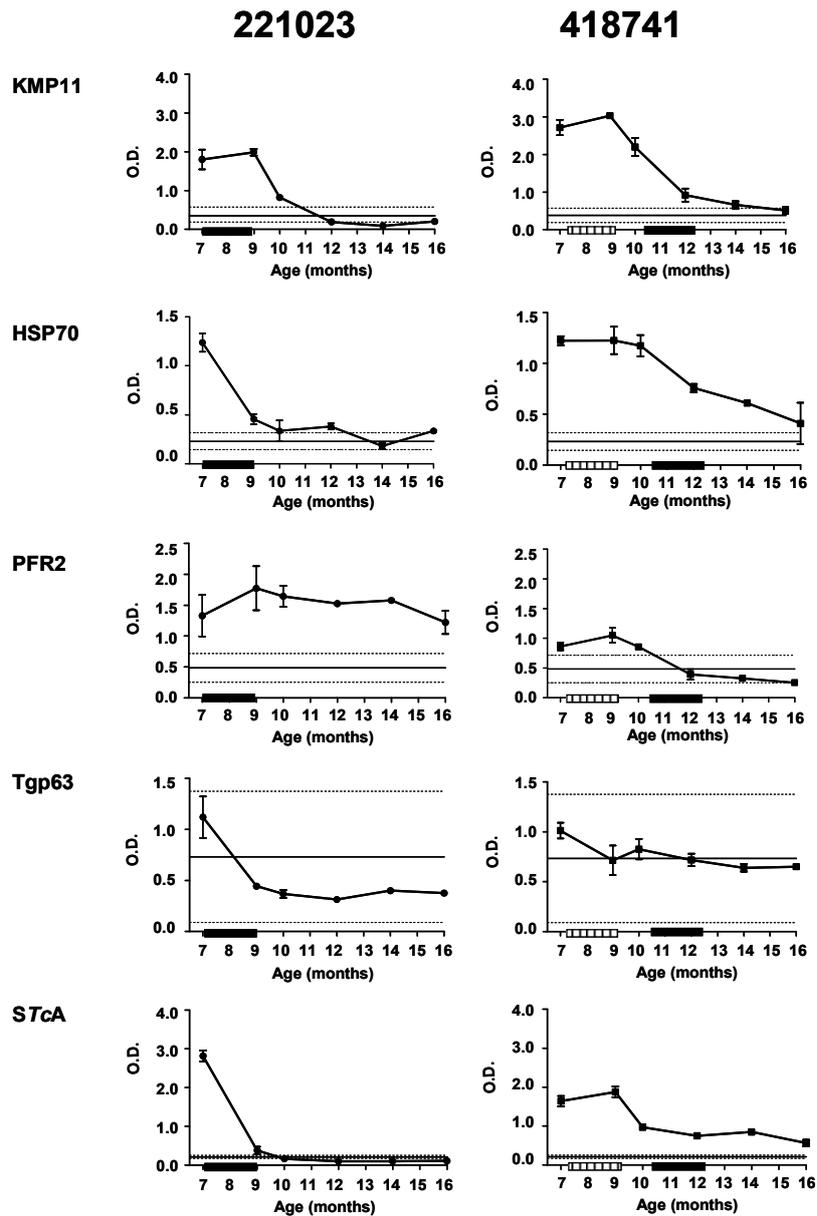


Figure 2: Treatment follow-up by ELISA

The reactivities of sera infant Chagas' disease patients were measurement at 7,9,10,12,14 and 16 months of life by ELISA against KMP11, HSP70, PFR2 and STcA. Data are expressed as optical density value (O.D.) and represents mean±SD. Correct administration of treatment with benznidazole **■** are indicated and incorrect **□**.

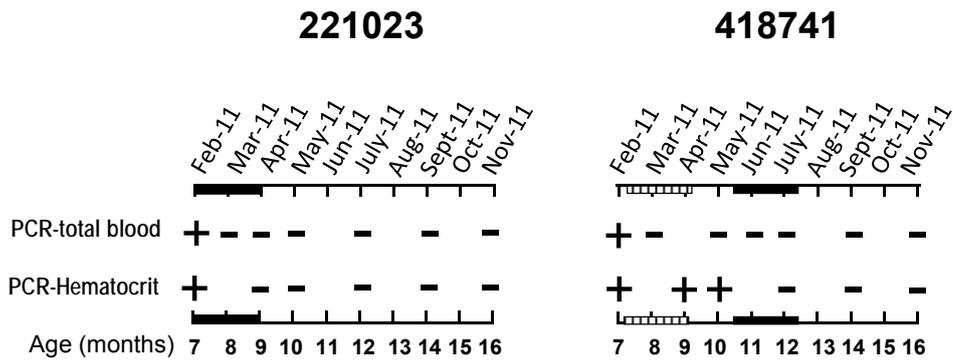


Figure 3: Treatment follow-up by PCR

PCR were measurement by brother I at 7,8,9,10,11,12 and 14 months of life and at 7,8,10,11,12,14 and 16 months of life by brother II. PCR was measure on total blood and by hematocrit. Correct administration of treatment with benznidazole **■** are indicated and incorrect **□**.

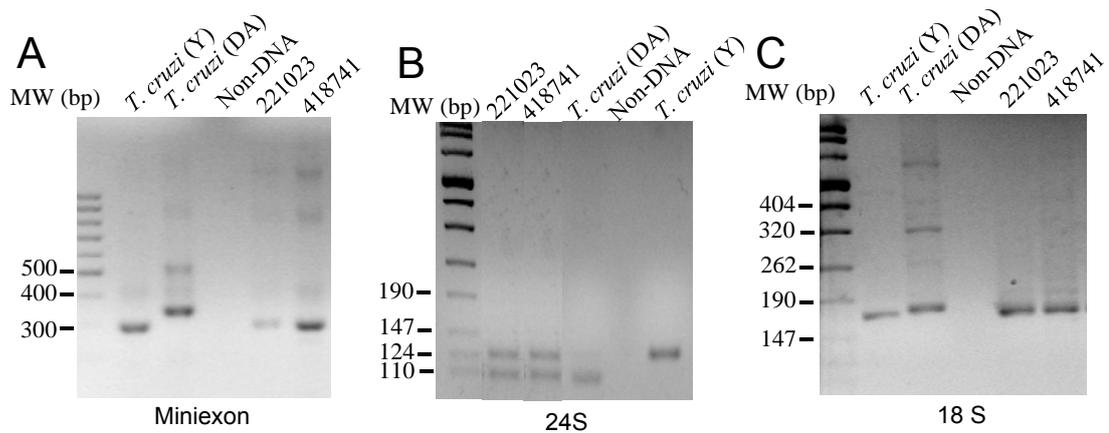


Figure 4: PCR amplification products obtained after analysis of the non-transcribed spacer of the mini-exon genes (panel A), the D7 divergent domain of the 24S α rRNA (panel B), and the size-variable domain of the 18S rRNA sequence (panel C). MW (bp) lane indicates the DNA molecular weight marker. Lanes 221023 and 418741 correspond to the amplification bands when parasites isolated from newborns congenitally infected with *T. cruzi* were analyzed. The PCR amplification products from *T. cruzi* DNA Brazilian Y and DA strains were employed as positive controls for DNA amplification.

REFERENCES

- Abramowicz, M. (2004). "The Medical Letter On Drugs and Therapeutics."
- Blanco, S. B., E. L. Segura, et al. (2000). "Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina." Trop Med Int Health **5**(4): 293-301.
- Brisse, S., J. C. Dujardin, et al. (2000). "Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers." Mol Biochem Parasitol **111**(1): 95-105.
- Brutus, L., H. Castillo, et al. (2010). "Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital Chagas disease." Am J Trop Med Hyg **83**(5): 1044-7.
- Brutus, L., D. Schneider, et al. (2007). "Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia." Trans R Soc Trop Med Hyg **101**(11): 1159-60.
- Burgos, J. M., J. Altcheh, et al. (2007). "Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease." Int J Parasitol **37**(12): 1319-27.
- Carrilero, B., J. J. Quesada, et al. (2009). "[Congenital Chagas disease in a newborn of a Bolivian mother]." Enferm Infecc Microbiol Clin **27**(8): 486-7.
- Castro, C., A. Prata, et al. (2005). "[The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas' disease]." Rev Soc Bras Med Trop **38**(1): 1-6.
- Cerisola, J. A., M. Alvarez, et al. (1970). "[Immunological diagnosis of Chagas' disease. Serological development of patients with Chagas' disease]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **12**(6): 403-11.
- Corrales, R. M., M. C. Mora, et al. (2009). "Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina." Infect Genet Evol **9**(2): 278-82.
- Chippaux, J. P., A. N. Clavijo, et al. (2009). "Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole." Trop Med Int Health **15**(1): 87-93.
- Dauby, N., C. Alonso-Vega, et al. (2009). "Maternal infection with *Trypanosoma cruzi* and congenital Chagas disease induce a trend to a type 1 polarization of infant immune responses to vaccines." PLoS Negl Trop Dis **3**(12): e571.

- Falla, A., C. Herrera, et al. (2009). "Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans." Acta Trop **110**(1): 15-21.
- Feilij, H., L. Muller, et al. (1983). "Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease." J Clin Microbiol **18**(2): 327-30.
- Fernandez-Villegas, A., M. J. Pinazo, et al. (2011). "Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers." BMC Infect Dis **11**: 206.
- Flores-Chavez, M., Y. Faez, et al. (2008). "Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report." Cases J **1**(1): 302.
- Freilij, H. and J. Altcheh (1995). "Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects." Clin Infect Dis **21**(3): 551-5.
- Hermann, E., C. Truyens, et al. (2004). "Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens." J Infect Dis **189**(7): 1274-81.
- Jackson, Y., C. Myers, et al. (2009). "Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland." Emerg Infect Dis **15**(4): 601-3.
- Kun, H., A. Moore, et al. (2009). "Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation." Clin Infect Dis **48**(11): 1534-40.
- Macedo, A. and M. Saggio (2010). "Implications of *Trypanosoma cruzi* intraspecific diversity in the pathogenesis of Chagas disease " Elsevier, London, UK/Burlington, MA, USA American Trypanosomiasis-Chagas Disease: 489-522.
- Maranon, C., L. Planelles, et al. (2000). "HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis." Int Immunol **12**(12): 1685-93.
- Mora, M. C., O. Sanchez Negrette, et al. (2005). "Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology." J Parasitol **91**(6): 1468-73.
- Morell, M., M. C. Thomas, et al. (2006). "The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection." Vaccine **24**(49-50): 7046-55.
- Moya, P., E. Moretti, et al. (1989). "[Neonatal Chagas disease: laboratory diagnosis during the first year of life]." Medicina (B Aires) **49**(6): 595-9.
- Mullen G and M. RG (2009). Medical and Veterinary Entomology **Lance Durden 2009**.

- Munoz, J., J. Gomez i Prat, et al. (2009). "Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain)." Acta Trop **111**(1): 51-5.
- Munoz, J., M. Portus, et al. (2007). "Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area." Trans R Soc Trop Med Hyg **101**(11): 1161-2.
- Murcia, L., B. Carrilero, et al. (2010). "Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country." J Antimicrob Chemother **65**(8): 1759-64.
- Ogilvie, C. and C. Evans (1987). "Chamberlaine's symptoms and signs in clinical medicine."
- Oliveira, I., F. Torrico, et al. "Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach." Expert Rev Anti Infect Ther **8**(8): 945-56.
- Pehrson, P. O., M. Wahlgren, et al. (1981). "Asymptomatic congenital Chagas' disease in a 5-year-old child." Scand J Infect Dis **13**(4): 307-8.
- Riera, C., A. Guarro, et al. (2006). "Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report." Am J Trop Med Hyg **75**(6): 1078-81.
- Russomando, G., Z. Sanchez, et al. "Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease." Expert Rev Mol Diagn **10**(6): 705-7.
- Schijman, A. (2006).
- Schijman, A. G., J. Altchek, et al. (2003). "Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction." J Antimicrob Chemother **52**(3): 441-9.
- Schmunis, G. A. and Z. E. Yadon "Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem." Acta Trop **115**(1-2): 14-21.
- Sosa-Estani, S., L. Dri, et al. (2009). "[Vectorial and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Las Lomitas, Formosa]." Medicina (B Aires) **69**(4): 424-30.
- Thomas, M. C., J. L. Garcia-Perez, et al. (2000). "Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level." DNA Cell Biol **19**(1): 47-57.
- Torrico, F., C. Alonso-Vega, et al. (2004). "Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia." Am J Trop Med Hyg **70**(2): 201-9.

- Vekemans, J., C. Truyens, et al. (2000). "Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells To produce pro- and anti-inflammatory cytokines." Infect Immun **68**(9): 5430-4.
- Viotti, R., C. Vigliano, et al. (2011). "Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease." PLoS Negl Trop Dis **5**(9): e1314.
- Virreira, M., C. Alonso-Vega, et al. (2006). "Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*." Am J Trop Med Hyg **75**(5): 871-9.
- Virreira, M., F. Torrico, et al. (2003). "Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection." Am J Trop Med Hyg **68**(5): 574-82.
- Virreira, M., C. Truyens, et al. (2007). "Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns." Am J Trop Med Hyg **77**(1): 102-6.
- Young, C., P. Losikoff, et al. (2007). "Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection." Transfusion **47**(3): 540-4.
- Zaidenberg, M. and A. Segovia (1993). "[Congenital Chagas disease in the city of Salta, Argentina]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **35**(1): 35-43.

7.2 PATENTES DESARROLLADAS EN DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

- Inventores (p.o. de firma): MC Thomas, MC López, C. Marañón, **A Fernández**, M Segovia
Título: **Método de Diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas**
N. de solicitud: P201031097 País de prioridad: España

Entidad titular: CSIC (80%)
N. de Solicitud Internacional: PCT/ES2011/070501

- Inventores (p.o. de firma): MC López, MC Thomas, C. Marañón, **A Fernández**, M Segovia
Título: **Métodos de Obtención de Datos útiles para el Diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Chagas, y para evaluar la respuesta al tratamiento.**
N. de solicitud: P200930302 País de prioridad: España

Entidad titular: CSIC (80%)
N. de Solicitud Internacional: PCT/ES2010/070376

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abel L. C., Iwai L. K., Viviani W., Bilate A. M., Fae K. C., Ferreira R. C., Goldberg A. C., Juliano L., Juliano M. A., Ianni B., Mady C., Gruber A., Hammer J., Sinigaglia F., Kalil J. and Cunha-Neto E. (2005) T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes Infect* 7, 1184-95.
- Abrahamsohn I. A. (1998) Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res* 31, 117-21.
- Acosta-Rodriguez E. V., Montes C. L., Motran C. C., Zuniga E. I., Liu F. T., Rabinovich G. A. and Gruppi A. (2004) Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 172, 493-502.
- Albareda M. C., Laucella S. A., Alvarez M. G., Armenti A. H., Bertochi G., Tarleton R. L. and Postan M. (2006) *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 18, 465-71.
- Albareda M. C., Olivera G. C., Laucella S. A., Alvarez M. G., Fernandez E. R., Lococo B., Viotti R., Tarleton R. L. and Postan M. (2009) Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4⁺ T cells to immune senescence. *J Immunol* 183, 4103-8.
- Almeida E., Krieger M. A., Carvalho M. R., Oelemann W. and Goldenberg S. (1990) Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85, 513-7.
- Almeida I. C., Camargo M. M., Procopio D. O., Silva L. S., Mehlert A., Travassos L. R., Gazzinelli R. T. and Ferguson M. A. (2000) Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *Embo J* 19, 1476-85.
- Altclas J., Sinagra A., Jaimovich G., Salgueira C., Luna C., Requejo A., Milovic V., De Rissio A., Feldman L. and Riarte A. (1999) Reactivation of chronic Chagas' disease following allogeneic bone marrow transplantation and successful pre-emptive therapy with benznidazole. *Transpl Infect Dis* 1, 135-7.
- Alves M., Abuin M., Goncalves M., Kuwajima V. and Colli W. (1987) Molecular strategies of parasitic invasion. 42, 323-332.
- Andrews N. W. and Colli W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J Protozool* 29, 264-9.
- Araujo C. A., Waniek P. J., Xavier S. C. and Jansen A. M. (2010) Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Exp Parasitol* 127, 308-12.
- Araujo F. G. (1989) Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes. *Infect Immun* 57, 2246-8.
- Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J. A., Bare O., Auron P. E., Stevenson M. A. and Calderwood S. K. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277, 15028-34.
- Bafica A., Santiago H. C., Goldszmid R., Ropert C., Gazzinelli R. T. and Sher A. (2006) Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 177, 3515-9.

- Barcan L., Luna C., Clara L., Sinagra A., Valledor A., De Rissio A. M., Gadano A., Garcia M. M., de Santibanes E. and Riarte A. (2005) Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transpl* 11, 1112-6.
- Barretto A. C. and Ianni B. M. (1995) The undetermined form of Chagas' heart disease: concept and forensic implications. *Sao Paulo Med J* 113, 797-801.
- Bartholomeu D. C., Ropert C., Melo M. B., Parroche P., Junqueira C. F., Teixeira S. M., Sirois C., Kasperkovitz P., Knetter C. F., Lien E., Latz E., Golenbock D. T. and Gazzinelli R. T. (2008) Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 181, 1333-44.
- Bastin P., Sherwin T. and Gull K. (1998) Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* 391, 548.
- Benvenuti L. A., Roggerio A., Freitas H. F., Mansur A. J., Fiorelli A. and Higuchi M. L. (2008) Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann Trop Med Parasitol* 102, 481-7.
- Bern C., Verastegui M., Gilman R. H., Lafuente C., Galdos-Cardenas G., Calderon M., Pacori J., Del Carmen Abastoflor M., Aparicio H., Brady M. F., Ferrufino L., Angulo N., Marcus S., Sterling C. and Maguire J. H. (2009) Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis* 49, 1667-74.
- Blanco S. B., Segura E. L., Cura E. N., Chuit R., Tulian L., Flores I., Garbarino G., Villalonga J. F. and Gurtler R. E. (2000) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health* 5, 293-301.
- Bogdan C., Mattner J. and Schleicher U. (2004) The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol Rev* 202, 33-48.
- Borda ES and May;54(2): S.-B. L. (1996) Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 54(2): , 149-56.
- 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, 248-54.
- Brener Z. and Gazzinelli R. T. (1997) Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114, 103-10.
- Briceno L. and Mosca W. (1996) Defective production of interleukin 2 in patients with Chagas' disease. Purified IL-2 augments in vitro response in patients with chagasic cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91, 601-7.
- Britto C., Silveira C., Cardoso M. A., Marques P., Luquetti A., Macedo V. and Fernandes O. (2001) Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96, 823-6.
- Brutus L., Schneider D., Postigo J., Delgado W., Mollinedo S. and Chippaux J. P. (2007) Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101, 1159-60.
- Burgos J. M., Altcheh J., Bisio M., Duffy T., Valadares H. M., Seidenstein M. E., Piccinali R., Freitas J. M., Levin M. J., Macchi L., Macedo A. M., Freilij H. and Schijman A. G. (2007) Direct molecular profiling of minicircle signatures and

- lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 37, 1319-27.
- Burleigh B. A. and Andrews N. W. (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 49, 175-200.
- Buschiazzo A., Campetella O. E., Macina R. A., Salceda S., Frasch A. C. and Sanchez D. O. (1992) Sequence of the gene for a *Trypanosoma cruzi* protein antigenic during the chronic phase of human Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 54, 125-8.
- Bustamante J. M., Bixby L. M. and Tarleton R. L. (2008) Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* 14, 542-50.
- Camargo M. M., Almeida I. C., Pereira M. E., Ferguson M. A., Travassos L. R. and Gazzinelli R. T. (1997) Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol* 158, 5890-901.
- Campbell D. A., Westenberger S. J. and Sturm N. R. (2004) The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* 4, 549-62.
- Campos M. A., Almeida I. C., Takeuchi O., Akira S., Valente E. P., Procopio D. O., Travassos L. R., Smith J. A., Golenbock D. T. and Gazzinelli R. T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167, 416-23.
- Campos M. A., Closel M., Valente E. P., Cardoso J. E., Akira S., Alvarez-Leite J. I., Ropert C. and Gazzinelli R. T. (2004) Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 172, 1711-8.
- Camussone C., Gonzalez V., Belluzo M. S., Pujato N., Ribone M. E., Lagier C. M. and Marcipar I. S. (2009) Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 16, 899-905.
- Cancado J. R. (2002) Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44, 29-37.
- Carlier Y. (2005) [Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*]. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 Suppl 2, 105-7.
- Carranza J. C., Valadares H. M., D'Avila D. A., Baptista R. P., Moreno M., Galvao L. M., Chiari E., Sturm N. R., Gontijo E. D., Macedo A. M. and Zingales B. (2009) *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol* 39, 963-73.
- Carrilero B., Quesada J. J., Alfayate S. and Segovia M. (2009) [Congenital Chagas disease in a newborn of a Bolivian mother]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27, 486-7.
- Carvalho L. P., Passos S., Dutra W. O., Soto M., Alonso C., Gollob K. J., Carvalho E. M. and Ribeiro de Jesus A. (2005) Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 61, 337-42.
- Castro C., Prata A. and Macedo V. (2005) [The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas' disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* 38, 1-6.
- Castro E. (2009) Chagas' disease: lessons from routine donation testing. *Transfus Med* 19, 16-23.

- Cerisola J. A., Alvarez M. and de Rissio A. M. (1970) [Immunological diagnosis of Chagas' disease. Serological development of patients with Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 12, 403-11.
- Cimo P. L., Luper W. E. and Scouros M. A. (1993) Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case. *Tex Med* 89, 48-50.
- Clark A. K., Kovtunovych G., Kandlikar S., Lal S. and Stryker G. A. (2005) Cloning and expression analysis of two novel paraflagellar rod domain genes found in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 96, 312-20.
- Cooley G., Etheridge R. D., Boehlke C., Bundy B., Weatherly D. B., Minning T., Haney M., Postan M., Laucella S. and Tarleton R. L. (2008) High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e316.
- Corrales R. M., Mora M. C., Negrette O. S., Diosque P., Lacunza D., Virreira M., Breniere S. F. and Basombrio M. A. (2009) Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infect Genet Evol* 9, 278-82.
- Cortez M., Silva M. R., Neira I., Ferreira D., Sasso G. R., Luquetti A. O., Rassi A. and Yoshida N. (2006) *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect* 8, 36-44.
- Coura J. R. and Dias J. C. (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 31-40.
- Covarrubias C., Cortez M., Ferreira D. and Yoshida N. (2007) Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int J Parasitol* 37, 1609-16.
- Craig E. A., Gambill B. D. and Nelson R. J. (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev* 57, 402-14.
- Cuellar A., Santander S. P., Thomas Mdel C., Guzman F., Gomez A., Lopez M. C. and Puerta C. J. (2008) Monocyte-derived dendritic cells from chagasic patients vs healthy donors secrete differential levels of IL-10 and IL-12 when stimulated with a protein fragment of *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70. *Immunol Cell Biol* 86, 255-60.
- Cunningham D. S., Craig W. H. and Kuhn R. E. (1978) Reduction of complement levels in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 64, 1044-9.
- Cutrullis R. A., Moscatelli G. F., Moroni S., Volta B. J., Cardoni R. L., Altcheh J. M., Corral R. S., Freilij H. L. and Petray P. B. (2011) Benznidazole therapy modulates interferon-gamma and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children. *PLoS One* 6, e27133.
- Chessler A. D., Ferreira L. R., Chang T. H., Fitzgerald K. A. and Burleigh B. A. (2008) A novel IFN regulatory factor 3-dependent pathway activated by trypanosomes triggers IFN-beta in macrophages and fibroblasts. *J Immunol* 181, 7917-24.
- Chippaux J. P., Clavijo A. N., Santalla J. A., Postigo J. R., Schneider D. and Brutus L. (2009) Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. *Trop Med Int Health* 15, 87-93.
- Chippaux J. P., Clavijo A. N., Santalla J. A., Postigo J. R., Schneider D. and Brutus L. (2010) Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. *Trop Med Int Health* 15, 87-93.

- da Silveira J. F., Umezawa E. S. and Luquetti A. O. (2001) Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 17, 286-91.
- Dauby N., Alonso-Vega C., Suarez E., Flores A., Hermann E., Cordova M., Tellez T., Torrico F., Truyens C. and Carlier Y. (2009) Maternal infection with *Trypanosoma cruzi* and congenital Chagas disease induce a trend to a type 1 polarization of infant immune responses to vaccines. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e571.
- de Andrade A. L., Zicker F., de Oliveira R. M., Almeida Silva S., Luquetti A., Travassos L. R., Almeida I. C., de Andrade S. S., de Andrade J. G. and Martelli C. M. (1996) Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348, 1407-13.
- de Araujo F. F., Vitelli-Avelar D. M., Teixeira-Carvalho A., Antas P. R., Assis Silva Gomes J., Sathler-Avelar R., Otavio Costa Rocha M., Eloi-Santos S. M., Pinho R. T., Correa-Oliveira R. and Martins-Filho O. A. (2011) Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e992.
- de Faria J. B. and Alves G. (1993) Transmission of Chagas' disease through cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 56, 1583-4.
- de Meis J., Morrot A., Farias-de-Oliveira D. A., Villa-Verde D. M. and Savino W. (2009) Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e417.
- de Souza A. P., Olivieri B. P., de Castro S. L. and Araujo-Jorge T. C. (2000) Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. *Parasitol Res* 86, 800-8.
- Delsing B., Lopriore E., Blom N., Te Pas A. B., Vandenbussche F. P. and Walther F. J. (2007) Risk of persistent pulmonary hypertension of the neonate in twin-to-twin transfusion syndrome. *Neonatology* 92, 134-8.
- Desai M., ter Kuile F. O., Nosten F., McGready R., Asamo K., Brabin B. and Newman R. D. (2007) Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 7, 93-104.
- Devera R., Fernandes O. and Coura J. R. (2003) Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 1-12.
- Dias J. C. (1997) [Cecilio Romana, Romana's sign and Chagas' disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* 30, 407-13.
- Diaz D., Prieto A., Barcenilla H., Monserrat J., Prieto P., Sanchez M. A., Reyes E., Hernandez-Fuentes M. P., de la Hera A., Orfao A. and Alvarez-Mon M. (2004) Loss of lineage antigens is a common feature of apoptotic lymphocytes. *J Leukoc Biol* 76, 609-15.
- Diez H., Thomas M. C., Uruena C. P., Santander S. P., Cuervo C. L., Lopez M. C. and Puerta C. J. (2005) Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* 130, 643-51.
- Dobrovolskaia M. A. and Vogel S. N. (2002) Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* 4, 903-14.
- Drennan M. B., Stijlemans B., Van den Abbeele J., Quesniaux V. J., Barkhuizen M., Brombacher F., De Baetselier P., Ryffel B. and Magez S. (2005) The induction

- of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. *J Immunol* 175, 2501-9.
- Duranti M. A., Franzoni L., Sartor G., Benedetti A., Iwai L. K., Gruber A., Zingales B., Guzman F., Kalil J., Spisni A. and Cunha-Neto E. (1999) *Trypanosoma cruzi*: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen. *Exp Parasitol* 93, 38-44.
- Fabbro D. L., Streiger M. L., Arias E. D., Bizai M. L., del Barco M. and Amicone N. A. (2007) Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop* 40, 1-10.
- Falla A., Herrera C., Fajardo A., Montilla M., Vallejo G. A. and Guhl F. (2009) Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop* 110, 15-21.
- Feilij H., Muller L. and Gonzalez Cappa S. M. (1983) Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 18, 327-30.
- Fernandez-Villegas A., Pinazo M. J., Maranon C., Thomas M. C., Posada E., Carrilero B., Segovia M., Gascon J. and Lopez M. C. (2011) Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC Infect Dis* 11, 206.
- Fernandez M. C., Gonzalez Cappa S. M. and Solana M. E. (2009) *Trypanosoma cruzi*: Immunological predictors of benznidazole efficacy during experimental infection. *Exp Parasitol* 124, 172-80.
- Filardi L. S. and Brener Z. (1987) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81, 755-9.
- Fitzgerald K. A., Rowe D. C., Barnes B. J., Caffrey D. R., Visintin A., Latz E., Monks B., Pitha P. M. and Golenbock D. T. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198, 1043-55.
- Flechas I. D., Cuellar A., Cucunuba Z. M., Rosas F., Velasco V., Steindel M., Thomas Mdel C., Lopez M. C., Gonzalez J. M. and Puerta C. J. (2009) Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients. *BMC Infect Dis* 9, 186.
- Flores-Chavez M., Faez Y., Olalla J. M., Cruz I., Garate T., Rodriguez M., Blanc P. and Canavate C. (2008a) Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. *Cases J* 1, 302.
- Flores-Chavez M., Fernandez B., Puente S., Torres P., Rodriguez M., Monedero C., Cruz I., Garate T. and Canavate C. (2008b) Transfusional chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis* 46, e44-7.
- Fonseca S. G., Moins-Teisserenc H., Clave E., Ianni B., Nunes V. L., Mady C., Iwai L. K., Sette A., Sidney J., Marin M. L., Goldberg A. C., Guilherme L., Charron D., Toubert A., Kalil J. and Cunha-Neto E. (2005) Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes Infect* 7, 688-97.
- Freilij H. and Altcheh J. (1995) Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis* 21, 551-5.

- Fulton R. J., McDade R. L., Smith P. L., Kienker L. J. and Kettman J. R., Jr. (1997) Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 43, 1749-56.
- Galvão C., Carcavallo R., Rocha D. and Jurber J. (2003) A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202, 1-36.
- Gallerano R. R. and Sosa R. R. (2000) [Interventional study in the natural evolution of Chagas disease. Evaluation of specific antiparasitic treatment. Retrospective-prospective study of antiparasitic therapy]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 57, 135-62.
- Garcia S., Ramos C. O., Senra J. F., Vilas-Boas F., Rodrigues M. M., Campos-de-Carvalho A. C., Ribeiro-Dos-Santos R. and Soares M. B. (2005) Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1521-8.
- Garcia S. B., Aranha A. L., Garcia F. R., Basile F. V., Pinto A. P., de Oliveira E. C. and Zucoloto S. (2003) A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45, 91-3.
- Gaunt M. W., Yeo M., Frame I. A., Stothard J. R., Carrasco H. J., Taylor M. C., Mena S. S., Veazey P., Miles G. A., Acosta N., de Arias A. R. and Miles M. A. (2003) Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421, 936-9.
- Gay N. J. and Keith F. J. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-6.
- Gazzinelli R. T., Leme V. M., Cancado J. R., Gazzinelli G. and Scharfstein J. (1990) Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. *Infect Immun* 58, 1437-44.
- Gazzinelli R. T., Ropert C. and Campos M. A. (2004) Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* 201, 9-25.
- Geraldino R. S., Ferreira A. J., Lima M. A., Cabrine-Santos M., Lages-Silva E. and Ramirez L. E. (2006) Interstitial cells of Cajal in patients with chagasic megacolon originating from a region of old endemicity. *Pathophysiology* 13, 71-4.
- Giambiagi-deMarval M., Souto-Padron T. and Rondinelli E. (1996) Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 83, 335-45.
- Gluckstein D., Ciferri F. and Ruskin J. (1992) Chagas' disease: another cause of cerebral mass in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 92, 429-32.
- Goel A., Vohra H. and Varshney G. C. (1999) Strain-specific recognition of live *Leishmania donovani* promastigotes by homologous antiserum raised against a crude membrane fraction of infected macrophages. *Parasitol Res* 85, 19-24.
- Golgher D. and Gazzinelli R. T. (2004) Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* 37, 399-409.
- Gomes Y. M., Abath F. G., Furtado A. F., Regis L. N., Nakasawa M., Montenegro L. T., Vouldoukis I., Alfred-Morin C. and Monjour L. (1995) A monoclonal antibody against blood forms of *Trypanosoma cruzi* lyses the parasite in vitro and inhibits host cell invasion. *Appl Biochem Biotechnol* 50, 57-69.

- Gomes Y. M., Lorena V. M. 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 Suppl 1, 115-21.
- Gonzalez-Granado L. I., Rojo-Conejo P., Ruiz-Contreras J. and Gonzalez-Tome M. I. (2009) Chagas disease travels to Europe. *Lancet* 373, 2025.
- Grant I. H., Gold J. W., Wittner M., Tanowitz H. B., Nathan C., Mayer K., Reich L., Wollner N., Steinherz L., Ghavimi F. and et al. (1989) Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med* 111, 849-51.
- 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, 1-12.
- Hagger R., Finlayson C., Kahn F., De Oliveira R., Chimelli L. and Kumar D. (2000) A deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. *J Auton Nerv Syst* 80, 108-11.
- Hermann E., Truyens C., Alonso-Vega C., Rodriguez P., Berthe A., Torrico F. and Carlier Y. (2004) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-gamma in response to parasite antigens. *J Infect Dis* 189, 1274-81.
- Hernandez P., Heimann M., Riera C., Solano M., Santalla J., Luquetti A. O. and Beck E. (2010) Highly effective serodiagnosis for Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol* 17, 1598-604.
- Hofflin J. M., Sadler R. H., Araujo F. G., Page W. E. and Remington J. S. (1987) Laboratory-acquired Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81, 437-40.
- Hoft D. F., Kim K. S., Otsu K., Moser D. R., Yost W. J., Blumin J. H., Donelson J. E. and Kirchhoff L. V. (1989) *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun* 57, 1959-67.
- Houghten R. A. (1985) General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5131-5.
- Ibanez C. F., Affranchino J. L., Macina R. A., Reyes M. B., Leguizamón S., Camargo M. E., Aslund L., Pettersson U. and Frasch A. C. (1988) Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol* 30, 27-33.
- Iwai L. K., Juliano M. A., Juliano L., Kalil J. and Cunha-Neto E. (2005) T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *J Autoimmun* 24, 111-7.
- Jackson Y., Angheben A., Carrilero Fernandez B., Jansa i Lopez del Vallado J. M., Jannin J. G. and Albajar-Vinas P. (2009a) [Management of Chagas disease in Europe. Experiences and challenges in Spain, Switzerland and Italy]. *Bull Soc Pathol Exot* 102, 326-9.
- Jackson Y., Dang T., Schnetzler B., Pascual M. and Meylan P. (2011) *Trypanosoma cruzi* fatal reactivation in a heart transplant recipient in Switzerland. *J Heart Lung Transplant* 30, 484-5.
- Jackson Y., Getaz L., Wolff H., Holst M., Mauris A., Tardin A., Sztajzel J., Besse V., Loutan L., Gaspoz J. M., Jannin J., Albajar Vinas P., Luquetti A. and Chappuis F. (2010) Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e592.

- Jackson Y., Myers C., Diana A., Marti H. P., Wolff H., Chappuis F., Loutan L. and Gervais A. (2009b) Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis* 15, 601-3.
- Jannin J. and Villa L. (2007) An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1, 95-7.
- Jin D., Zhang L., Zheng J. and Zhao Y. (2008) The inflammatory Th 17 subset in immunity against self and non-self antigens. *Autoimmunity* 41, 154-62.
- Junqueira Jr L. (1991) Possible role of autonomic heart dysfunction insudden death associated with Chagas disease. . *Arch Bras Cardiol* 56, 429-434.
- Junqueira L. F., Jr. and Soares J. D. (2002) Impaired autonomic control of heart interval changes to Valsalva manoeuvre in Chagas' disease without overt manifestation. *Auton Neurosci* 97, 59-67.
- Kettman J. R., Davies T., Chandler D., Oliver K. G. and Fulton R. J. (1998) Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets. *Cytometry* 33, 234-43.
- Kierszenbaum F. and Lima M. F. (1983) Susceptibility of insect-borne, metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* to antibody-mediated mechanisms of destruction. *Am J Trop Med Hyg* 32, 1236-41.
- Kierszenbaum F. and Sonnenfeld G. (1982) Characterization of the antiviral activity produced during *Trypanosoma cruzi* infection and protective effects of exogenous interferon against experimental Chagas' disease. *J Parasitol* 68, 194-8.
- Kipnis T. L., David J. R., Alper C. A., Sher A. and da Silva W. D. (1981) Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 602-5.
- Koberle F. (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 6, 63-116.
- Kondo T., Takata H., Matsuki F. and Takiguchi M. (2009) Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol* 182, 1794-8.
- Krieger M. A., Almeida E., Oelemann W., Lafaille J. J., Pereira J. B., Krieger H., Carvalho M. R. and Goldenberg S. (1992) Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 46, 427-34.
- Kulkarni M. M., McMaster W. R., Kamysz E., Kamysz W., Engman D. M. and McGwire B. S. (2006) The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, Leishmania, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol* 62, 1484-97.
- Kulkarni M. M., Olson C. L., Engman D. M. and McGwire B. S. (2009) *Trypanosoma cruzi* GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. *Infect Immun* 77, 2193-200.
- Kumar S. and Tarleton R. L. (1998) The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 20, 207-16.
- Kun H., Moore A., Mascola L., Steurer F., Lawrence G., Kubak B., Radhakrishna S., Leiby D., Herron R., Mone T., Hunter R. and Kuehnert M. (2009) Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis* 48, 1534-40.

- 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* 45, 249-56.
- Laemmli U. K. (1975) Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4288-92.
- Laguens R. P., Cabeza Meckert P. M. and Vigliano C. A. (1999) [Pathogenesis of human chronic chagasic myocarditis]. *Medicina (B Aires)* 59 Suppl 2, 63-8.
- Lake J. A., de la Cruz V. F., Ferreira P. C., Morel C. and Simpson L. (1988) Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4779-83.
- Lasso P., Mesa D., Cuellar A., Guzman F., Bolanos N., Rosas F., Velasco V., Thomas Mdel C., Lopez M. C., Gonzalez J. M. and Puerta C. J. (2010) Frequency of specific CD8+ T cells for a promiscuous epitope derived from *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chagasic patients. *Parasite Immunol* 32, 494-502.
- Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K. A., Monks B. G., Knetter C. F., Lien E., Nilsen N. J., Espevik T. and Golenbock D. T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5, 190-8.
- Laucella S. A., Mazliah D. P., Bertocchi G., Alvarez M. G., Cooley G., Viotti R., Albareda M. C., Lococo B., Postan M., Armenti A. and Tarleton R. L. (2009) Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. *Clin Infect Dis* 49, 1675-84.
- Laucella S. A., Postan M., Martin D., Hubby Fralish B., Albareda M. C., Alvarez M. G., Lococo B., Barbieri G., Viotti R. J. and Tarleton R. L. (2004) Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis* 189, 909-18.
- Lent C. M., Ono J., Keyser K. T. and Karten H. J. (1979) Identification of serotonin within vital-stained neurons from leech ganglia. *J Neurochem* 32, 1559-63.
- Lescure F. X., Canestri A., Melliez H., Jaureguiberry S., Develoux M., Dorent R., Guiard-Schmid J. B., Bonnard P., Ajana F., Rolla V., Carlier Y., Gay F., Elghouzzi M. H., Danis M. and Pialoux G. (2008) Chagas disease, France. *Emerg Infect Dis* 14, 644-6.
- Levin M. J., Franco da Silveira J., Frasch A. C., Camargo M. E., Lafon S., Degrave W. M. and Rangel-Aldao R. (1991) Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol Immunol* 4, 11-9.
- Levin M. J., Mesri E., Benarous R., Levitus G., Schijman A., Levy-Yeyati P., Chiale P. A., Ruiz A. M., Kahn A., Rosenbaum M. B. and et al. (1989) Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 41, 530-8.
- Lopes E. R., Rocha A., Meneses A. C., Lopes M. A., Fatureto M. C., Lopes G. P. and Chapadeiro E. (1989) [Prevalence of visceromegalies in necropsies carried out in Triangulo Mineiro from 1954 to 1988]. *Rev Soc Bras Med Trop* 22, 211-5.
- Lorena V. M., Lorena I. M., Braz S. C., Melo A. S., Melo M. F., Melo M. G., Silva E. D., Ferreira A. G., Morais C. N., Costa V. M., Correa-Oliveira R. and Gomes Y. M. (2010) Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 72, 529-39.

- Lu L. and Cantor H. (2008) Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 5, 401-6.
- Luhrs K. A., Fouts D. L. and Manning J. E. (2003) Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 21, 3058-69.
- Luquetti A. O., Dias J. C. and Prata A. (2005) [Diagnosis and treatment of congenital infection caused by *Trypanosoma cruzi* in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 Suppl 2, 27-8.
- Macedo A. and Sagetto M. (2010) Implications of *Trypanosoma cruzi* intraspecific diversity in the pathogenesis of Chagas disease *Elsevier, London, UK/Burlington, MA, USA American Trypanosomiasis-Chagas Disease*, 489-522.
- Machado C. A. and Ayala F. J. (2001) Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7396-401.
- Maranon C., Egui A., Carrilero B., Thomas M. C., Pinazo M. J., Gascon J., Segovia M. and Lopez M. C. (2011) Identification of HLA-A *02:01-restricted CTL epitopes in *Trypanosoma cruzi* heat shock protein-70 recognized by Chagas disease patients. *Microbes Infect* 13, 1025-32.
- Maranon C., Planelles L., Alonso C. and Lopez M. C. (2000) HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *Int Immunol* 12, 1685-93.
- Maranon C., Thomas M. C., Planelles L. and Lopez M. C. (2001) The immunization of A2/K(b) transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the *T. cruzi* KMP11 antigen: identification of A2-restricted epitopes. *Mol Immunol* 38, 279-87.
- Marcon G. E., de Albuquerque D. M., Batista A. M., Andrade P. D., Almeida E. A., Guariento M. E., Teixeira M. A. and Costa S. C. (2011) *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106, 85-91.
- Martin D. and Tarleton R. (2004) Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev* 201, 304-17.
- Martin F., Puertas C., Thomas M. C., Maranon C., Patarroyo M. E., Martin J., Alonso C. and Lopez M. C. (1997) Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigenic epitope implicated in the infectivity of fibroblast LLC-MK2 cells. *Parasitol Res* 83, 226-32.
- Martin F., Requena J. M., Martin J., Alonso C. and Lopez M. C. (1993) Cytoplasmic-nuclear translocation of the Hsp70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 1155-62.
- Martinez de Tejada B., Jackson Y., Paccolat C. and Irion O. (2009) [Congenital Chagas disease in Geneva: diagnostic and clinical aspects]. *Rev Med Suisse* 5, 2091-2, 2094-6.
- Mendez G. F. and Cowie M. R. (2001) The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. *Int J Cardiol* 80, 213-9.
- Meneghelli U. G. (1985) Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. *Braz J Med Biol Res* 18, 255-64.
- Miles M. A., Feliciangeli M. D. and de Arias A. R. (2003) American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *Bmj* 326, 1444-8.
- Montiel G. and Díaz G. (2002) Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi* *Rev méd Hospital Nac Niños* 37, 57-63.

- Morell M., Thomas M. C., Caballero T., Alonso C. and Lopez M. C. (2006) The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 24, 7046-55.
- Morillo C. A. (2012) Actualización Estudio Clínico BENEFIT (The BENZnidazole Evaluation For interruming Trypanosomiasis. *Enfermedades Emergentes*
- Moya P., Moretti E., Paolasso R., Basso B., Blanco S., Sanmartino C. and Soich de Cura A. (1989) [Neonatal Chagas disease: laboratory diagnosis during the first year of life]. *Medicina (B Aires)* 49, 595-9.
- Munoz J., Gomez i Prat J., Gallego M., Gimeno F., Trevino B., Lopez-Chejade P., Ribera O., Molina L., Sanz S., Pinazo M. J., Riera C., Posada E. J., Sanz G., Portus M. and Gascon J. (2009) Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop* 111, 51-5.
- Munoz J., Portus M., Corachan M., Fumado V. and Gascon J. (2007) Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101, 1161-2.
- Murcia L., Carrilero B., Munoz M. J., Iborra M. A. and Segovia M. (2010) Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother* 65, 1759-64.
- Neira I., Silva F. A., Cortez M. and Yoshida N. (2003) Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 71, 557-61.
- Nickerson P., Orr P., Schroeder M. L., Sekla L. and Johnston J. B. (1989) Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann Intern Med* 111, 851-3.
- Nisida I. V., Amato Neto V., Braz L. M., Duarte M. I. and Umezawa E. S. (1999) A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in Sao Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41, 305-11.
- O'Garra A., Vieira P. L., Vieira P. and Goldfeld A. E. (2004) IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 114, 1372-8.
- O'Neill L. A., Fitzgerald K. A. and Bowie A. G. (2003) The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24, 286-90.
- Oliveira A. C., Peixoto J. R., de Arruda L. B., Campos M. A., Gazzinelli R. T., Golenbock D. T., Akira S., Previato J. O., Mendonca-Previato L., Nobrega A. and Bellio M. (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 173, 5688-96.
- Oliveira I., Torrico F., Munoz J. and Gascon J. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 945-56.
- Olson C. L., Nadeau K. C., Sullivan M. A., Winquist A. G., Donelson J. E., Walsh C. T. and Engman D. M. (1994) Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 269, 3868-74.
- OPS/OMS. (2006) Resultados de los grupos de trabajo. In: Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA) *Río de Janeiro*, 39-41.

- Otani M. M., Vinelli E., Kirchhoff L. V., del Pozo A., Sands A., Vercauteren G. and Sabino E. C. (2009) WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion* 49, 1076-82.
- Ouaissi A., Guilvard E., Delneste Y., Caron G., Magistrelli G., Herbault N., Thieblemont N. and Jeannin P. (2002) The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* 168, 6366-74.
- Ouyang W., Kolls J. K. and Zheng Y. (2008) The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454-67.
- Pacheco R. S., Ferreira M. S., Machado M. I., Brito C. M., Pires M. Q., Da-Cruz A. M. and Coutinho S. G. (1998) Chagas' disease and HIV co-infection: genotypic characterization of the *Trypanosoma cruzi* strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, 165-9.
- Padilla A. M., Bustamante J. M. and Tarleton R. L. (2009) CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol* 21, 385-90.
- Paricio-Talayero J. M., Benlloch-Muncharaz M. J., Collar-del-Castillo J. I., Rubio-Soriano A., Serrat-Perez C., Magraner-Egea J., Landa-Rivera L., Sanchez-Palomares M., Beseler-Soto B., Santos-Serrano L., Ferriol-Camacho M., Mut-Buigues J., Tomas-Vila M., del Carmen Alonso-Jimenez M., Dominguez-Marquez V. and Igual-Adell R. (2008) [Epidemiological surveillance of vertically-transmitted Chagas disease at three maternity hospitals in the Valencian Community]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 26, 609-13.
- Pasion S. G., Brown G. W., Brown L. M. and Ray D. S. (1994) Periodic expression of nuclear and mitochondrial DNA replication genes during the trypanosomatid cell cycle. *J Cell Sci* 107 (Pt 12), 3515-20.
- Pedrosa R. C. and Campos M. C. (2004) [Exercise testing and 24 hours Holter monitoring in the detection of complex ventricular arrhythmias in different stages of chronic Chagas' heart disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* 37, 376-83.
- Pehrson P. O., Wahlgren M. and Bengtsson E. (1981) Asymptomatic congenital Chagas' disease in a 5-year-old child. *Scand J Infect Dis* 13, 307-8.
- Pereira K. S., Schmidt F. L., Guaraldo A. M., Franco R. M., Dias V. L. and Passos L. A. (2009) Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot* 72, 441-6.
- Perez de Pedro I., Martín Rico P., Santamaria S., Faez Y., Blanc P., Jesus Pascual M., Angeles Cuesta M., Munoz P., MI, Carmen Villaita M., Vidales I. and Heiniger A. (2008) Caso clínico de enfermedad de Chagas transfusional. *Emfermedades Emergentes* 10 (Suppl1), 14-8.
- Pinazo M. J., Tassies D., Munoz J., Fisa R., Posada Ede J., Monteagudo J., Ayala E., Gallego M., Reverter J. C. and Gascon J. (2011) Hypercoagulability biomarkers in *Trypanosoma cruzi* -infected patients. *Thromb Haemost* 106, 617-23.
- Planelles L., Thomas M., Pulgar M., Maranon C., Grabbe S. and Lopez M. C. (2002) *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70 kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80, 241-7.
- Planelles L., Thomas M. C., Alonso C. and Lopez M. C. (2001) DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun* 69, 6558-63.
- Planelles L., Thomas M. C., Maranon C., Morell M. and Lopez M. C. (2003) Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression

- pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin Exp Immunol* 131, 41-7.
- Plata F., Wietzerbin J., Pons F. G., Falcoff E. and Eisen H. (1984) Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Eur J Immunol* 14, 930-5.
- Prata A. (1994) Chagas' disease. *Infect Dis Clin North Am* 8, 61-76.
- Prata A. (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1, 92-100.
- Puentes F., Guzman F., Marin V., Alonso C., Patarroyo M. E. and Moreno A. (1999) Leishmania: fine mapping of the Leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization. *Exp Parasitol* 93, 7-22.
- Punukollu G., Gowda R. M., Khan I. A., Navarro V. S. and Vasavada B. C. (2007) Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 115, 279-83.
- Py M., Pedrosa R., Silveira J., Medeiros A. and Andre C. (2009) Neurological manifestations in Chagas disease without cardiac dysfunction: correlation between dysfunction of the parasympathetic nervous system and white matter lesions in the brain. *J Neuroimaging* 19, 332-6.
- Qazi K. R., Oehlmann W., Singh M., Lopez M. C. and Fernandez C. (2007) Microbial heat shock protein 70 stimulatory properties have different TLR requirements. *Vaccine* 25, 1096-103.
- Ramos S. G., Maturri L., Rossi L. and Rossi M. A. (1995) Sudden cardiac death in the indeterminate phase of Chagas' disease associated with acute infarction of the right carotid body. *Int J Cardiol* 52, 265-8.
- Rangel-Aldao R., Comach G., Allende O., Cayama E., Delgado V., Piras R., Piras M., Henriquez D. and Negri S. (1986) *Trypanosoma cruzi*: polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 20, 25-32.
- Rassi A., Jr., Rassi A. and Little W. C. (2000) Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23, 883-9.
- Rassi A., Jr., Rassi A. and Marin-Neto J. A. (2010) Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-402.
- Requena J. M., Jimenez-Ruiz A., Soto M., Assiego R., Santaren J. F., Lopez M. C., Patarroyo M. E. and Alonso C. (1992) Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol Biochem Parasitol* 53, 201-11.
- Requena J. M., Lopez M. C., Jimenez-Ruiz A., de la Torre J. C. and Alonso C. (1988) A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* 16, 1393-406.
- Rezende Filho J., De Rezende J. M. and Melo J. R. (2005) Electrogastrography in patients with Chagas' disease. *Dig Dis Sci* 50, 1882-8.
- Rezende J. and Luquetti A. (1994) Chagasic megavisceras. *Scientific publication* 547, 149-171.
- Riarte A., Velázquez N., Pardo A., Schijman A., Ramírez J., De Rissio A., Hernández Y., Esteva M., Luna C., Sinagra A. and Ruiz A. (2012) "TRAENA" TRAtamiento EN pacientes Adultos. Una evaluación preliminar de un ensayo clínico aleatorizado con Benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica. *Enfermedades Emergentes*.
- Riera C., Guarro A., Kassab H. E., Jorba J. M., Castro M., Angrill R., Gallego M., Fisa R., Martín C., Lobato A. and Portus M. (2006) Congenital transmission of

- Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *Am J Trop Med Hyg* 75, 1078-81.
- Rivera M. T., Marques de Araujo S., Lucas R., Deman J., Truyens C., Defresne M. P., de Baetselier P. and Carlier Y. (1995) High tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant mice and increased TNF-alpha gene transcription in their offspring. *Infect Immun* 63, 591-5.
- Rocha G., Martins A., Gama G., Brandao F. and Atouguia J. (2004) Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness. *Lancet* 363, 247.
- Rodriguez A. M., Santoro F., Afchain D., Bazin H. and Capron A. (1981) *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect Immun* 31, 524-9.
- Ruiz R. C., Favoreto S., Jr., Dorta M. L., Oshiro M. E., Ferreira A. T., Manque P. M. and Yoshida N. (1998) Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J* 330 (Pt 1), 505-11.
- Russomando G., Sanchez Z., Meza G. and de Guillen Y. Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease. *Expert Rev Mol Diagn* 10, 705-7.
- Sakai A., Koga T., Lim J. H., Jono H., Harada K., Szymanski E., Xu H., Kai H. and Li J. D. (2007) The bacterium, nontypeable *Haemophilus influenzae*, enhances host antiviral response by inducing Toll-like receptor 7 expression: evidence for negative regulation of host anti-viral response by CYLD. *Febs J* 274, 3655-68.
- Sambrook J., Maniatis T. and Fritsch E. F. (1989) Molecular cloning. *A laboratory manual*. 2nd Ed.
- Sanchez Negrette O., Sanchez Valdez F. J., Lacunza C. D., Garcia Bustos M. F., Mora M. C., Uncos A. D. and Basombrio M. A. (2008) Serological evaluation of specific-antibody levels in patients treated for chronic Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol* 15, 297-302.
- Santiago H. C., Feng C. G., Bafica A., Roffe E., Arantes R. M., Cheever A., Taylor G., Vieira L. Q., Aliberti J., Gazzinelli R. T. and Sher A. (2005) Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. *J Immunol* 175, 8165-72.
- Santrich C., Moore L., Sherwin T., Bastin P., Brokaw C., Gull K. and LeBowitz J. H. (1997) A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. *Mol Biochem Parasitol* 90, 95-109.
- Saravia N. G., Hazbon M. H., Osorio Y., Valderrama L., Walker J., Santrich C., Cortazar T., Lebowitz J. H. and Travi B. L. (2005) Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 23, 984-95.
- Schenone H., Jr., Gonzalez H., Schenone H. and Rojas A. (1982) [Experimental infection of rats with *Trypanosoma cruzi* by oral route]. *Bol Chil Parasitol* 37, 2-9.
- Schijman A. (2006).
- Schijman A. G., Altcheh J., Burgos J. M., Biancardi M., Bisio M., Levin M. J. and Freilij H. (2003) Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 52, 441-9.
- Schmunis G. A. (1991) *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 31, 547-57.

- Schmunis G. A. (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1, 75-85.
- Schmunis G. A. and Yadon Z. E. (2010) Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 115, 14-21.
- Schofield C. J. and Galvao C. (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110, 88-100.
- Sepulveda P., Hontebeyrie M., Liegeard P., Mascilli A. and Norris K. A. (2000) DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 68, 4986-91.
- Shevach E. M. (2001) Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 193, F41-6.
- Shippey S. H., 3rd, Zahn C. M., Cisar M. M., Wu T. J. and Satin A. J. (2005) Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Obstet Gynecol* 192, 586-91.
- Shoda L. K., Kegerreis K. A., Suarez C. E., Roditi I., Corral R. S., Bertot G. M., Norimine J. and Brown W. C. (2001) DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect Immun* 69, 2162-71.
- Silva A. E., Silva A. C., Faleiros A. C., Guimaraes C. S., Correa R. R., Oliveira F. A., Correia D., Teixeira A. C., Ramirez L. E., Teixeira Vde P. and dos Reis M. A. (2010) Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. *Ann Diagn Pathol* 14, 199-203.
- Simpson L., Neckelmann N., de la Cruz V. F., Simpson A. M., Feagin J. E., Jasmer D. P. and Stuart J. E. (1987) Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J Biol Chem* 262, 6182-96.
- Sonnenfeld G. and Kierszenbaum F. (1981) Increased serum levels of an interferon-like activity during the acute period of experimental infection with different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 30, 1189-91.
- Sosa-Estani S., Dri L., Touris C., Abalde S., Dell'arciprete A. and Braunstein J. (2009) [Vectorial and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Las Lomitas, Formosa]. *Medicina (B Aires)* 69, 424-30.
- Sosa Estani S., Segura E. L., Ruiz A. M., Velazquez E., Porcel B. M. and Yampotis C. (1998) Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59, 526-9.
- Stevens J. R., Noyes H. A., Schofield C. J. and Gibson W. (2001) The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* 48, 1-56.
- Sturm N. R. and Campbell D. A. (2009) Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 115, 35-43.
- Tafuri W. L., Maria T. A., Lopes E. R. and Chapadeiro E. (1973) [Electron microscopy of the myocardium in human trypanosomiasis cruzi]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 15, 347-70.
- Takeuchi O. and Akira S. (2002) MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 270, 155-67.
- Takeuchi O. and Akira S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-20.

- Tarleton R. L. (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 31, 550-4.
- Tarleton R. L. (2007) Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* 19, 430-4.
- Tarleton R. L., Reithinger R., Urbina J. A., Kitron U. and Gurtler R. E. (2007) The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med* 4, e332.
- Taylor G. A., Feng C. G. and Sher A. (2004) p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 4, 100-9.
- Thomas M. C., Fernandez-Villegas A., Carrilero B., Maranon C., Saura D., Noya O., Segovia M., Alarcon de Noya B., Alonso C. and Lopez M. C. (2012) Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology. *Clin Vaccine Immunol* 19, 167-73.
- Thomas M. C., Garcia-Perez J. L., Alonso C. and Lopez M. C. (2000) Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol* 19, 47-57.
- Thomas M. C., Longobardo M. V., Carmelo E., Maranon C., Planelles L., Patarroyo M. E., Alonso C. and Lopez M. C. (2001) Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clin Exp Immunol* 123, 465-71.
- Tibayrenc M. and Breniere S. F. (1988) *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 Suppl 1, 249-55.
- Tibayrenc M., Kjellberg F. and Ayala F. J. (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2414-8.
- Torrico F., Alonso-Vega C., Suarez E., Rodriguez P., Torrico M. C., Dramaix M., Truyens C. and Carlier Y. (2004) Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 70, 201-9.
- Trinchieri G. and Sher A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7, 179-90.
- Trischmann T., Tanowitz H., Wittner M. and Bloom B. (1978) *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp Parasitol* 45, 160-8.
- Troncon L. E., Oliveira R. B., Romanello L. M., Rosa-e-Silva L., Pinto M. C. and Iazigi N. (1993) Abnormal progression of a liquid meal through the stomach and small intestine in patients with Chagas' disease. *Dig Dis Sci* 38, 1511-7.
- Tyler K. M. and Engman D. M. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 31, 472-81.
- Umekita L. F. and Mota I. (2000) How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz J Med Biol Res* 33, 253-8.
- Umezawa E. S., Bastos S. F., Camargo M. E., Yamauchi L. M., Santos M. R., Gonzalez A., Zingales B., Levin M. J., Sousa O., Rangel-Aldao R. and da Silveira J. F. (1999) Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol* 37, 1554-60.
- Une C., Andersson J. and Orn A. (2003) Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during

- experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* 134, 195-201.
- Urbina J. A. (2010) Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* 115, 55-68.
- Vabulas R. M., Ahmad-Nejad P., Ghose S., Kirschning C. J., Issels R. D. and Wagner H. (2002) HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277, 15107-12.
- Vaena de Avalos S., Blader I. J., Fisher M., Boothroyd J. C. and Burleigh B. A. (2002) Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J Biol Chem* 277, 639-44.
- Valiente-Gabioud A. A., Veaute C., Perrig M., Galan-Romano F. S., Sferco S. J. and Marcipar I. S. (2011) Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. *Exp Parasitol* 127, 672-9.
- Van Voorhis W. C., Schlekewy L. and Trong H. L. (1991) Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5993-7.
- Vasconcelos R. H., Amaral F. N., Cavalcanti M. G., Silva E. D., Ferreira A. G., Morais C. N. and Gomes Y. M. (2010) Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. *Hum Immunol* 71, 964-7.
- Vekemans J., Truyens C., Torrico F., Solano M., Torrico M. C., Rodriguez P., Alonso-Vega C. and Carlier Y. (2000) Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells To produce pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect Immun* 68, 5430-4.
- Vercosa A. F., Lorena V. M., Carvalho C. L., Melo M. F., Cavalcanti M. G., Silva E. D., Ferreira A. G., Pereira V. R., Souza W. V. and Gomes Y. M. (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, 271-6.
- Vergara U., Lorca M., Veloso C., Gonzalez A., Engstrom A., Aslund L., Pettersson U. and Frasch A. C. (1991) Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. *J Clin Microbiol* 29, 2034-7.
- Villalba R., Fornes G., Alvarez M. A., Roman J., Rubio V., Fernandez M., Garcia J. M., Vinals M. and Torres A. (1992) Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clin Infect Dis* 14, 594-5.
- Villalta F., Zhang Y., Bibb K. E., Burns J. M., Jr. and Lima M. F. (1998) Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 247-52.
- Viotti R., Vigliano C., Armenti H. and Segura E. (1994) Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 127, 151-62.
- Viotti R., Vigliano C., Lococo B., Alvarez M. G., Petti M., Bertocchi G. and Armenti A. (2009) Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7, 157-63.
- Viotti R., Vigliano C., Lococo B., Bertocchi G., Petti M., Alvarez M. G., Postan M. and Armenti A. (2006) Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas

- disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144, 724-34.
- Virreira M., Torrico F., Truyens C., Alonso-Vega C., Solano M., Carlier Y. and Svoboda M. (2003) Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 68, 574-82.
- Vitelli-Avelar D. M., Sathler-Avelar R., Teixeira-Carvalho A., Pinto Dias J. C., Gontijo E. D., Faria A. M., Eloi-Santos S. M. and Martins-Filho O. A. (2008) Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol* 68, 516-25.
- Wendel S. (2010) Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control? *Acta Trop* 115, 28-34.
- Westenberger S. J., Barnabe C., Campbell D. A. and Sturm N. R. (2005) Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171, 527-43.
- WHO. (2002) Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser* 905, i-vi, 1-109, back cover.
- Woodland D. L. and Dutton R. W. (2003) Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 15, 336-42.
- Woolley D. W. and Merrifield R. B. (1963) Anomalies of the structural specificity of peptides. *Ann N Y Acad Sci* 104, 161-71.
- Wright A. D., Li S., Feng S., Martin D. S. and Lynn D. H. (1999) Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol* 99, 69-76.
- Wrightman R. A. and Manning J. E. (2000) Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 18, 1419-27.
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K. and Akira S. (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-9.
- Yarovinsky F., Zhang D., Andersen J. F., Bannenberg G. L., Serhan C. N., Hayden M. S., Hieny S., Sutterwala F. S., Flavell R. A., Ghosh S. and Sher A. (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-9.
- Yoshida N. (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78, 87-111.
- Yoshida N. (2008) *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int* 57, 105-9.
- Zeledon R. and Rabinovich J. E. (1981) Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol* 26, 101-33.
- Zingales B., Andrade S. G., Briones M. R., Campbell D. A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A. M., Machado C. R., Miles M. A., Romanha A. J., Sturm N. R., Tibayrenc M. and Schijman A. G. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1051-4.

Zingales B., Miles M. A., Campbell D. A., Tibayrenc M., Macedo A. M., Teixeira M. M., Schijman A. G., Llewellyn M. S., Lages-Silva E., Machado C. R., Andrade S. G. and Sturm N. R. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12, 240-53.