

Tesis para optar por el título de Licenciada en Biotecnología

Refinamiento de herramientas de serotipificación de *Trypanosoma cruzi* basadas en TSSA (trypomastigote small surface antigen).

Victoria Arcondo

Director: Carlos Buscaglia

Co-directora: Guadalupe Romer



Universidad
Nacional
de San Martín

I I B I O

Diciembre 2024

Agradecimientos

A mis papás, por darme las herramientas para hacer esta carrera, por confiar en mí siempre y por dejarme recorrer mi camino con mucha libertad.

A mis hermanas, por ser mis primeras amigas, por soportarme en mis peores momentos y por las risas, anécdotas y momentos compartidos creciendo juntas.

A mi abuelo, por estar siempre presente, por todas las cosas que me enseñaste, por haberme ayudado mucho en estos últimos años y por ser una de las personas que me marcó de por vida.

A Con, por este año hermoso que compartimos juntos, y todos los demás en los que siempre estuviste presente. Gracias por hacer de tu casa mi casa, por escucharme siempre que lo necesité, por motivarme y tenerme mucha paciencia en este último año, sin vos no hubiese sido igual.

A la Buscaloneta (Carlos, Vir, Guada, Aldi y Cami), por integrarme y hacerme sentir parte desde el momento uno. A Carlos, por la paciencia infinita y por permitirme ser parte de tu laboratorio. A Guada, por haber sido la mejor guía posible en esta etapa, por todas las cosas que me enseñaste y por el acompañamiento y la ayuda constante.

A la UNSAM y sus docentes, por darme la mejor formación posible, por el acompañamiento incondicional y por todas las oportunidades de crecimiento que me dieron a lo largo de estos años.

A mis amigos del barrio (Javi, Picho, Loa, Sofi, Cami y Caro), por haber crecido juntos, por entender cada una de mis ausencias en estos años, por los hermosos momentos que compartimos y por haberse vuelto prácticamente una parte de mi familia.

A mis amigos del cole (Agus, Sofi, Equi, Marcos, Lauti, Romi y Joaco), por las noches infinitas de risas, por ayudarme a despejarme en los momentos complicados y por conservar esta amistad tan linda a lo largo de los años.

A mi camada, por todo el recorrido que hicimos en conjunto. Gracias por las tardes en el pastito, por los festejos de cada parcial aprobado, por cada mate, cada almuerzo de mezasa, cada laboratorio interminable y cada parcial caótico que vivimos juntos. De un grupo de 25 desconocidos, se volvieron mis amigos más íntimos. Gracias por vivir esta etapa con tanta emoción y pasión como yo, estos años quedan grabados para siempre en mi corazón.

A Abi por ser mi primer facuamiga, por escucharme y tenerme siempre presente, y por el hermoso vínculo que se formó en estos años. A Toto, por ser tan compañero, por darme una mano siempre que lo necesite y hacemos parte de tu hogar. A Dani, por las risas interminables, me atrevo a decir que sos la persona más graciosa de la UNSAM. A Gonza, por los km infinitos recorridos juntos, sos el mejor compañero de viaje. A Cande, por ser una de las personas más generosas que conozco y estar siempre dispuesta a ayudarme. A Sebi, por enseñarme a ser más creativa y por hacer de cada trabajo una oportunidad para reírnos mucho. A Mari, sos un ejemplo a seguir por todo el esfuerzo y

sacrificio que hiciste a lo largo de estos años, gracias por motivarme a ser cada día mejor. A Santi, me haces reír cada vez que te veo, gracias a vos los laboratorios fueron un poco más divertidos. A Ailu, por siempre tener una sonrisa y una actitud positiva que se contagia, te volviste muy importante este último año. A Facu, por cada asadito y cada charla en la que me escuchaste, desde el día uno pude ser yo misma con vos.

Resumen

Trypanosoma cruzi, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, presenta una estructura poblacional compleja, con múltiples cepas genéticamente diversas agrupadas en 6 unidades discretas de tipificación (DTU), denominadas TcI a TcVI. Estas DTU presentan variaciones en sus características eco-epidemiológicas y, probablemente, también clínicas, por lo que la tipificación de la cepa infectante emerge como una necesidad en el área. El antígeno TSSA (*trypomastigote small surface antigen*) es el candidato más prometedor para la serotipificación de *T. cruzi* ya que presenta 'variantes' en las distintas DTU que generan firmas de anticuerpos diferenciales durante la infección. Estudios recientes en el laboratorio permitieron identificar y mapear dos aparentes epítopes B lineales (A y B) de localización casi solapada dentro de la región polimórfica, y antigénica, de TSSA. Para explorar las propiedades serodiagnósticas de estos epítopes putativos en este trabajo se desarrollaron proteínas recombinantes conteniendo distintas configuraciones: i) solo el epítope A; ii) solo el epítope B; iii) los epítopes A y B, en su disposición original; y iv) ambos epítopes, pero separados por un espaciador. Todas estas construcciones se generaron para las variantes TSSAII, III y IV (codificadas en los genomas de TcII/TcV/TcVI, TcIII/TcV/TcVI y TcIV, respectivamente), se expresaron en bacterias como proteínas recombinantes de fusión y se ensayaron por ELISA frente a un panel de sueros de pacientes infectados con *T. cruzi*. Los resultados en TSSAII validan los epítopes A y B, mostrando que son secuencias discretas, reconocidas por distintas poblaciones de anticuerpos y que, en conjunto y en líneas generales, logran recapitular la respuesta serológica de la TSSAII original. Además, se muestra que el epítope A es significativamente más inmunogénico que el B, tanto en términos de reactividad como de seroprevalencia (de los 82 sueros TSSAII-reactivos ensayados, 41 reconocen exclusivamente al epítope A (epitotipo A), 30 presentan reconocimiento mixto (epitotipo AB) y solo 1 muestra epitotipo B. La inmunodominancia del epítope A se extiende también a las variantes TSSAIII y TSSAIV. Más interesante, los epítopes A de las variantes de TSSA muestran mayor promiscuidad de reconocimiento serológico en comparación con los epítopes B, que son más específicos. Por último, se muestra que el agregado del espaciador mejora la performance diagnóstica de TSSAII ya que i) permite el rescate diagnóstico de sueros catalogados como 'negativos' por la TSSAII salvaje, sin espaciador; y ii) aumenta su reactividad frente a sueros de epitotipo AB pero no de epitotipo A o B. Este último punto sugiere que la disposición adyacente de los epítopes A y B en TSSA dificulta su reconocimiento simultáneo por los distintos anticuerpos. En conjunto, los resultados obtenidos aquí contribuyen a la caracterización antigénica de TSSA y aportan información valiosa y posibles herramientas para el refinamiento de los protocolos de serodiagnóstico y serotipificación de *T. cruzi* basados en esta molécula.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, serotipificación, TSSA (*trypomastigote small surface antigen*), DTU (unidades discretas de tipificación).

Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en

“Refinamiento de herramientas de serotipificación de *Trypanosoma cruzi* basadas en TSSA (trypomastigote small surface antigen)”. Victoria Arondo, Guadalupe Romer, Virginia Balouz, Carlos A. Buscaglia. *Póster en el XXVII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología, Buenos Aires, Argentina (2024).*

Índice

Agradecimientos	2
Resumen	4
Abreviaturas y definiciones	7
Introducción	8
<i>Trypanosoma cruzi</i> y enfermedad de Chagas.....	8
Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	11
Diversidad genética de <i>T. cruzi</i>	12
Tipificación de <i>T. cruzi</i>	14
TSSA: Características y potencial para serotipificación.....	15
Objetivos	19
Materiales y Métodos	20
Diseño de los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp.....	20
Identificación de los clones positivos y purificación de los plásmidos.....	21
Expresión de proteínas recombinantes.....	22
Purificación y caracterización de proteínas recombinantes.....	23
Muestras biológicas.....	24
Antígenos.....	25
ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	25
Procesamiento, análisis y presentación de datos.....	26
Análisis estadístico.....	27
Resultados	28
Diseño de los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp.....	28
Generación de plásmidos pGEX-TSSAII-A y B, -TSSAIII-A y B y -TSSAIV-A y B.....	30
Expresión de las variantes de TSSA en <i>E. coli</i>	32
Purificación de las variantes de TSSA.....	34
Caracterización de la respuesta serológica contra TSSA.....	36
Análisis de la respuesta serológica contra TSSAII.....	37
Epitopes A y B.....	37
Sueros cross-reactivos y exclusivos.....	38
Espaciador molecular.....	40
Análisis de la respuesta serológica contra TSSAIII y TSSAIV.....	45
Discusión	49
Conclusiones	52
Anexos	53
Bibliografía	58

Abreviaturas y definiciones

- ❖ Aa: Aminoácidos
- ❖ AcNa: Acetato de sodio
- ❖ ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ❖ Amp: Ampicilina
- ❖ APS: sulfato de amonio
- ❖ ARN: Ácido ribonucleico
- ❖ BrEt: Bromuro de etidio
- ❖ BSA: Albúmina sérica bovina
- ❖ C.s.p: Cantidades suficientes para
- ❖ DMSO: Dimetilsulfóxido
- ❖ EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
- ❖ ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*): Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- ❖ Epitope: determinante antigénico
- ❖ Epitope B lineal: secuencia continua de un antígeno reconocida por un anticuerpo
- ❖ Epitotipo: tipo de reconocimiento epitópico definido para un suero dado
- ❖ EtOH: Etanol
- ❖ GSH: Glutatión reducido
- ❖ GST: Glutatión S-transferasa
- ❖ HRP (*horseradish peroxidase*): peroxidasa de rábano
- ❖ IgG: Inmunoglobulina (isotipo G)
- ❖ IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
- ❖ LAMP (*loop mediated isothermal amplification*): Amplificación isotérmica mediada por bucle
- ❖ LB: Luria-Bertani Broth
- ❖ MCS (*multiple cloning site*): Sitio de clonado múltiple
- ❖ MgCl₂: cloruro de magnesio
- ❖ MK (*molecular weight marker*): Marcador de masa molecular
- ❖ mLEE: Electroforesis enzimática multilocus
- ❖ OD: Densidad óptica
- ❖ ON (*over-night*): Durante toda la noche
- ❖ PBS: Buffer fosfato salino
- ❖ PBS-T: Tween 20 al 0,05% en PBS
- ❖ PCR (*polymerase chain reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa
- ❖ pb: Pares de bases
- ❖ PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- ❖ RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
- ❖ RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
- ❖ S.D: Desvío estándar
- ❖ SDS (*sodium dodecyl sulphate*): dodecilsulfato sódico
- ❖ SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*): Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes
- ❖ Sp (*spacer*): Espaciador molecular
- ❖ Suero cross-reactivo: Suero que reconoce a más de una isoforma de TSSA
- ❖ Suero TSSAII-exclusivo: Suero que solo reconoce a TSSAII
- ❖ Suero TSSAII-reactivo: Suero que reconoce a TSSAII
- ❖ TBE: Tris-borato-EDTA
- ❖ TE: Tris-HCl-EDTA
- ❖ TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
- ❖ TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina
- ❖ TSSA (*trypomastigote small surface antigen*): antígeno pequeño de superficie de tripomastigote de *T. cruzi*
- ❖ Tween 20: nombre comercial del detergente polisorbato 20 o monolaurato de polioxi-etilensorbitano
- ❖ U.A.: Unidades Arbitrarias

Introducción

Trypanosoma cruzi y enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario unicelular flagelado, causante de la enfermedad de Chagas, una de las enfermedades tropicales desatendidas más relevantes [1]. Esta enfermedad afecta a unos 6-7 millones de personas, principalmente en América Latina, constituyendo un grave problema sanitario y socioeconómico en la región [2]. En los últimos años, y como consecuencia de la migración de personas infectadas hacia países no endémicos como Estados Unidos, Canadá, Japón y varios miembros de la Unión Europea, esta enfermedad también se ha convertido en un problema emergente de la Salud Pública Global [3].

T. cruzi tiene un ciclo de vida complejo que involucra tanto a un vector (un insecto triatomino hematófago vulgarmente conocido como “vinchuca” [Subfamilia: Triatominae, Familia: Reduviidae, Orden: Hemiptera]), como a un amplio espectro de hospedadores vertebrados, que incluye al hombre y distintas especies de animales domésticos y salvajes [1,4,5]. A lo largo de su ciclo de vida, este parásito se diferencia a distintos estadios morfológicos mayoritarios, que muestran notables adaptaciones estructurales y metabólicas a los nichos específicos donde se desarrollan. Dentro del hospedador vertebrado, por ejemplo, *T. cruzi* alterna entre dos estadios morfológicos principales: los amastigotes intracelulares (formas replicativas, aflageladas y sésiles, eventualmente infectivas), y los tripomastigotes sanguíneos (formas no replicativas, infectivas) [5].

La infección en el insecto vector inicia cuando éste se alimenta de un vertebrado infectado e ingiere tripomastigotes presentes en su sangre (Fig 1). Estos se diferencian en epimastigotes (formas no infectivas) en el tracto digestivo del insecto, donde se multiplican activamente [6]. Cuando alcanzan el recto, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva no replicativa del parásito), los cuales se liberan junto con la excreta del insecto cuando éste se alimenta. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan al hospedador vertebrado a través de heridas o mucosas, y pueden invadir distintos tipos celulares. Una vez dentro de la célula blanco, los tripomastigotes metacíclicos se diferencian en amastigotes, que se replican en el citoplasma por fisión binaria. Después de varias rondas de replicación, los amastigotes vuelven a diferenciarse en tripomastigotes (llamados tripomastigotes sanguíneos, diferentes a los metacíclicos), que escapan de las células, infectando células vecinas o diseminándose a través del torrente sanguíneo hacia distintos tejidos. Finalmente, el ciclo se “completa” cuando un triatomino ingiere el parásito al alimentarse de la sangre de un vertebrado infectado (Fig 1) [7,8].

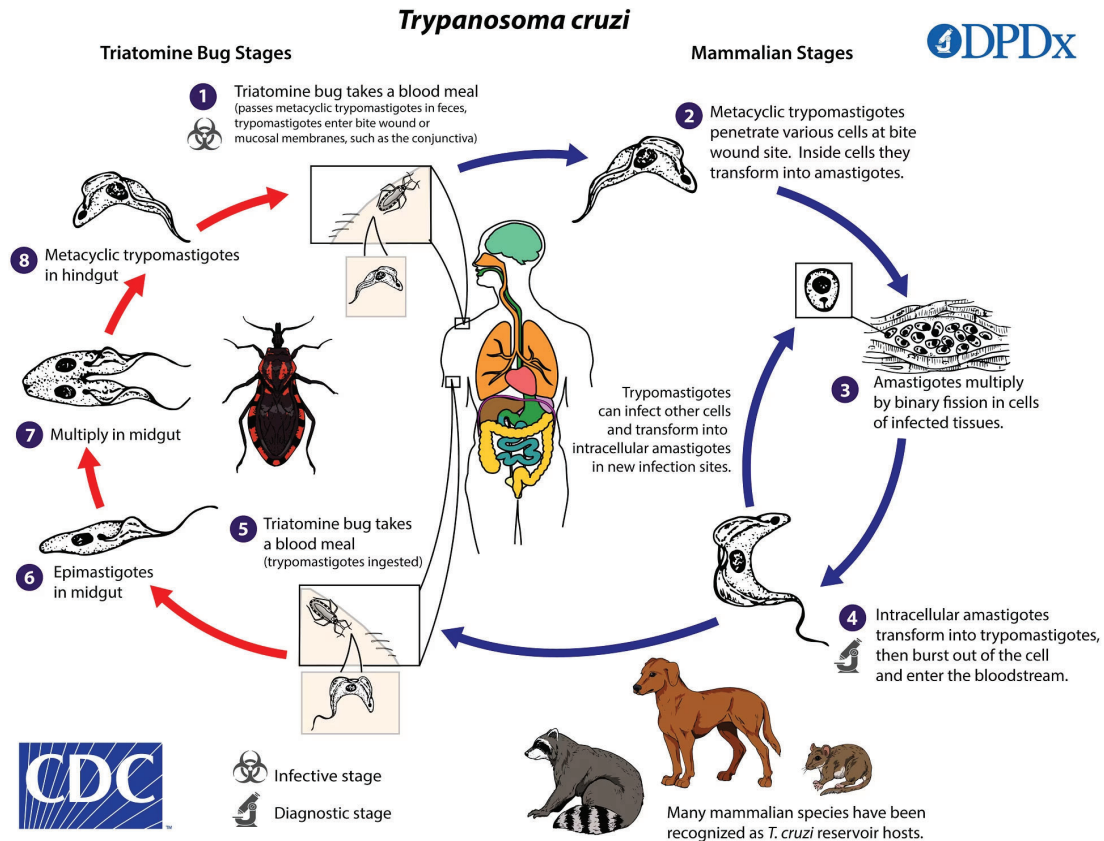


Figura 11. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Extraído de: [9]

En las regiones donde la enfermedad es endémica, la principal forma de transmisión es la vía vectorial (Fig I2). Sin embargo, la infección con *T. cruzi* también puede ocurrir por otras vías, como la transmisión congénita durante el embarazo o el parto (también llamada transmisión vertical), las transfusiones con sangre infectada o los trasplantes de órganos contaminados con el parásito, o la exposición accidental en entornos de laboratorio. Además, en los últimos años han aumentado las infecciones causadas por el consumo de alimentos y/o bebidas contaminadas con el parásito (transmisión oral, Fig I2) [10,11].

En humanos, la infección aguda ocurre luego de un periodo de incubación de 5-40 días después de la exposición al parásito y tiene una duración de alrededor de dos meses. Esta fase se caracteriza por una alta parasitemia (carga de parásitos en sangre) y sintomatología generalmente leve o nula e inespecífica: fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares y abdominales, y en algunos casos, inflamación en el sitio de infección. Esta sintomatología poco clara dificulta el diagnóstico clínico, dado que puede ser adjudicada a otras afecciones [10,11]. La fase aguda es más peligrosa en infantes y neonatos, resultando mortal en alrededor del 10% de los casos que desarrollan complicaciones severas como encefalomielitis o insuficiencia cardíaca [12]. Es en esta fase temprana, sin embargo,

cuando el tratamiento con los medicamentos antiparasitarios actualmente disponibles (benznidazol y nifurtimox) presenta mayor eficacia [12,13].

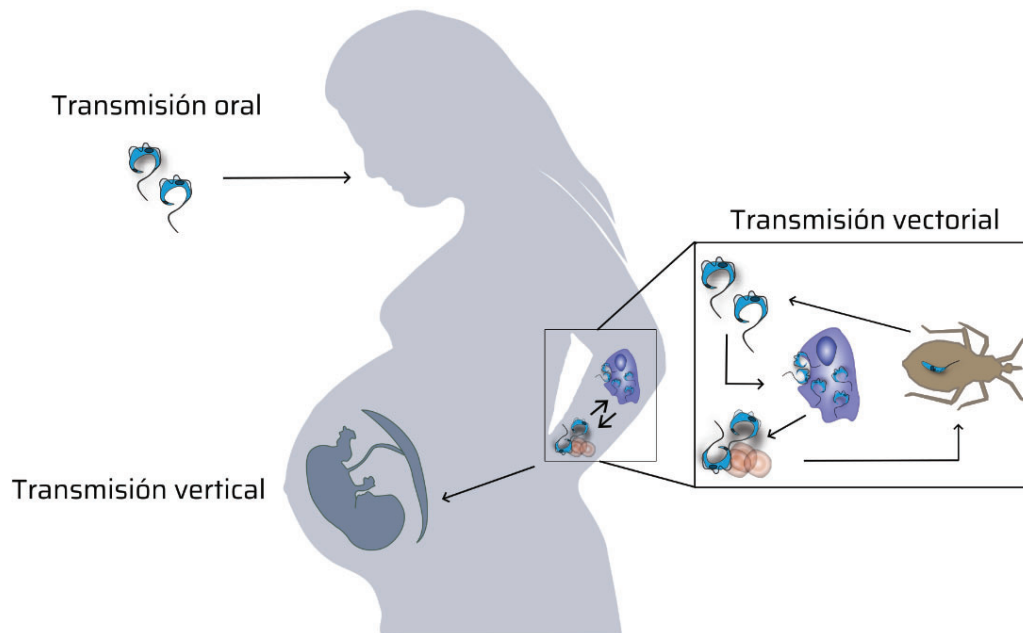


Figura 12: Vías de transmisión más frecuentes de *T. cruzi*. Adaptado de [14].

En ausencia de tratamiento con drogas tripanocidas, los pacientes evolucionan hacia una fase crónica de la enfermedad, y aproximadamente un 30-40% de ellos terminan desarrollando, tras años o décadas de la infección inicial, patologías distintivas que causan graves alteraciones en los tejidos afectados [8,15,16]. La fase crónica de la enfermedad de Chagas está caracterizada por baja o nula parasitemia, lo que dificulta la detección directa del parásito en sangre periférica. El parásito se localiza preferentemente en el músculo cardíaco y el tracto digestivo, donde puede causar daños severos debido a la respuesta inflamatoria y la fibrosis resultante. La cardiomiopatía es la manifestación más grave de la enfermedad crónica y es una de las principales causas de insuficiencia cardíaca en las regiones endémicas. Los pacientes pueden presentar arritmias, agrandamiento del corazón, insuficiencia cardíaca congestiva, y en casos más avanzados, la muerte súbita [12,17]. En cuanto a las afecciones gastrointestinales, hay una tendencia hacia el desarrollo de megacolon o megaesófago, lo que causa severas alteraciones en la motilidad intestinal y esofágica de los pacientes, que resulta en una dificultad para comer o evacuar [12,17,18]. A pesar de los avances en el conocimiento sobre la biología y los mecanismos de patogénesis del parásito, los tratamientos actuales para la enfermedad de Chagas presentan una performance subóptima, especialmente en la fase crónica y son muy difíciles de evaluar en cuanto a su eficacia terapéutica. Además, pueden presentar efectos adversos severos y están contraindicados en mujeres embarazadas y personas con insuficiencia renal o hepática [12]. Por otro lado, no existe una vacuna disponible para prevenir la infección con *T. cruzi* en

humanos y/o para ayudar a la progresión clínica de los pacientes. En este contexto, la investigación sobre nuevas terapias, métodos de diagnóstico y estrategias de control de la transmisión sigue siendo una prioridad en el combate contra esta enfermedad [3,12,17,18].

Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Durante la fase aguda, los métodos diagnósticos se centran en la detección directa del parásito en sangre. La observación de tripomastigotes mediante microscopía sigue siendo el método más usado y confiable en esta etapa. Otros métodos convencionales, como la técnica de Strout, el micro-hematocrito, y las técnicas de gota gruesa, se basan en la concentración de sangre para facilitar la visualización del parásito (Tabla S1). También existen los métodos parasitológicos de amplificación *in vitro* (hemocultivo), que consisten en cultivar muestras de sangre en medios específicos para favorecer el crecimiento del parásito, y los métodos de amplificación *in vivo* (xenodiagnóstico), que requieren de la exposición de insectos vectores no infectados a la sangre del paciente para evaluar la presencia del parásito en sus intestinos. Estos métodos, aunque efectivos en la fase aguda, dependen de personal calificado y equipo adecuado para su correcta implementación y no son aplicables en ciertas situaciones epidemiológicas [12]. Por otro lado, las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han demostrado una alta sensibilidad, especialmente cuando se amplifican regiones de ADN del kinetoplasto (kDNA), lo que permite detectar incluso bajas cargas parasitarias en sangre debido a su alto número de copias en contraste a otros blancos de DNA nuclear [19]. Estos métodos muestran una elevada especificidad, y son particularmente útiles en escenarios con alta carga parasitaria en sangre, como es el caso de infecciones agudas, reactivación de la enfermedad por inmunosupresión o fallas terapéuticas (Tabla S1). Sin embargo, su aplicación rutinaria en el diagnóstico clínico es limitada debido a su complejidad, elevados costos y el requerimiento de equipos sofisticados y personal altamente capacitado. Asimismo, la performance de los métodos de diagnóstico molecular puede verse aún más comprometida por dificultades técnicas relacionadas con el transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras clínicas [20].

En la fase crónica, donde la parasitemia es baja o nula, los métodos parasitológicos y moleculares tienen una sensibilidad significativamente reducida. En consecuencia, el diagnóstico durante esta fase se basa principalmente en métodos serológicos que detectan la presencia de anticuerpos contra antígenos de *T. cruzi*. Los métodos serológicos más utilizados incluyen la hemaglutinación indirecta (IHA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y, sobre todo, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Tabla S1). La técnica de IHA emplea glóbulos rojos sensibilizados con antígenos de *T. cruzi*, los cuales se aglutinan en presencia de anticuerpos específicos contra el parásito. Por otro lado, en la técnica de IFI, los anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en la muestra se unen a preparaciones de parásitos, usualmente tripomastigotes cultivados *in vitro*. Posteriormente, se utiliza un

anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo que permite su visualización. En el caso del ELISA, se utiliza un 'lisado' (extracto crudo) de parásitos como antígeno para sensibilizar los pocillos. Los anticuerpos presentes en el suero se unen a estos antígenos y, posteriormente, se emplean anticuerpos secundarios marcados para cuantificar la reacción. El desarrollo de las técnicas de clonado, biología molecular y síntesis química permitió la creación de métodos diagnósticos de segunda generación, basados en antígenos definidos, tales como proteínas recombinantes o péptidos sintéticos, en lugar de extractos completos de parásitos. Aunque estos métodos tienen una sensibilidad algo menor, ofrecen una especificidad considerablemente mayor, ya que minimizan el reconocimiento cruzado de anticuerpos en casos de infecciones con patógenos relacionados o patologías autoinmunes [14]. Los ensayos de ELISA, tanto de primera como de segunda generación, son altamente utilizados en entornos diagnósticos debido a su simplicidad, bajo costo, buena performance, automatización y alta procesividad (permiten procesar múltiples muestras en simultáneo) [21]. Como contrapartida, debe mencionarse que los métodos de diagnóstico serológico presentan algunas limitaciones respecto a su reproducibilidad en distintas zonas endémicas (atribuibles a variaciones en la constitución antigénica de los parásitos circulantes, ver debajo) y a su aplicabilidad en ciertas situaciones epidemiológicas, particularmente la detección de infecciones congénitas [12].

Avances recientes en el área del diagnóstico han permitido el desarrollo de nuevas herramientas basadas en tecnologías innovadoras tales como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que ofrece la posibilidad de un diagnóstico rápido y eficaz en áreas de bajos recursos, reduciendo los costos y la necesidad de equipos sofisticados [22,23]. Sin embargo, aún no se ha desarrollado un ensayo diagnóstico que sea totalmente conveniente en términos de sensibilidad, especificidad y simplicidad/practicidad técnica, de modo tal que la Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de al menos dos pruebas en paralelo para el diagnóstico de la enfermedad, como ELISA y HAI o IFI [24]. En definitiva, las limitaciones intrínsecas de los métodos actuales y la ausencia de un test '*gold standard*' (Tabla S1), remarca la importancia de continuar con el desarrollo y refinamiento de las herramientas diagnósticas para la enfermedad de Chagas.

Diversidad genética de *T. cruzi*

Debido a su replicación predominantemente clonal [1], *T. cruzi* presenta una población muy estructurada, conformada por múltiples cepas o aislamientos genéticamente diferentes. A lo largo de los años, distintas aproximaciones basadas en técnicas bioquímicas y moleculares han permitido la clasificación de estas cepas en seis linajes evolutivos o unidades discretas de tipificación (DTUs), denominadas TcI a TcVI, con una séptima DTU, recientemente descrita y asociada mayormente a murciélagos, denominada TcBat [25,26].

Cada una de las DTUs del parásito tiene características específicas relacionadas con su distribución ecológica (espectro de vertebrados hospedadores y/o insectos vectores) y

geográfica (Fig I3A). TcI es la más prevalente en infecciones humanas en América del Norte, Central y el norte de Sudamérica (Fig I3B), tanto en ciclos domésticos como selváticos, mientras que TcII, también de origen ancestral, se encuentra principalmente en el sur de Sudamérica (sur de Brasil y Bolivia, Paraguay, y norte de Argentina y Chile, Fig I3C) y está mayormente asociada con ciclos domésticos [27,28]. Las DTUs TcIII y TcIV están más comúnmente vinculadas con ciclos selváticos en la región amazónica [29] (Fig I3D y E), mientras que las TcV y TcVI, que son producto de la hibridación reciente entre TcII y TcIII, están distribuidas principalmente en ciclos domésticos de Bolivia, Paraguay, el norte de Argentina y el sur de Brasil [29–32] (Fig I3F y G).

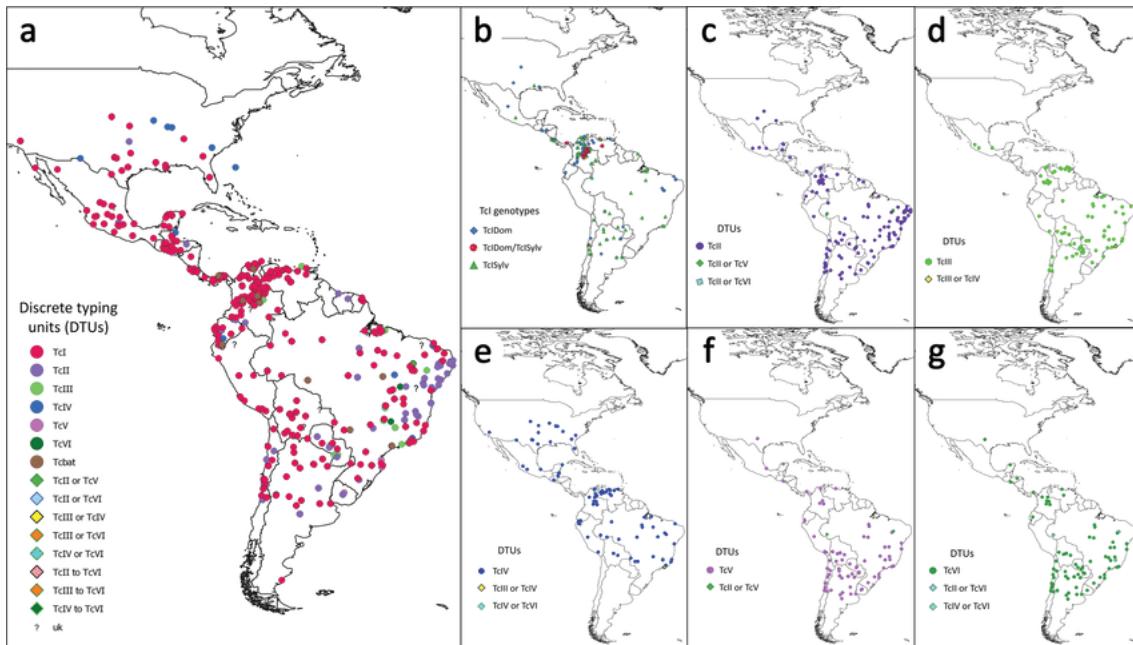


Figura I3: Distribución de *T. cruzi* en América. A. Mapa consenso que compila la distribución de las distintas DTUs de *T. cruzi* en base a hallazgos epidemiológicos y clínicos. B-G. Distribución de TcI (B), TcII (C), TcIII (D), TcIV (E), TcV (F) y TcVI (G). Extraído de [32].

La identificación y caracterización de las DTUs de *T. cruzi* no sólo tiene valor epidemiológico, para relevar los genotipos circulando en zonas endémicas, sino también en términos de investigación clínica y terapéutica, ya que la sensibilidad de las cepas a las drogas tripanocidas es variable [33]. Asimismo, otros parámetros biológicos/clínicos relevantes como la capacidad de colonizar al insecto vector, la invasión y multiplicación intracelular *in vitro*, al igual que la parasitemia, el tropismo tisular y la virulencia en modelos animales de infección, han mostrado variaciones dependiendo del linaje evolutivo del parásito [34–36]. Más aún, se ha sugerido que las variaciones genotípicas de *T. cruzi* también podrían impactar en la evolución clínica de los pacientes. Por ejemplo, se ha observado que TcII, TcV y TcVI están más frecuentemente asociados con cardiomiopatías y mega síndromes digestivos durante la fase crónica de la enfermedad [36]. Sin embargo, debe

mencionarse que estos estudios de correlación entre el genotipo del parásito y la presentación clínica suelen tener deficiencias metodológicas y pueden estar sesgados por otros factores no considerados como la coinfección con otros patógenos y/o las diferencias inmunogenéticas entre poblaciones [37].

Tipificación de *T. cruzi*

La genotipificación de *T. cruzi* se basa en el empleo de diversas técnicas moleculares que exploran la complejidad del genoma del parásito: Electroforesis enzimática multilocus (mLEE), Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), PCR y más recientemente, la secuenciación basada en múltiples *loci* [38]. Estos métodos permiten una diferenciación precisa entre los distintos linajes y son fundamentales para la investigación epidemiológica y clínica, ya que aportan información detallada sobre la distribución y prevalencia de los linajes en diferentes regiones, su dinámica de transmisión y sus posibles asociaciones con diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad. Asimismo, el uso de técnicas como la amplificación aleatoria de ADN polimórfico por PCR (RAPD) y la secuenciación de ADN mitocondrial (kDNA) y nuclear han permitido estudiar la variabilidad genética en profundidad, revelando la coexistencia de múltiples cepas en un mismo huésped y la prevalencia de los DTUs en distintos ambientes y ciclos de transmisión [38,39].

Los métodos de genotipificación han incrementado la resolución en la identificación de cepas, aunque todavía presentan desafíos importantes en términos de sensibilidad y especificidad al ser implementados *in vivo*, sobre todo en la fase crónica de la infección, donde la parasitemia es muy baja [38–40]. Además, el proceso de genotipificación suele ser costoso, laborioso y requiere una infraestructura técnica que a menudo no está disponible en áreas endémicas [14]. La frecuente presencia de coinfecciones con distintas cepas [28] y la diferencia en los genotipos presentes en el torrente sanguíneo frente a aquellos presentes en distintos tejidos, añaden complejidad a la tipificación molecular de *T. cruzi in vivo* [41,42].

Las limitaciones de los métodos de genotipificación de *T. cruzi* han llevado a considerar métodos alternativos, como la serotipificación, que podrían complementar o incluso reemplazar la genotipificación en ciertos contextos epidemiológicos y clínicos [14]. La serotipificación ofrece un enfoque menos invasivo y de fácil implementación aún en contextos donde la genotipificación no es viable [12,43]. Este método se basa en el uso de antígenos específicos del parásito, que inducen respuestas inmunes cuali- o cuantitativamente diferenciales en los huéspedes infectados. Los perfiles de anticuerpos resultantes pueden ser utilizados para inferir el linaje del parásito presente en el paciente [14]. En términos más amplios, los métodos de tipificación serológica se han desarrollado exitosamente y tienen una gran aplicación en el contexto del diagnóstico de enfermedades infecciosas [43–49].

Entre los métodos de serotipificación propuestos para *T. cruzi*, debe mencionarse el Chagas-Flow ATE, basado en la evaluación comparativa de las respuestas globales de inmunoglobulinas G (IgG) contra cepas representativas de los distintos linajes [50,51]. Las mayores limitantes del Chagas-Flow ATE vienen dadas por el uso de parásitos enteros como antígenos, lo que favorece la detección de reactividades inespecíficas y dificulta la reproducibilidad del ensayo.

TSSA: Características y potencial para serotipificación

Desde su identificación en 2002 [52], TSSA ha sido ampliamente estudiado debido a su relevancia en la inducción de respuestas inmunes en pacientes infectados con *T. cruzi*. TSSA es una proteína de adhesión de tripomastigotes de *T. cruzi*, con características similares a las de las mucinas [53], involucrada en la interacción inicial del parásito con la célula blanco [54,55]. Estudios de mapeo epitópico han permitido identificar una región antigénica de aproximadamente 40 residuos que abarca la mayor parte de la región central (y madura o 'core') de la proteína (Fig I4) [52,56,57]. Más interesante, los alelos poblacionales de TSSA presentan varios polimorfismos diagnósticos que permiten su clasificación en cuatro "isoformas", cada una correspondiente a una unidad de tipificación discreta (DTU) ancestral (TcI a TcIV) [52–58]. La mayoría de estos polimorfismos se acumulan en la región central de TSSA y tienen un impacto significativo en sus propiedades antigénicas y funcionales [52,56,57]. En general, se han definido cuatro serotipos principales para TSSA: TSSAI (TcI), TSSAII (TcII), TSSAIII (TcIII) y TSSAIV (TcIV). Cabe destacar que, al ser híbridos, los genomas de TcV y TcVI codifican tanto para las isoformas TSSAII como TSSAIII, aunque el dosaje génico es muy desigual (10-14 copias de TSSAII vs 1 copia de TSSAIII) [59].

Con el fin de explorar potencialidad de TSSA como marcador de serotipificación de *T. cruzi*, Di Noia y colaboradores llevaron a cabo un estudio utilizando péptidos de 8 a 11 residuos, solapados en 5 aa, para identificar las secuencias antigénicas más inmunorreactivas en TSSAII [52]. Este análisis reveló una secuencia principal (41-KPATGEAPSQ-50) y dos secuencias de menores reactividades (30-TSSTPPSGTEN-40 y 36-SGTENKPATG-45) como puntos de interés antigénico dentro de TSSAII. Por otro lado, se evaluó la seroprevalencia de proteínas recombinantes conteniendo los residuos 10 a 71 de TSSAI y TSSAII (GST-TSSAI/II¹⁰⁻⁷¹, Fig. I4) en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica y animales infectados con *T. cruzi*, y se determinó una seroprevalencia del 80-95% para TSSAII y menos del 5% para TSSAI en regiones endémicas del sur de Sudamérica [52]. Posteriormente, De Marchi *et al.* repitieron este estudio pero utilizando proteínas de fusión conteniendo secuencias de TSSA más cortas (GST-TSSAI/II²⁴⁻⁶², Fig.I4). Se determinaron seroprevalencias similares a las observadas para las construcciones GST-TSSAI/II¹⁰⁻⁷¹, de modo tal que se pudo acotar la región antigénica de TSSA a los residuos 24-62. En este estudio, además, se evaluó la especificidad de GST-TSSAI/II²⁴⁻⁶² frente a un extenso panel de

sueros provenientes de individuos infectados con diversos patógenos y/o afectados por distintas enfermedades autoinmunes [60].

Un avance importante fue realizado por el grupo del Dr Fernan Aguero (IIBio) [61], al emplear arreglos peptídicos de alta densidad para el mapeo exhaustivo de epitopes B lineales a lo largo de toda la secuencia de TSSAII [56]. En base al análisis de los resultados de este trabajo y de otros ensayos relacionados [57], se confirmaron dos secuencias clave (p^{30-44} : 30-TSSTPPSGTENKPAT-44 y p^{36-50} : 36-SGTENKPATGEAPSQ-50, Fig. I4) como las de mayor reactividad frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica provenientes de la región sur de Sudamérica, sugiriendo la existencia de al menos 2 epitopes B lineales discretos [57] (Fig I4). El desarrollo de un péptido sintético combinando estas dos secuencias antigénicas, p^{30-50} (Fig. I4), logró recapitular las propiedades diagnósticas de la proteína recombinante GST-TSSAII²⁴⁻⁶², indicando que la secuencia comprendida entre los residuos 30 y 50 contenía todos los epitopes B lineales relevantes [57]. La elevada seroprevalencia de p^{30-50} en sueros de Argentina, Brasil, Bolivia y Chile coinciden con la marcada predominancia de las DTUs TcII/V/VI en los ciclos domésticos de esta región [62–66].



Figura I4: TSSA y diagnóstico serológico de la infección por T. cruzi. A. Alineamiento de las isoformas de TSSA detectadas para cada DTU. Las posiciones variables intra-DTU e inter-DTU se marcan en rojo y verde, respectivamente. En celeste se marcan aquellos sitios en supuesta heterocigosis en las DTU híbridas. Se indican las tres regiones estructurales de TSSA (péptido señal, con su sitio de clivaje, core o proteína madura y señal de anclaje a GPI, con su residuo aceptor del motivo lipídico) de acuerdo a [53]. **B.** Reactivos serodiagnósticos basados en TSSA. Se detallan las secuencias utilizadas para el desarrollo de herramientas diagnósticas y/o de serotipificación y sus respectivas fuentes. Adaptado de [67].

En el marco de la Tesis Doctoral de Guadalupe Romer, se realizó un análisis exhaustivo del perfil serológico de las isoformas de TSSA utilizando distintas estrategias basadas en

microarreglos peptídicos [68]. Se evaluaron sueros obtenidos de pacientes con enfermedad de Chagas de distintas áreas geográficas (donde estudios epidemiológicos indicaban que había circulación de diferentes genotipos del parásito), y se determinó que para sueros de pacientes de la región sur de Sudamérica, TSSA resultaba un antígeno muy prevalente y que la reactividad principal era contra TSSAII (Fig I5) [68]. Además, se observó un reconocimiento mínimo de TSSAI en estos sueros, concordante con la bibliografía previa [69] (Fig I5A). Más importante, estos resultados evidenciaron una tendencia al reconocimiento cruzado de isoformas por un mismo suero (Fig, I5B), lo que resaltó la necesidad de refinar las herramientas de serotipificación basadas en TSSA [68].

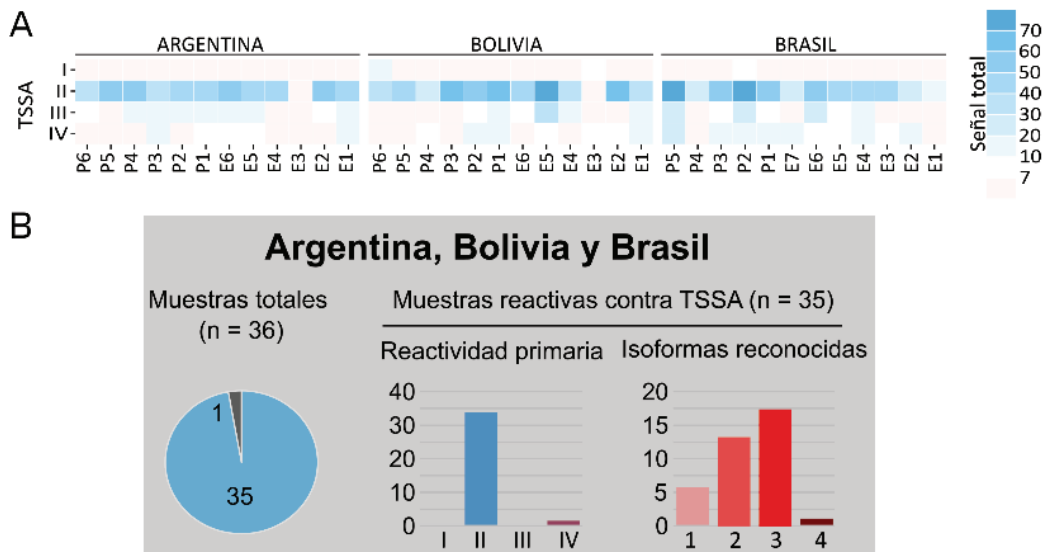


Figura 15: Análisis seroepidemiológico de TSSA. A. Arreglos compuestos por péptidos consecutivos de 16 aa de las secuencias completas de las TSSA se probaron con muestras de sueros de pacientes crónicos con enfermedad de Chagas de distintos orígenes geográficos. La reactividad de las proteínas completas (reconstituida a partir de las reactividades de los péptidos individuales) se indica de acuerdo a una escala de colores. **B. i.** Gráfico de torta mostrando la seroprevalencia total de TSSA en sueros de Argentina, Bolivia y Brasil. **ii.** Gráfico de barras mostrando la reactividad primaria (isoforma de TSSA más reactiva) de la población de sueros estudiada. **iii.** Gráfico de barras representando el número de isoformas de TSSA reconocidas por los sueros reactivos. El eje Y refiere al número de muestras. Adaptado de [68].

En una segunda parte del trabajo, y mediante la evaluación de péptidos conteniendo las variaciones naturales entre isoformas (Fig I6A), permutaciones sistemáticas de todas las posiciones por residuos alanina (Fig I6B) y diferentes longitudes (Fig I6C), se identificaron residuos clave involucrados en el reconocimiento de anticuerpos y se estimó la contribución de cada uno de ellos en la reactividad de TSSAII. Más importante, la integración de estos resultados permitió proponer de manera más robusta la existencia de dos potenciales epítopes (llamados A y B) en TSSAII, de localización adyacente (Fig I6D) [68]. Aunque minoritario, también se propuso un tercer epítope, restringido a unos pocos

sueros de Brasil (Fig I6C) [68]. Todos estos hallazgos, sobre todo los referidos a los epitopes A y B, tienen implicancias prácticas para el refinamiento de estrategias de serotipificación de *T. cruzi*.

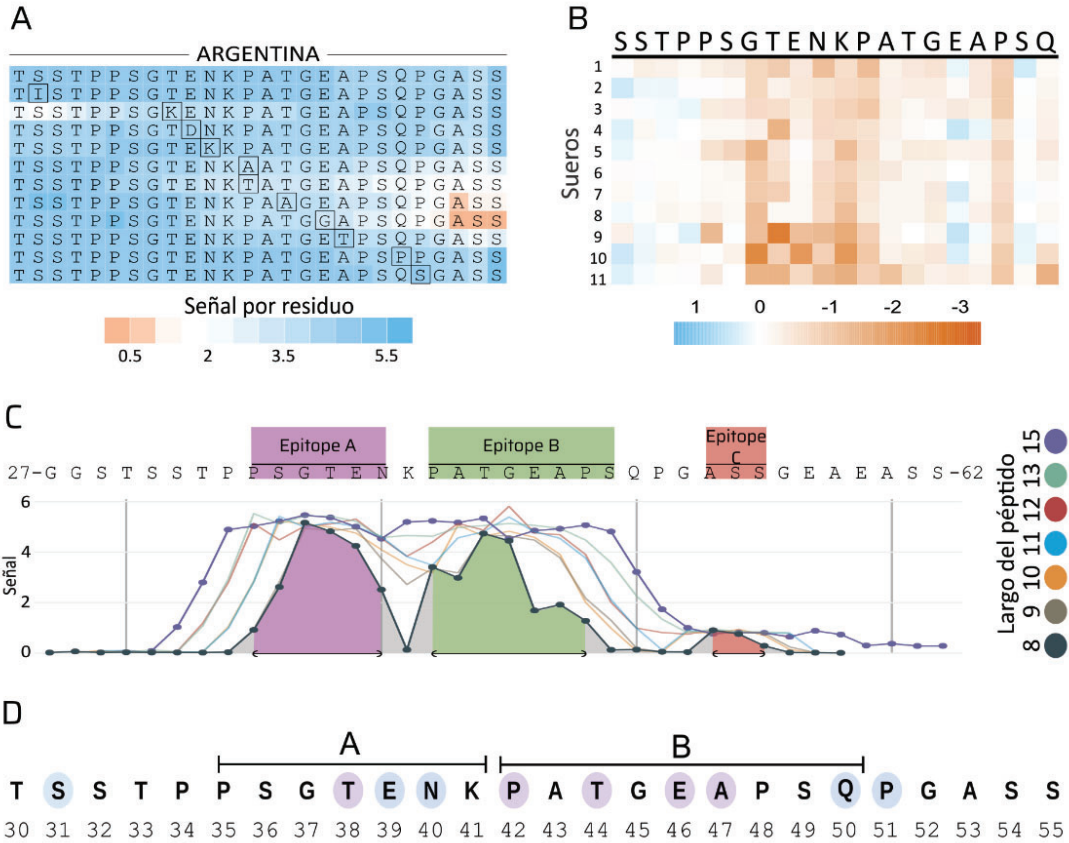


Figura I6: Mapeo de epitopes B lineales en TSSAII. A. Impacto de variaciones naturales en el reconocimiento de anticuerpos. La reactividad media de cada residuo en la secuencia ‘wild type’ de TSSAII³⁰⁻⁵⁰ (fila superior) o de secuencias con sustituciones individuales se indica con una escala de colores. **B.** Análisis de la reactividad de TSSAII³¹⁻⁵⁰ con sustituciones simples por alanina. La señal es la diferencia entre la secuencia wt y la mutada, indicada con una escala de colores. Para este análisis se usaron péptidos de 16 aa solapados en 15 posiciones. **C.** Impacto del largo de secuencias en el reconocimiento de anticuerpos. Se probaron arreglos de péptidos de distinto largo (*k*-meros, los colores según su largo se indican a la izquierda), superpuestos por *k*-1 residuos y que abarcan la secuencia de TSSAII²⁴⁻⁶² con pools de sueros de pacientes infectados con *T. cruzi*. Los residuos incluidos en los epitopes A y B definidos por los arreglos de péptidos de 8 aa se indican en violeta y verde, respectivamente. El epítipo C (en rojo) fue destacado únicamente por el pool de sueros de Brasil. **D.** Epitopes A y B propuestos para TSSAII basados en los resultados de A, B y C. Los residuos coloreados indican mayor (rosa) o menor (celeste) contribución a la interacción con los anticuerpos. Adaptado de [68].

Objetivos

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue el desarrollo de nuevos reactivos diagnósticos que ayuden a optimizar el esquema de serotipificación de *T. cruzi* basado en TSSA. En ese marco, y teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, proponemos validar la existencia de los epitopes putativos de TSSA y explorar sus propiedades serodiagnósticas a través de los siguientes objetivos específicos (OE) :

OE1- Desarrollo de nuevos reactivos diagnósticos basados en TSSA, con distinta configuración epítópica.

OE2- Evaluación de las firmas de anticuerpos reveladas por estas herramientas en muestras de pacientes infectados con *T. cruzi*.

Materiales y Métodos

Diseño de los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp

Los plásmidos conteniendo las secuencias de las isoformas de TSSA fueron diseñados *in silico*, utilizando la herramienta *online* Benchling [70] de acuerdo a los criterios detallados en 'Resultados' y mandados a sintetizar a la empresa GenScript [71]. La empresa llevó a cabo la síntesis de un fragmento de ADN de 143 pb conteniendo la secuencia de los epítopes A y B de TSSAII (Fig 16), con un residuo extra hacia cada extremo. Además, los epítopes fueron intercalados por un espaciador molecular (Sp). Para una mayor versatilidad, dentro de este espaciador se agregó un sitio de restricción único para la enzima KpnI, con el propósito de, eventualmente y dependiendo de los resultados, clonar otra secuencia de interés (por ej, una etiqueta antigénica u otro espaciador). Dicho constructo fue clonado en fase de fusión traduccional a la proteína GST codificada en el vector pGEX-4T-1, empleando los sitios de restricción BamHI/XhoI para generar el plásmido pGEX-TSSAII-Sp (Fig S1). Sobre este plásmido, la misma empresa realizó dos procesos de mutagénesis independientes sobre la secuencia de los epítopes A y B para generar las variantes pGEX-TSSAIII-Sp y pGEX-TSSAIV-Sp. Más detalles de la estructura y secuencia de estos tres plásmidos se indican en la Tabla 1. Cabe aclarar que no se realizó la optimización de codones para estas secuencias. Además de estos plásmidos, y de los generados en el laboratorio a partir de ellos (ver debajo), en este trabajo se utilizaron 3 plásmidos del tipo pGEX-4T-1 con las secuencias codificantes para las regiones centrales y antigénicas completas (aa 24-62) de las TSSAII, III y IV, generados previamente en el contexto de la Tesis Doctoral de Guadalupe Romer [68].

Tabla 1: Construcciones pGEX-TSSAII-Sp, pGEX-TSSAIII-Sp y pGEX-TSSAIV-Sp

Plásmido	Construcción	Secuencia y estructura
	TSSAII-Sp	GGATCC ACGCCACCTTCTGGTACGGAAAAATAAACCA GAATTC GGCGGCGC GCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGC GGTACC GGGCGGC GGATCC AAACCA GCTACAGGGGAAGCTCCATCTCAA CCAT GAATTC TGAACTCGAG
pGEX-4T-1	TSSAIII-Sp	GGATCC ACGCCACCTTCTGGTACGGAGAAGAAAGCA GAATTC GGCGGCGC GGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGC GGTACC GGCGGCGGC GGATCC AAA GCAGCTGCAGGGGAAGCTCCA TCTCCATCTT GAATTC TGAACTCGAG
	TSSAIV-Sp	GGATCC ACGCCACCTTCTGGTACGGACAAGAAAACA GAATTC GGCGGCGC GGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGC GGTACC GGCGGCGGC GGATCC AAA ACAGCTGCAGGGGAAGCTCCAT CTCCATCTT GAATTC TGAACTCGAG

Se indican los sitios de restricción BamHI (naranja), EcoRI (rojo), KpnI (amarillo) y XhoI (negro). En azul se indica la secuencia del epítipo II-A, en celeste II-B, en verde oscuro III-A, en verde claro III-B, en violeta oscuro IV-A y en violeta claro IV-B. La secuencia del espaciador molecular se encuentra subrayada.

Generación de los plásmidos pGEX-TSSAIIA y B, -TSSAIII-A y B y -TSSAIV-A y B

Para generar las construcciones conteniendo los epitopes individuales de cada isoforma, los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp fueron tratados con dos enzimas de restricción de forma independiente: EcoRI, para obtener los plásmidos con los constructos conteniendo al epitope A (pGEX-TSSAII-A, -TSSAIII-A y -TSSAIV-A) y BamHI, para obtener plásmidos con los constructos conteniendo al epitope B (pGEX-TSSAII-B, -TSSAIII-B y -TSSAIV-B). El protocolo de digestión constó en el agregado de 20 µg del plásmido, 5 µL de buffer de reacción 10x, 1 µL de enzima BamHI o EcoRI (20.000 U/mL) y I, e incubación a 37°C en termobloque por 2 hs. Los plásmidos digeridos fueron precipitados mediante el agregado de 5.5 µL de AcNa 3M y 3 volúmenes de EtOH absoluto e incubación durante 3 hs a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C. Después de descartar el sobrenadante, se lavó el pellet con 750 µL de EtOH al 70% (v/v) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 min a 4°C. Se descartó nuevamente el sobrenadante, se secó el pellet en una estufa durante 10-15 min y se resuspendió el pellet en 20 µL de H₂O [72]. La digestión de los plásmidos se evaluó por corrida electroforética en geles de agarosa 1% (m/v) pre-teñidos con BrEt y visualización bajo luz UV. Para la re-ligación de los plásmidos digeridos, se agregó 1 µL de buffer de ligación, 1 µL de T4 ADN ligasa, 30 ng de ADN y H₂O c.s.p 10 µL, y se incubó durante toda la noche (ON) a 16°C [73]. Con los productos de ligación se transformaron bacterias *Escherichia coli* competentes de la cepa DH5α [74]. Brevemente, se agregaron 5 µL del producto de ligación a 100 µL de bacterias competentes y se incubó en hielo durante 10 min. Se realizó un choque térmico exponiendo el cultivo a 42°C durante 90 segundos y luego enfriando en hielo por 2 min. Se añadieron 900 µL de medio LB sin antibióticos y se dejó recuperar a 37°C durante 1 h. Por último, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min, se extrajo la mayor parte del LB, se resuspendió el pellet bacteriano en el volumen residual y se plaqueó en medio LB-agar con ampicilina (Amp, 1 µg/mL final).

Identificación de los clones positivos y purificación de los plásmidos

Se realizó 'colony PCR' sobre colonias de las distintas placas, utilizando los oligonucleotidos pGEXfw (GGCAAGCCACGTTTGGTG) y pGEXrev (CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG) que hibridan a ambos lados de la región del MCS (*multiple cloning site*) del vector pGEX-4T-1, común a todas las construcciones (Tabla 1). La mezcla de reacción utilizada fue: 1 µL de una dilución 1/10 de los oligonucleótidos pGEXfw y pGEXrev (1 µM cada uno), 5 µL del buffer de reacción 10x, 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de cada dNTP, 1 µL de Taq Polimerasa, y H₂O c.s.p 50 µL. Se picó una colonia, se descargó en una placa de LB-agar con Amp 1 µg/mL y, luego, en el tubo conteniendo la mezcla de reacción [75]. Los amplicones se resolvieron en geles de agarosa al 1.5% (m/v), y aquellas colonias presentando el patrón de bandeo deseado fueron amplificadas en 10 mL de cultivo líquido (LB Amp). A partir de los cultivos líquidos crecidos ON a 37°C en agitación se llevó a cabo el protocolo de Miniprep. Brevemente, se centrifugaron los cultivos líquidos a 4.000 rpm durante 10 min y se descartaron los sobrenadantes. A los pellets bacterianos se les agregaron 300 µL de P1 (Buffer TE, Tris-HCl

10 mM-EDTA 1 mM, pH 8), se vortexeó, se agregaron 300 μ L de P2 (Solución de lisis, NaOH 0,2M y SDS 1% (m/v)) y se mezcló por inversión. Después de 6-8 inversiones, se añadieron 200 μ L de P3 (AcK 3M pH 5.5), se homogeneizó bien y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. Al sobrenadante se agregaron 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (vol/vol), se vortexeó y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min. Se tomó la capa superior (acuosa) y se añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol. Se vortexeó y se colocó en hielo durante 10 min. Después de centrifugar a 14.000 rpm durante 30 min y descartar el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 μ L de EtOH al 70% (v/v), se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se secó el pellet en estufa durante 10-15 min y se resuspendió en 30 μ L de H₂O. Para la eliminación de ARN, se agregaron 5 μ L de RNAsa (0,8 mM) además 15 μ L de H₂O. Los plásmidos así tratados fueron precipitados por el agregado de 40 μ L de polietilenglicol 13% (m/v) y 8 μ L de NaCl (0,8 M). Tras la incubación (20 min en hielo) y centrifugación (20 min a 14.000 rpm), el ADN precipitado se resuspendió en 20 μ L de buffer TE. Alícuotas de estas preparaciones fueron enviadas a secuenciar (Macrogen), utilizando los oligonucleótidos pGEXfw y pGEXrev. Los cromatogramas se chequearon manualmente, para confirmar la identidad de las secuencias obtenidas.

Expresión de proteínas recombinantes

Se transformaron bacterias *E. coli* competentes de la cepa BL21 con los plásmidos purificados [74]. Esta cepa se caracteriza por la ausencia del sistema de proteasas lon y ompT, lo que facilita la acumulación de proteínas recombinantes al minimizar su degradación [76]. A partir de colonias individuales, se largaron cultivos de 10 mL en medio LB Amp. Luego de la incubación ON a 37°C en agitación, 2 mL de estos cultivos fueron usados como 'starter' para inocular 250 mL de medio LB Amp. Luego de ~3 hs de incubación en agitación, cuando se alcanzó una OD (600 nm) = 0.8, se indujo la expresión de proteínas recombinantes mediante la adición de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 1 mM) por 3 h, en las mismas condiciones de temperatura y agitación (37°C a 180 rpm). Los cultivos se cosecharon por centrifugación (4.000 rpm x 10 min, a 4°C) y los pellets se lavaron con PBS (buffer fosfato salino: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) pre-enfriado a 4°C. Los pellets se resuspendieron en 8 mL de PBS frío, con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 2 mM) y Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA, 5 μ M), se los sonicó con 4 pulsos de 30 segundos en frío, se les agregó Tritón X-100 (hasta 1% (v/v) final) y se los incubó en frío por 10 min. Alícuotas de los extractos totales se resolvieron en geles SDS-PAGE (10-12%) en condiciones desnaturalizantes, los cuales fueron luego teñidos con Coomassie brilliant blue (CBB, 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 30% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético glacial). Para la preparación de los mismos se preparan dos fases de gel: el gel separador y el gel concentrador. Para el gel separador, se mezclan 5,1 mL de agua, 8 mL de acrilamida al 30%, 7,5 mL de buffer Tris-HCl 1 M (Tris-hidroximetil-aminometano 100 mM, HCl, pH 8,8), 200 μ L de SDS al 10% (m/v), 200 μ L de sulfato de amonio (APS) al 10% (m/v), y 8 μ L de N,N,N',N' -Tetrametiletildiamina (TEMED). Para el gel concentrador,

se combinan 4,1 mL de agua, 1 mL de acrilamida al 30%, 750 μ L de buffer Tris-HCl M (pH 6,8), 60 μ L de SDS al 10% (m/v), 60 μ L de APS al 10% (m/v), y 6 μ L de TEMED. Los componentes de cada gel se mezclan por separado, exceptuando los agentes polimerizantes (APS y TEMED), que se añaden inmediatamente antes de verter la mezcla en el porta geles. La mezcla del gel separador se añade primero y se nivela con agua. Luego de la polimerización completa del gel separador, se añade el gel concentrador y se coloca el peine para formar los pocillos. Antes de sembrar, las muestras se desnaturalizan calentándose a 100°C durante 5 min en el buffer de corrida 1X (25 mM de Buffer Tris-HCl, 192 mM de glicina y 0,1% (p/v) de SDS, pH 8,3). Al finalizar la corrida, los geles se tiñen con una solución de CBB para observar las bandas de proteínas.

Purificación y caracterización de proteínas recombinantes

Para la purificación de las proteínas recombinantes, los extractos totales de bacterias se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 min y los sobrenadantes se procesaron por cromatografía de afinidad en columnas de glutation-sefarosa [57]. Brevemente, se lavó dos veces 1 mL de resina con 5 mL PBS, se equilibró con 5 mL PBS y posteriormente con 2,5 mL PBS-Tritón 1%. El *binding* de las proteínas a la resina se hizo en 'batch', en agitación y frío. Luego de incubar ON, la mezcla (1 mL de resina + 8 mL de extracto de cultivo bacteriano) se transfirió a una columna, tal cual se indica en la Fig M1. Se recolectó el percolado, y se volvió a lavar la resina con 5 mL PBS-tritón 1% y luego 15 mL PBS. Finalmente, se realizó la elución utilizando 1 mL Tris-HCl 50 mM pH 8,8 + glutatión reducido (GSH) 25 mM (Fig M1).

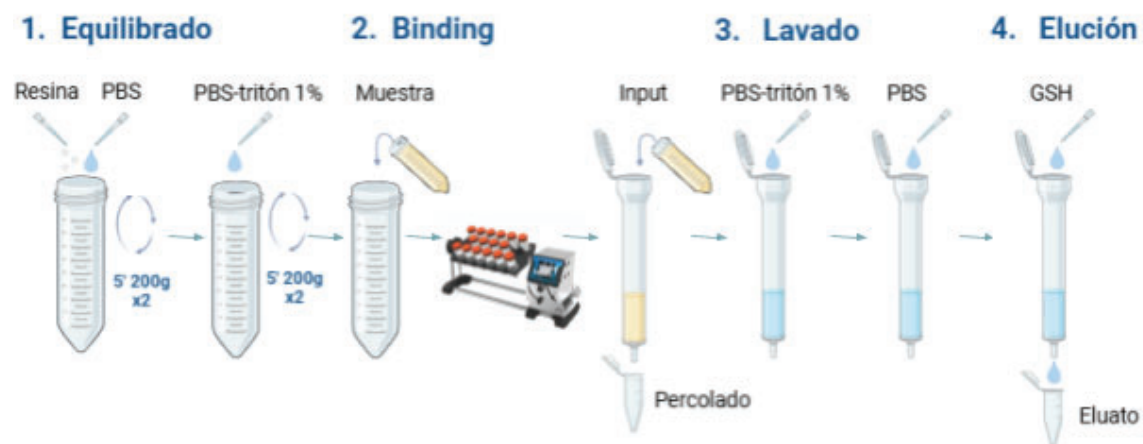


Figura M1: Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad en matriz de glutation-sefarosa. Se indican los pasos equilibrado (1), binding (2), lavado (3) y elución (4) de la resina. Los dos primeros pasos se realizan en 'batch' y los dos últimos en columna.

Alícuotas de las fracciones de *input*, percolado y eluato de la purificación de cada proteína se resolvieron en geles SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y se tiñeron con CBB. La cuantificación de las proteínas purificadas se hizo por métodos espectrofotométricos (NanoDrop) y colorimétricos (Ensayo de Bradford). NanoDrop mide de la absorbancia de

una muestra a 2 longitudes de onda: a 280 nm, donde la señal predominante es debida a los aa aromáticos (triptófano, tirosina) presentes en las proteínas y a 340 nm, para corregir el 'ruido de fondo'. Este método se basa en la ley de Beer-Lambert [77] que relaciona la absorbancia con la concentración de proteínas, permitiendo una cuantificación precisa sin necesidad de reactivos adicionales. La cuantificación de las distintas proteínas usando el equipo de Nanodrop fue realizada teniendo en cuenta el peso molecular y el coeficiente de extinción característico de cada una. El ensayo de Bradford, por otro lado, se basa en la unión del colorante CBB G-250 a las proteínas, lo que genera un cambio de color proporcional a su concentración. Para esto, se prepara una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) diluida en el mismo buffer que las muestras, con concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 µg/mL. Simultáneamente, las muestras de proteína se diluyen de manera que queden dentro del rango de detección del ensayo. Para cada punto de la curva estándar y de las muestras, se añaden 20 µL de la solución de a un pocillo de microplaca. Luego, se agrega reactivo de Bradford (CBB G-250 preparado al 0,01% en ácido fosfórico 85% y etanol 95%) a cada muestra, en una proporción de 1:50 vol/vol. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 10 min para el desarrollo del color y la absorbancia de cada muestra se mide a 595 nm en un lector de microplacas. La concentración de las proteínas se calcula interpolando los valores de absorbancia en la curva estándar de BSA. Los modelados moleculares de las distintas construcciones de TSSA se generaron mediante la herramienta AlphaFold, usando los parámetros seteados por default [78].

Muestras biológicas

Se utilizaron muestras de sueros humanos de infección con *T. cruzi* (n=97), disponibles en nuestra propia seroteca. Estas muestras, cedidas gentilmente por el Dr Jaime Altcheh, del Servicio de Parasitología-Chagas, Hospital de Niños 'Ricardo Gutiérrez', corresponden a pacientes cursando la fase crónica de la enfermedad, sin sintomatología clínica y sin tratamiento con drogas antiparasitarias. Todos estos pacientes son originarios de zonas endémicas del sur de Sudamérica (mayormente de Argentina), ahora residiendo en el AMBA. El diagnóstico de infección con *T. cruzi* de estos pacientes se realizó en el mismo Servicio de Parasitología-Chagas y se basó en resultados positivos para al menos 2 métodos serológicos convencionales: ELISA (contra un homogenato total del parásito), hemaglutinación y/o inmunofluorescencia indirecta (Tabla S1). Muestras de individuos no reactivos para estas técnicas (n=2) se usaron como controles negativos. Todas las muestras fueron previamente codificadas y anonimizadas, siguiendo protocolos establecidos, y en todos los casos se contó con el consentimiento informado para su uso en investigación. Para la experimentación con muestras biológicas, se siguieron los protocolos éticos y de manipulación y descarte de reactivos peligrosos establecidos en el IIBio.

Antígenos

Se utilizaron como antígenos 4 versiones derivadas de TSSAII, TSSAIII y TSSAIV: una 'completa', conteniendo toda la región antigénica de la proteína (aa 24-62) [57,60], una versión conteniendo los epitopes A y B intercalados por un espaciador (TSSAII-Sp, TSSAIII-Sp y TSSAIV-Sp), y dos versiones conteniendo solo el epitope A (aa 34-42, TSSAII-A, TSSAIII-A y TSSAIV-A) o el epitope B (aa 42-50, TSSAII-B, TSSAIII-B y TSSAIV-B), según lo esquematizado para TSSAII en la Fig M2. Todas las construcciones se expresaron como fusión traduccional al C-terminal de GST y se purificaron según lo descrito previamente. Para la puesta a punto de los ELISA, también se evaluó la proteína GST.

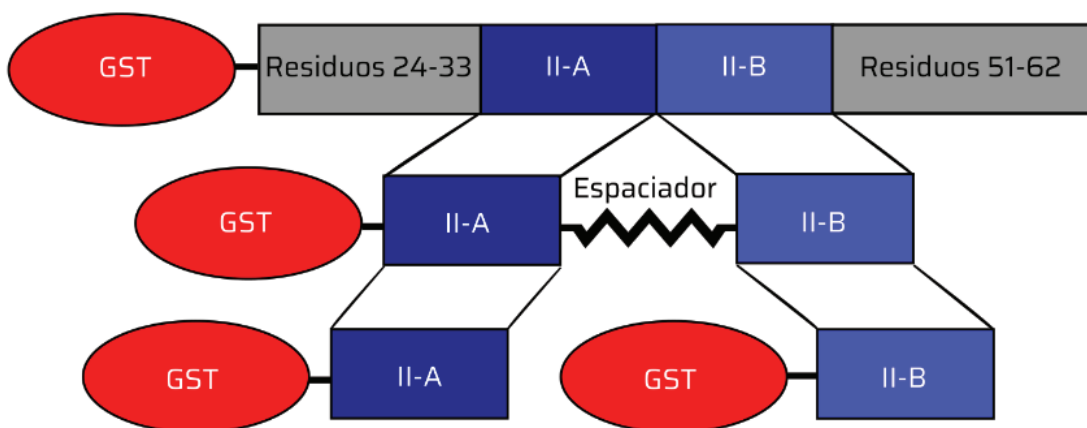


Figura M2: Construcciones derivadas a partir de TSSA. Esquema de las proteínas recombinantes generadas a partir de las distintas TSSA (se ejemplifica para TSSAII): TSSAII 'completa' (aa 24-62), arriba, TSSAII-Sp, en el centro, y TSSAII-A (aa 34-42) y TSSAII-B (aa 42-50), debajo. Los residuos se contabilizaron tomando como 1 la metionina predicha como sitio de iniciación de la traducción [68]

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Un esquema del test de ELISA (y sus pasos principales) se muestra en la Fig M3. Brevemente, se sensibilizaron placas de 384 pocillos con 30 μ L/pocillo del antígeno correspondiente (0,075 μ g totales) en buffer bicarbonato pH 9,6 (8,4 g/L NaHCO₃ 0,1 M + 10,6 g/L Na₂CO₃ 0,1 M) y se incubaron ON a 4°C (Fig M3, paso 1). Al siguiente día se realizaron 3 lavados con PBS suplementado con 0,05% (v/v) Tween 20 (PBS-T) y un bloqueo con 50 μ L/pocillo de PBS-T con 4% (m/v) de leche descremada por 1 h a 37°C. Se incubó con 30 μ L/pocillo de la muestra diluida 1:500 en solución de bloqueo por 1 h a 37°C (Fig M3, paso 2), se realizaron 3 lavados con PBS-T y se incubó por 1 h a 37° con 30 μ L/pocillo del anticuerpo secundario (inmunoglobulinas de cabra α -IgG total humana conjugado a HRP [*horseradish peroxidase*]), diluido 1:2500 en solución de bloqueo (Fig M3, paso 3). Por último, se realizaron 4 lavados con PBS-T y un lavado con PBS. Para el revelado, se adicionaron 30 μ L/pocillo de buffer fosfato-citrato pH 5 con 0,05% (v/v) de peróxido de hidrógeno y 10% (v/v) de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, preparada a 10 mg/mL en dimetilsulfóxido) (Fig M3, paso 4). La reacción fue detenida con 5 μ L de ácido sulfúrico 2 M y la lectura de las placas se

realizó a una longitud de onda de 450 nm (FilterMax F5) (Fig M3, paso 5). A menos que se especifique otra cosa, los resultados se reportan en unidades arbitrarias de absorbancia (U.A.). Para los ensayos realizados en placas de 96 pocillos se utilizaron las mismas condiciones, aunque aumentando los volúmenes según lo requerido por la placa. Como control negativo, se utilizaron sueros de individuos no infectados con *T. cruzi*.

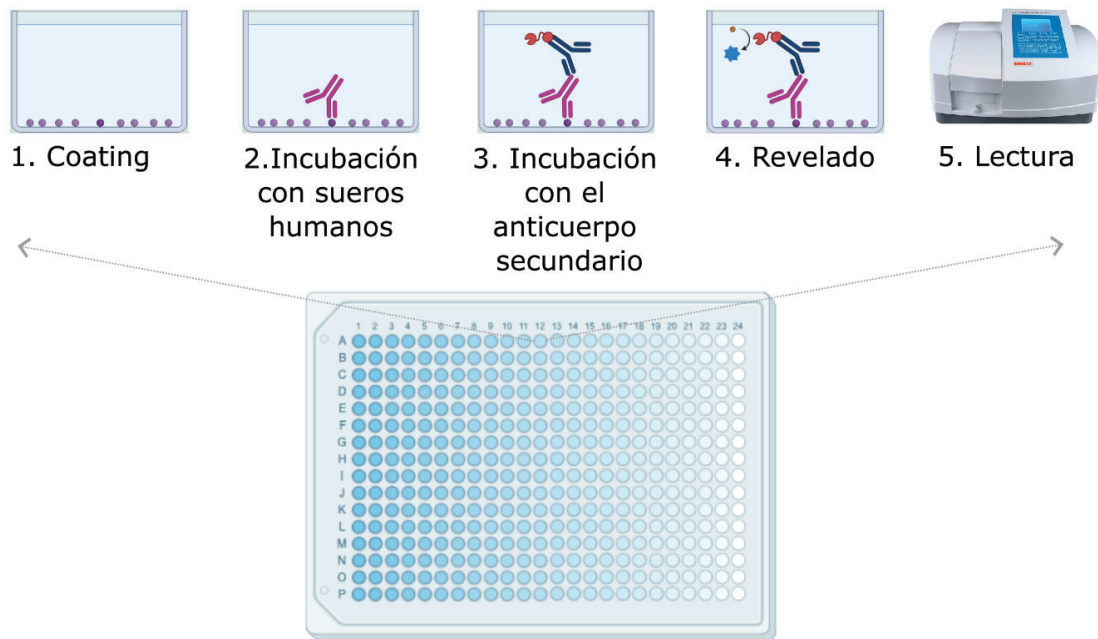


Figura M3: Representación esquemática del ensayo ELISA. Cada uno de los pocillos es sometido, sucesivamente, a los procesos indicados (ver texto para más detalles).

Procesamiento, análisis y presentación de datos

A partir de la reactividad de los sueros negativos se determinaron los valores de *cutoff* para cada ensayo. En el caso de las proteínas GST-TSSAII, -TSSAIII y -TSSAIV ‘completas’ y GST-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp se consideraron positivas aquellas muestras con reactividad mayor a la media de las reactividades de los sueros negativos + 5 SD (desvío estándar). Para las proteínas conteniendo sólo epitopes únicos, y por su menor reactividad general, las muestras se tomaron como positivas si la reactividad fue mayor a la media de las reactividades de los sueros negativos + 3 SD. Para la evaluación de los sueros se siguió el flujo de trabajo esquematizado en la Fig M4. En primer lugar, se evaluó la reactividad contra la construcción ‘completa’ de TSSAII, III y IV. Los sueros reactivos fueron evaluados contra las construcciones TSSA-Sp, TSSA-A y TSSA-B de la/s isoforma/s para las cuales mostraron reactividad (Fig M4). Cada suero fue ensayado por duplicado, en al menos 2 experimentos independientes. En casos donde los duplicados para un antígeno diferían en más de un 30%, se procedió a repetir el ensayo para ese suero. El análisis y presentación de datos se realizó utilizando el software RStudio [79]. Se utilizó el paquete “ggplot” para generar los diagrama de venn, Box-Plots, heatmaps y gráficos de tortas presentados en este trabajo. En

algunos casos, las reactividades informadas fueron previamente relativizadas al valor de cutoff correspondiente. Para los diferentes tipos de análisis, se indicó la seroprevalencia (definida como número de sueros reactivos para un dado antígeno/número de sueros ensayados). Se generaron modelos de regresión lineal y se determinaron los coeficientes de correlación asociados (R^2), utilizando las funciones “lm” y “r.squared” de RStudio. Para determinar la similitud estructural entre los epítopes A y B de las diferentes TSSA, se utilizó la matriz BLOSUM62 para asignar puntajes a las sustituciones de aa entre secuencias evolutivamente relacionadas [80].

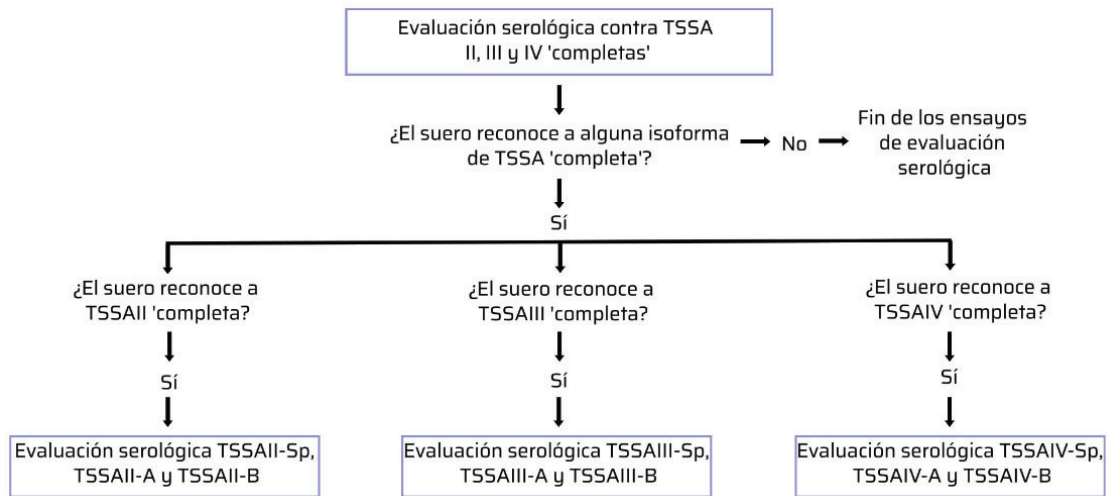


Figura M4: Flujo de trabajo utilizado para la evaluación serológica.

Análisis estadístico

Se realizaron una serie de pruebas T pareadas para comparar diferencias en la distribución de las reactividades de grupos definidos de sueros contra las distintas construcciones generadas. El Test T pareado es una herramienta estadística que se utiliza cuando las observaciones están relacionadas, utilizada para analizar la diferencia de medias de las dos muestras, bajo el supuesto de normalidad en la distribución de las diferencias [81]. Para cada comparación, se calculó el p-valor como indicador de la significancia estadística, donde un valor < 0.05 implica que la diferencia entre las medias es significativa. El análisis fue ejecutado en R Studio, utilizando la función t.test. Se destacan con barras y p-valores solamente los grupos que muestran diferencias significativas en las reactividades analizadas. Por motivos de espacio, no se incluyen las comparaciones entre los grupos que no presentaron diferencias significativas. En los gráficos de Box-Plot, se informa la media, mediana y cuartiles (25% y 75%), calculados usando R studio (funciones *mean*, *median* y *quantile*).

Resultados

OE1- Desarrollo de nuevos reactivos diagnósticos basados en TSSA, con distinta configuración epitópica.

Diseño de los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp

Se diseñaron construcciones conteniendo exclusivamente las secuencias comprendidas por los epitopes A y B (aa 34-50) de TSSAII, III y IV (TSSAII-Sp, TSSAIII-Sp, TSSAIV-Sp). En estas construcciones, los epitopes específicos de cada isoforma están intercalados por la secuencia GGGGSGGGSGTGGGGS, la cual ya fué utilizada como espaciador molecular en otros trabajos [82] (Fig M2). Los modelos generados a partir de las construcciones derivadas de TSSAII sustentan la ausencia de estructuras secundarias complejas en el espaciador molecular, así como la falta de interacción aparente entre el espaciador y/o los epitopes de TSSAII y GST (Fig R1). Resultados muy similares fueron obtenidos a partir de los modelados de las construcciones derivadas de TSSAIII y TSSAIV (datos no mostrados).

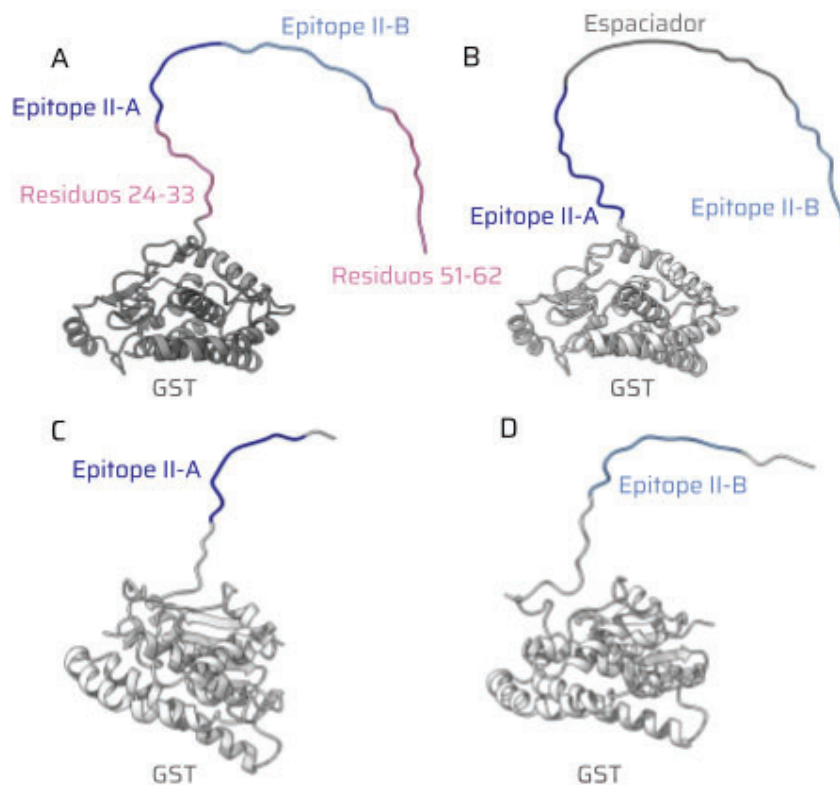


Figura R1: Modelado estructural de las construcciones derivadas de TSSAII. A-D. Estructuras tridimensionales predichas por AlphaFold para TSSAII 'completa' (A), TSSAII-Sp (B), TSSAII-A (C), y TSSAII-B (D). En azul oscuro se indica el epitope A, en celeste el epitope B, en gris oscuro el espaciador, en rosa los residuos extra de TSSAII 'completa' y en gris claro la estructura tridimensional de la proteína GST.

La secuencia de los epítopes A y B había sido definida experimentalmente para TSSAII (Fig I6) [68], y fue inferida posicionalmente para las isoformas TSSAIII y TSSAIV. Las secuencias de estos epítopes se muestran en la Fig R2. En todos los casos, los epítopes A y B fueron extendidos por la adición de un residuo a cada lado para minimizar posibles problemas estéricos en su reconocimiento por anticuerpos.

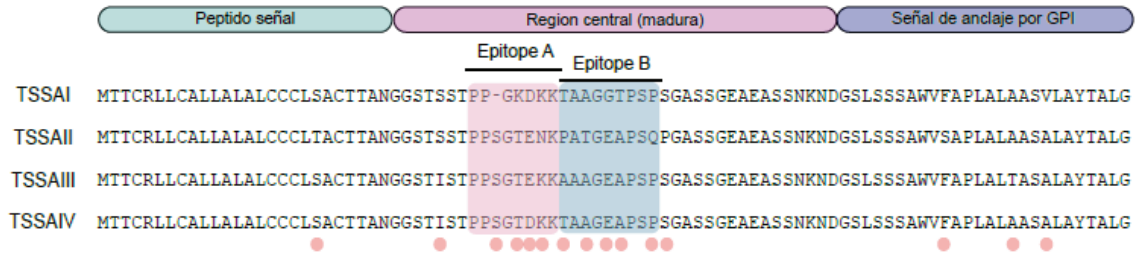


Figura R2: Secuencia y posiciones polimórficas de las isoformas de TSSA. Se indica la localización de los epítopes A y B determinados para TSSAII e inferidos para las demás isoformas. La estructura de TSSA se indica arriba, y las posiciones variables entre isoformas (puntos rosados), debajo. Adaptado de [68].

Estas construcciones fueron clonadas en el vector pGEX-4T-1, para generar los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y TSSAIV-Sp (Fig R3 y Fig S2). En este diseño, las construcciones quedan en fusión traduccional al C-terminal de la proteína GST (Fig M2), lo que facilita su expresión soluble en el citoplasma de *E. coli* y su posterior purificación por cromatografía de afinidad. Para la ingeniería de estas construcciones debieron agregarse algunos residuos 'extra' (Fig R3 y Fig S2). No se sintetizó la construcción correspondiente a TSSAI debido a la nula reactividad observada para esta isoforma [57,60].

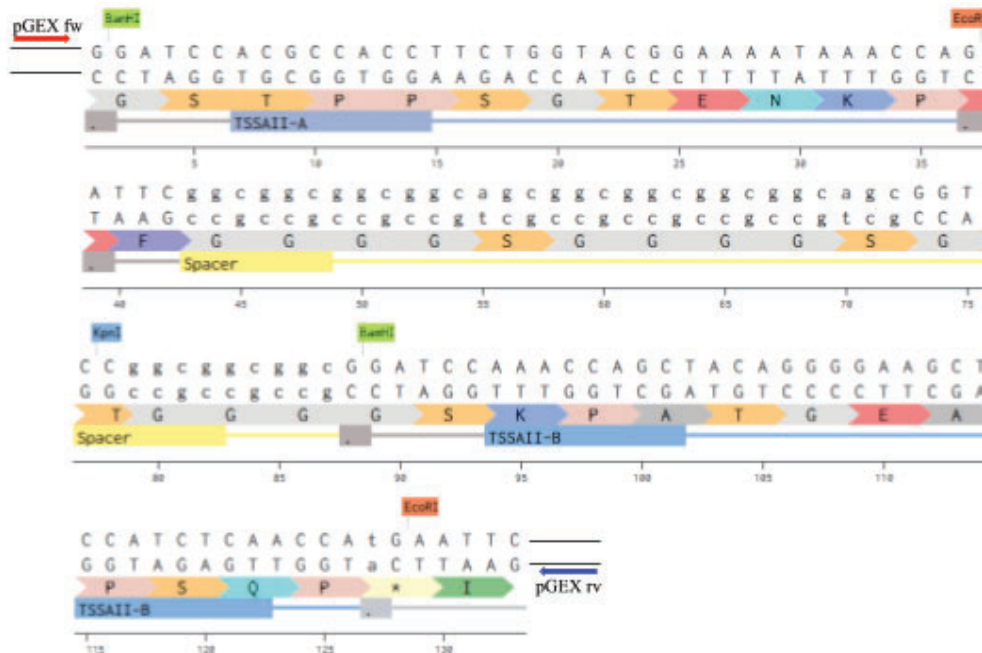


Figura R3: Estructura de los constructos contenidos en los vectores pGEX-TSSA-Sp. Se indica la secuencia de ADN (arriba) y proteína (debajo) de los distintos 'módulos': epitopes A (TSSAII-A azul) espaciador (spacer, en amarillo), epitopes B (TSSAII-B celeste) y secuencias conectoras (gris) para los constructos contenidos en pGEX-TSSAII-Sp. Los sitios de restricción relevantes están indicados sobre la secuencia de ADN. Los nucleótidos indicados en minúsculas no corresponden a TSSA ni a sitios de restricción. Se indican los sitios de pegado de los oligonucleótidos pGEXfw (rojo) y pGEXrev (azul).

Generación de plásmidos pGEX-TSSAII-A y B, -TSSAIII-A y B y -TSSAIV-A y B

Una ventaja adicional del diseño de los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp es la posibilidad de obtener construcciones conteniendo las secuencias de los epítopes A y B individuales mediante un protocolo experimental simple. Brevemente, la digestión de estas construcciones con BamHI libera un fragmento de 81 pb (que contiene la secuencia del epítipo A y el espaciador), mientras que la digestión con EcoRI libera un fragmento de 85 pb (que contiene la secuencia del espaciador y el epítipo B) (Fig R3 y Fig S2). Debido a su tamaño, estos fragmentos presentan un rendimiento reducido en la recuperación luego de precipitar el producto de la digestión [72]. En consecuencia, se espera que la religación de los clones digeridos con EcoRI resulte en un enriquecimiento en clones conteniendo solo la secuencia codificante para el epítipo A (pGEX-TSSAII-A, -TSSAIII-A y -TSSAIV-A), mientras que la religación de los clones digeridos con BamHI resulte en un enriquecimiento en clones conteniendo sólo la secuencia codificante para el epítipo B (pGEX-TSSAII-B, -TSSAIII-B y -TSSAIV-B).

Los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp se trataron con las enzimas de restricción BamHI o EcoRI y se precipitaron. Al ser analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, todos ellos presentaron una única banda del tamaño esperado (~5000 pb, el tamaño del vector pGEX-4T-1, Fig S1), indicativo de digestión completa (Fig R4). En algunas muestras fue posible observar algunas especies (muy minoritarias) de menor migración electroforética, que podrían corresponder a plásmidos con digestión incompleta (Fig R4). El fragmento liberado, de 81 u 85 bp dependiendo del caso (ver arriba), no alcanzó a visualizarse en ninguna de las muestras, de acuerdo a lo esperado. A fines comparativos, se corrió en paralelo el plásmido pGEX-TSSAII-Sp sin digerir, que muestra múltiples bandas que se corresponden a las distintas formas de enrollamiento (Fig R4, calle 'pGEX-TSSAII-Sp').

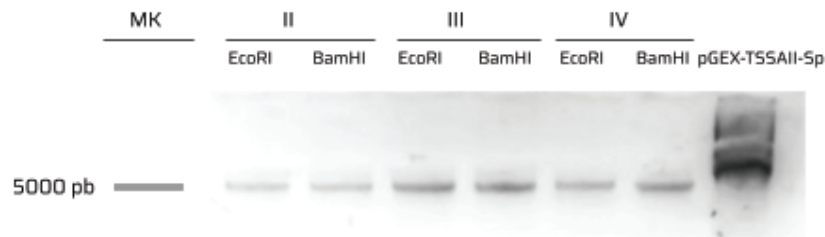


Figura R4: Digestión enzimática de los vectores pGEX-TSSA-Sp. Electroforesis del producto de digestión de los plásmidos pGEX-TSSAII-Sp (II), -TSSAIII-Sp (III) y -TSSAIV-Sp (IV) con BamHI y EcoRI. El marcador de masa molecular (MK), en bp, se muestra a la izquierda, y el control (pGEX-TSSAII-Sp sin digerir), a la derecha.

Los plásmidos digeridos y precipitados fueron re-ligados y transformados en bacterias *E. coli* Dh5 α competentes. Luego del plaqueo en medio selectivo, se analizaron 2 colonias de cada una de las placas mediante la técnica de 'colony PCR' y los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa. De acuerdo a la posición de los oligonucleótidos pGEXfw y pGEXrv utilizados, se esperaba obtener productos de ~280 pb para los clones en su configuración original y de ~190 pb para los clones portando solo un epítipo (los que se re-ligaron luego de la deleción del fragmento de 81 u 85 pb) (Fig R3 y Fig S2). Como control, se hizo el mismo ensayo sobre una colonia transformada con el plásmido pGEX-TSSAII-Sp. Como puede verse en la Fig R5A, las colonias pGEX-TSSAII-A-1, II-A-2, II-B-2, III-A-2, IV-A-1 y IV-B-2 presentaron un patrón de bandeo compatible con clones de epítipo único (~190 bp). El clon pGEX-TSSAIV-A-2, en cambio, presentó un patrón de bandeo compatible con la configuración original, de 2 epítipos separados por el espaciador (~280 bp), y es de hecho muy similar al bandeo obtenido para el control (Fig R5A, calle 'pGEX-TSSAII-Sp'). Los clones pGEX-TSSAII-B-1, III-A-1, III-B-1, III-B-2 y IV-B-2, por último, presentaron un patrón de bandeo complejo, que sugiere que para esos ensayos no se partió de una colonia única.

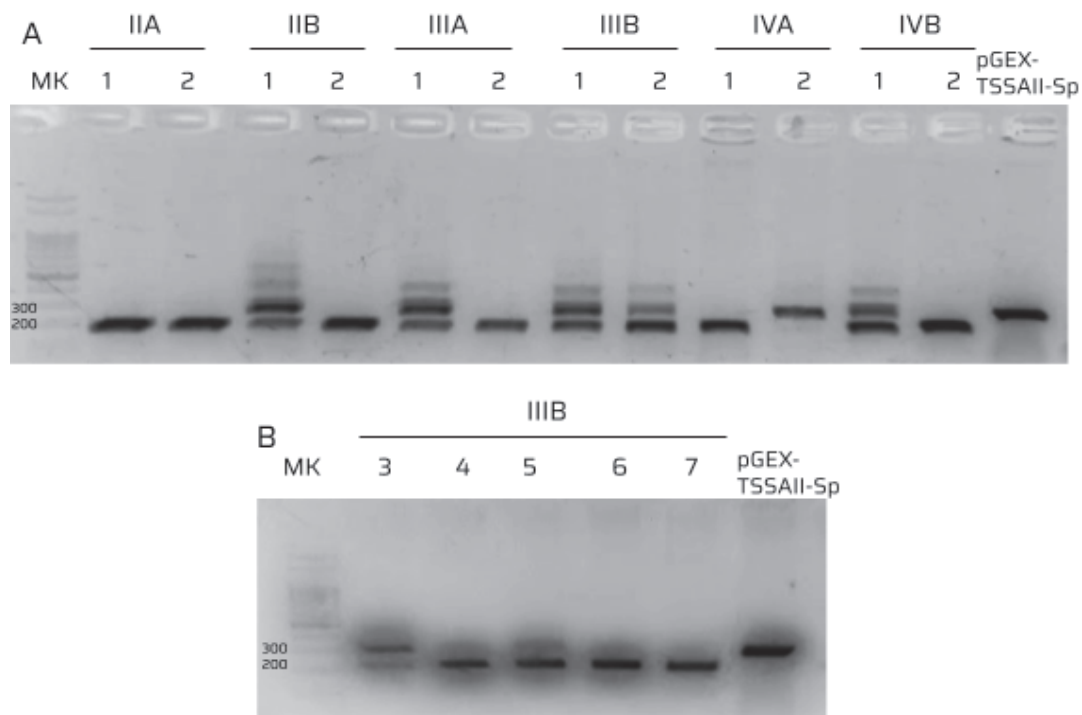


Figura R5. Identificación de clones positivos para TSSAs conteniendo epítipos únicos. A y B. Corridas electroforéticas de los productos de amplificación obtenidos para 2 colonias individuales de las distintas construcciones (pGEX-TSSAII-A, -TSSAII-B, -TSSAIII-A, -TSSAIII-B, -TSSAIV-A y -TSSAIV-B, A) y para 5

colonias individuales de la construcción pGEX-TSSAIII-B (B). El marcador de masa molecular (MK), en bp, se muestra a la izquierda, y el control negativo (pGEX-TSSAII-Sp), a la derecha.

Para el plásmido pGEX-TSSAII-Sp digerido con BamHI y re-ligado, ninguna de las colonias mostró un patrón de bandeo compatible con clones de epítipo único, por lo que se repitió el ensayo de 'colony PCR' sobre 5 nuevas colonias aisladas de esa placa. En este nuevo ensayo se obtuvieron tanto colonias 'positivas' (banda única, de ~190 bp, clones III-B-4, 6 y 7) como clones de bandeo complejo (banda de ~280 bp y de ~190 bp, clones III-B-3 y 5) (Fig R5B).

Finalmente, a partir de cultivos provenientes de una colonia 'positiva' para cada clon, se obtuvieron los plásmidos correspondientes a los epítipos A y B para cada isoforma, y se verificó su identidad por secuenciación utilizando los mismos oligonucleótidos pGEXfw y pGEXrv. A modo de ejemplo, en la Fig R6 se ilustra el resultado de la secuenciación para el clon pGEX-TSSAII-B con el oligonucleótido pGEXfw. En todos los casos, los cromatogramas presentaron picos bien definidos y resueltos, lo que permitió asignar sin ambigüedades la identidad de las secuencias de los distintos plásmidos generados (Fig S3).

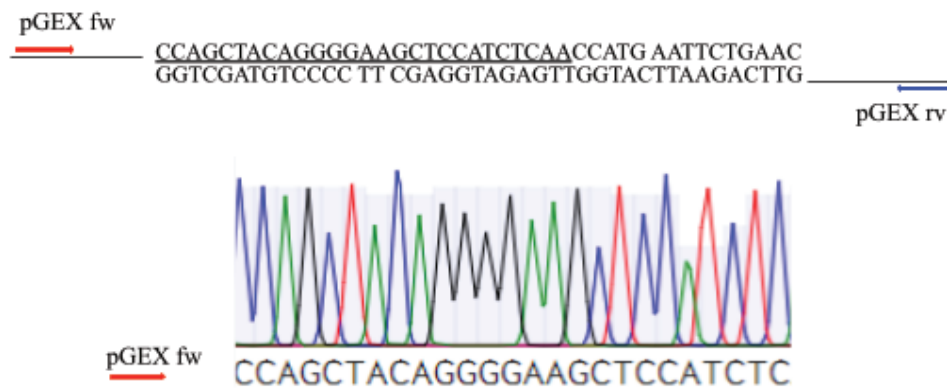


Figura R6. Secuenciación de clones positivos para TSSAs conteniendo epítipos únicos. Fragmento del cromatograma de la secuenciación de pGEX-TSSAII-B, utilizando el oligonucleótido pGEXfw. La secuencia del epítipo B de TSSAII se indica subrayada arriba.

Expresión de las variantes de TSSA en *E. coli*

Los plásmidos conteniendo las construcciones originales (pGEX-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp) como las derivadas de ellas, conteniendo epítipos únicos (pGEX-TSSAII-A, -TSSAII-B, -TSSAIII-A, -TSSAIII-B, -TSSAIV-A y -TSSAIV-B) fueron transformados en bacterias. Alícuotas de los cultivos, inducidos o sin inducir con IPTG, se resolvieron en geles SDS-PAGE, en condiciones desnaturizantes, a los que luego se tiñó con CBB (Fig R7A). Se observa que hubo inducción de la expresión para GST-TSSAII-A, -TSSAII-B, -TSSAIII-B, -TSSAIV-A y -TSSAIV-B, evidenciado por la presencia de una banda de ~26 kDa en todas ellas. En el caso de la proteína GST-TSSAIII-A, y por motivos desconocidos, la banda de inducción mostró un tamaño aparente un poco mayor (~28 kDa). Estos tamaños, de todas

maneras, son compatibles con los esperados (Tabla 2). Por otro lado, se puede notar que se obtuvo menor rendimiento para fracción inducida de la proteína GST-TSSAIV-B (Fig R7A). Es probable que durante la preparación de esta muestra se haya producido una pérdida de masa bacteriana, ya que todas sus bandas son visiblemente más tenues en comparación con las de las demás muestras. Se registró también la correcta inducción de las construcciones con el espaciador (GST-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp), dada la presencia de una banda mayoritaria de ~30 kDa en las calles correspondientes a fracciones totales inducidas (Fig R7B). Estos tamaños son también compatibles con los esperados (Tabla 2). Debe mencionarse que en ensayos de fraccionamiento por sonicación, todas las proteínas mostraron una acumulación en la fracción soluble, correspondiente al citoplasma bacteriano (ver debajo).

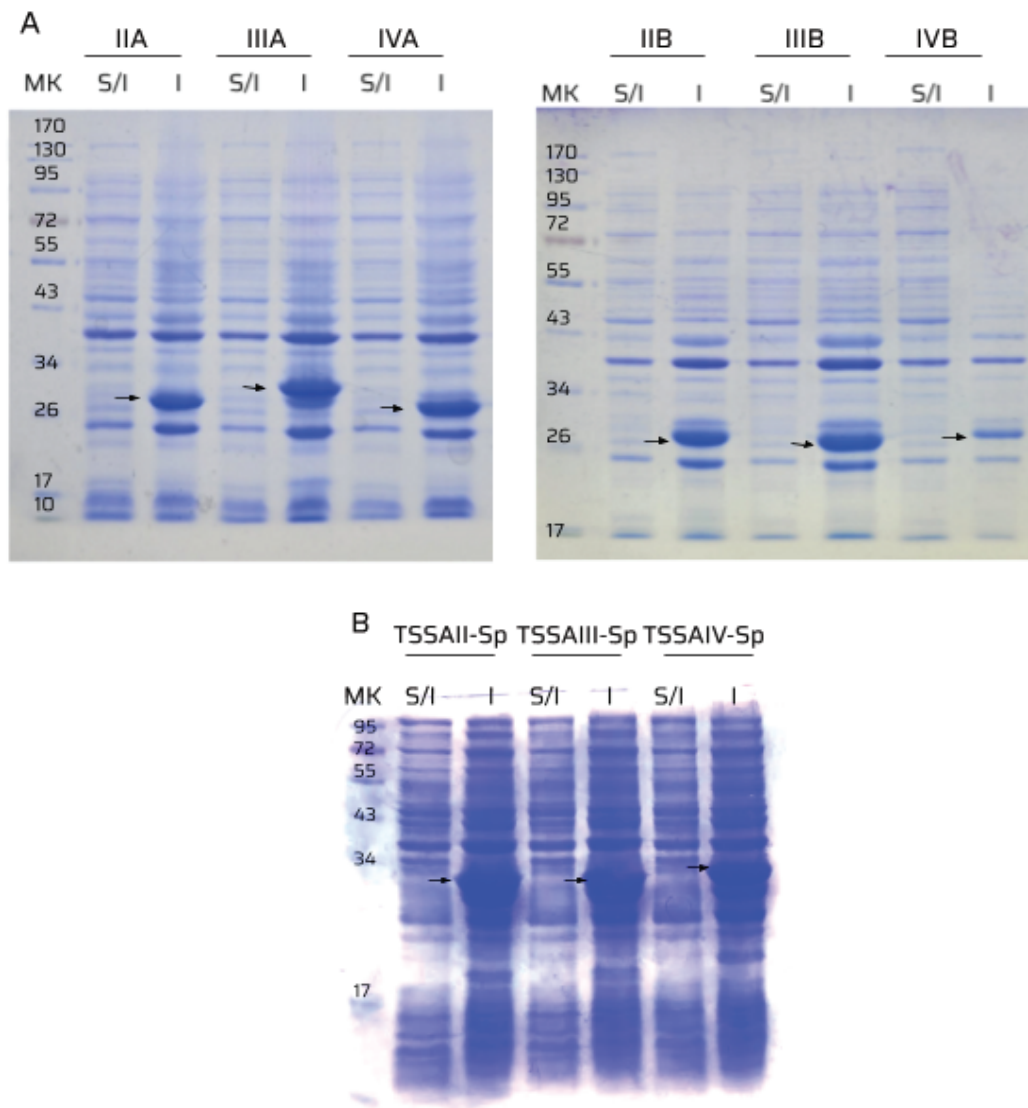


Figura R7: Expresión en bacterias de las variantes de TSSA. A y B. Muestras de las fracciones totales inducidas (I) o sin inducir (S/I) con IPTG de GST-TSSAII-A, -TSSAII-B, -TSSAIII-A, -TSSAIII-B, -TSSAIV-A y

-TSSAIV-B (A) y de las proteínas GST-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp (B) se resolvieron en geles SDS-PAGE desnaturalizantes y se tiñeron con CBB. Las bandas de inducción, correspondientes a las proteínas de fusión a GST, se indican con flechas. El marcador de masa molecular (MK) se muestra a la izquierda, en kDa.

Purificación de las variantes de TSSA

Las fracciones solubles de los cultivos fueron sometidas a cromatografía de afinidad en columnas de glutation-sefarosa (Fig M4). Se analizaron alícuotas correspondientes a las fracciones *input* (entrada), percolado (fracción que no interacciona con la columna) y eluato (fracción retenida en la columna y posteriormente eluida por adición en exceso de glutatión reducido), en geles SDS-PAGE corridos en condiciones desnaturalizantes y visualizados mediante tinción con CBB (Fig R8).

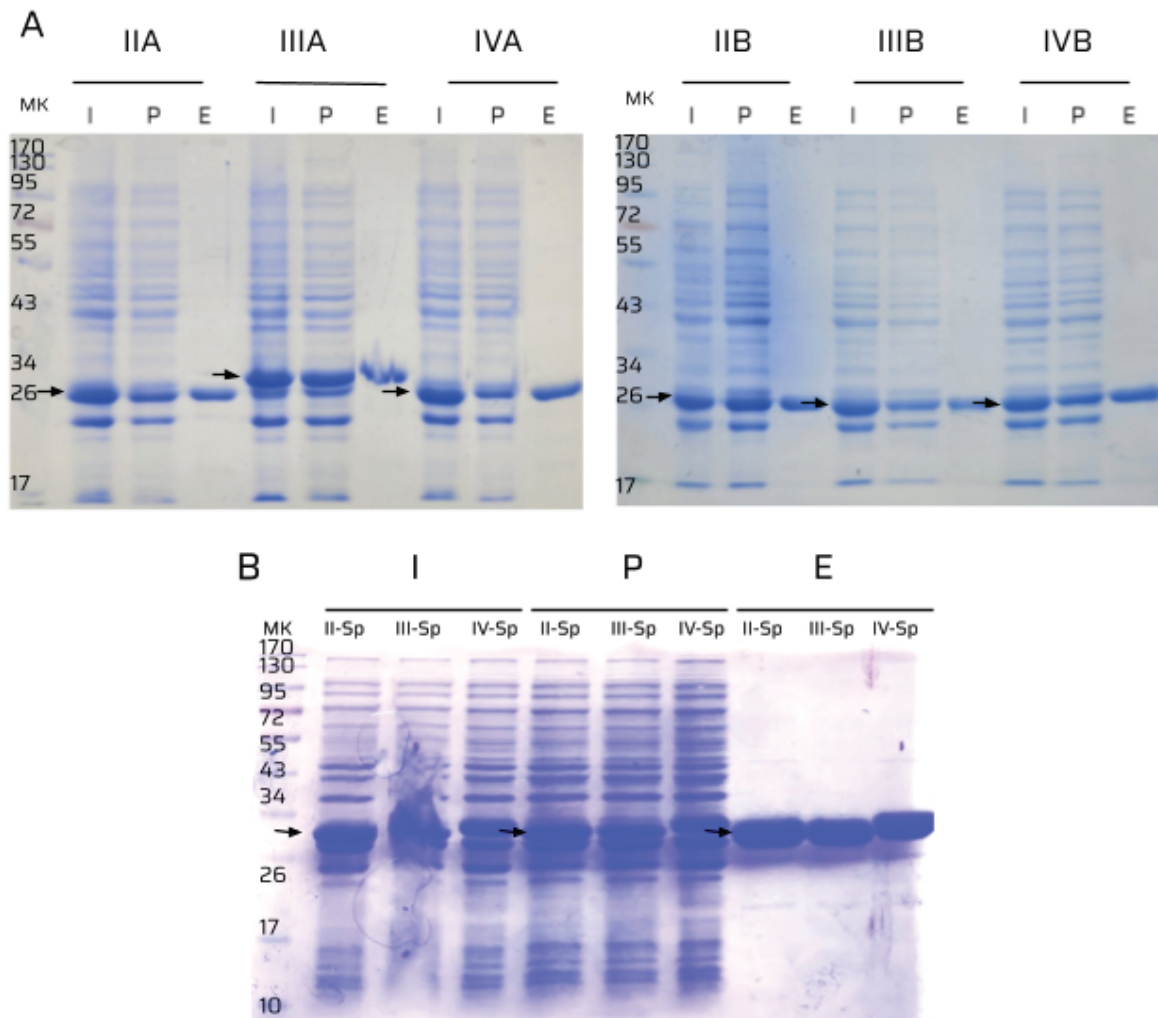


Figura R8: A. Purificación de las variantes de TSSA. A y B. Muestras de las fracciones *input* (I), percolado (P) y eluato (E) de la purificación de GST-TSSAII-A, -TSSAII-B, -TSSAIII-A, -TSSAIII-B, -TSSAIV-A y -TSSAIV-B (A) y GST-TSSAII-Sp, -TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp (B) fueron resueltas en geles SDS-PAGE y visualizadas por tinción

con CBB. El marcador de masa molecular (MK), en kDa, se muestra a la izquierda. Se indican, en ambos paneles, con flechas las bandas correspondientes a las proteínas de interés.

En todos los eluatos se observa una única banda del tamaño esperado (Tabla 2), que es también consistente con el tamaño obtenido para la banda de inducción de esa misma proteína (Fig R8), por lo que se puede concluir que se logró purificar todas las proteínas expresadas a homogeneidad y sin degradación aparente. Como instancia final se procedió a cuantificar la concentración de las proteínas en los eluatos mediante NanoDrop y Bradford, obteniéndose resultados similares por ambos métodos. Las concentraciones obtenidas se indican en la Tabla 2. A partir de estas concentraciones, se calculó un rendimiento total de proteína purificada de ~6 mg/L para todas ellas. Las cantidades de proteínas obtenidas en un solo ensayo de cultivo (250 mL) fueron suficientes para llevar a cabo todos los ensayos de análisis serológicos detallados en la siguiente sección. Toda esta información está compilada en la Tabla 2, donde también se indican los nombres simplificados de las construcciones utilizadas de aquí en adelante en el trabajo.

Tabla 2: Proteínas recombinantes usadas en este trabajo.

Isoforma	Construcción	Nomenclatura	Mr*	Concentración**
TSSAII	GST-TSSAII (aa 24-62)	TSSAII 'completa'	31,09	0,55
	GST-TSSAII-Sp	TSSAII-Sp	29,76	1,57
	GST-TSSAII-A	TSSAII-A	27,60	1,65
	GST-TSSAII-B	TSSAII-B	27,37	1,3
TSSAIII	GST-TSSAIII (aa 24-62)	TSSAIII 'completa'	29,77	0,63
	GST-TSSAIII-Sp	TSSAIII-Sp	29,65	1,5
	GST-TSSAIII-A	TSSAIII-A	27,58	1,7
	GST-TSSAIII-B	TSSAIII-B	27,28	1,49
TSSAIV	GST-TSSAIV (aa 24-62)	TSSAIV 'completa'	29,79	1,5
	GST-TSSAIV-Sp	TSSAIV-Sp	29,70	1,77
	GST-TSSAIV-A	TSSAIV-A	27,60	1,9
	GST-TSSAIV-B	TSSAIV-B	27,31	1,67
-	GST	GST	25,50	2,7

*Se informan los Mr predichos (en kDa).

**Se informan los valores obtenidos experimentalmente (en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

OE2- Evaluación de las firmas de anticuerpos reveladas por los nuevos reactivos diagnósticos basados en TSSA en muestras de pacientes infectados con *T. cruzi*.

Caracterización de la respuesta serológica contra TSSA

Utilizando las proteínas purificadas, se llevó a cabo la evaluación de las firmas de anticuerpos en una población de 97 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica provenientes del sur de Sudamérica, sin sintomatología clínica asociada. Mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con las proteínas TSSAII, TSSAIII y TSSAIV ‘completas’ (Fig R9 y Tabla 2), se determinó primeramente la prevalencia serológica de las distintas isoformas. TSSAII resultó la isoforma más reconocida (n=82, 85%), seguida de TSSAIV (n=22, 23%) y TSSAIII (n=12, 13%) (Fig R9A). TSSAII también fue la que generó mayores reactividades (media \pm SD de 1,02 \pm 0,60 U.A.) respecto a TSSAIII (0,34 \pm 0,40 U.A.) y TSSAIV (0,36 \pm 0,44 U.A.), diferencias que resultaron estadísticamente significativas (Fig R9A).

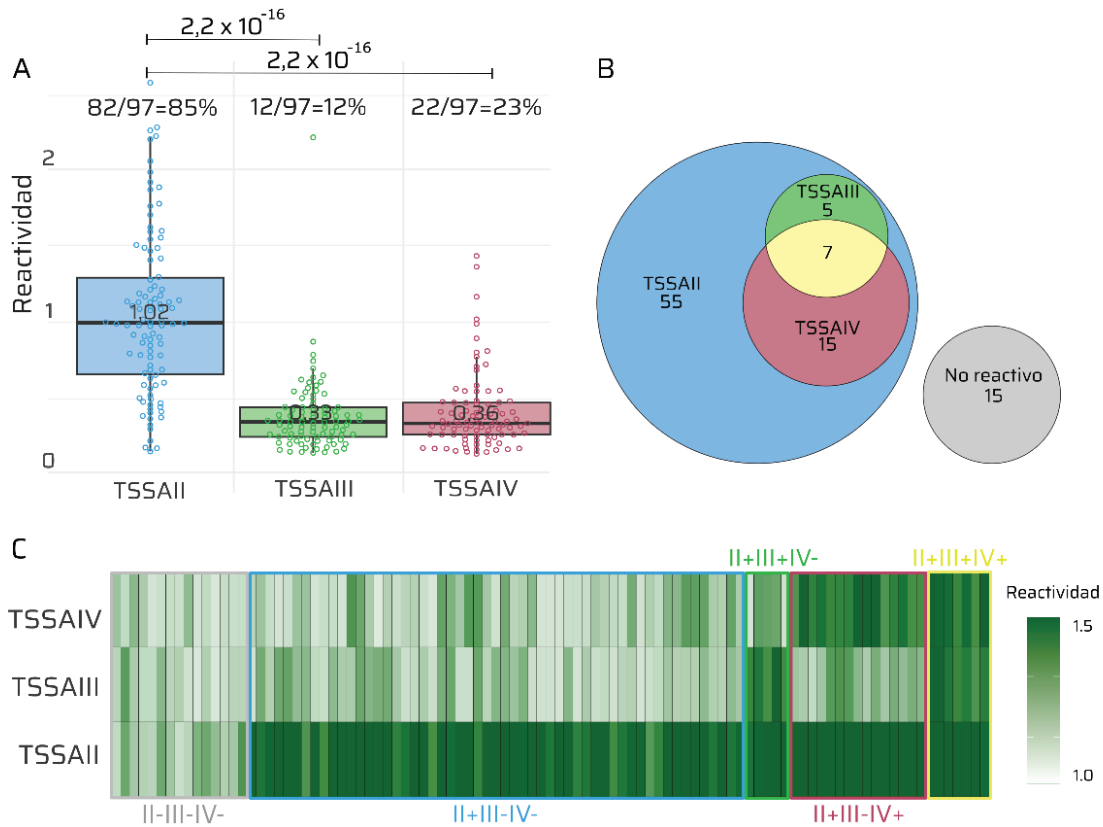


Figura R9: Reactividad serológica de las isoformas de TSSA. A. Box-Plot mostrando la reactividad para TSSAII, III y IV ‘completas’ en muestras de pacientes con enfermedad de Chagas crónico (n=97). Las medias y medianas de cada población se indican con números y líneas horizontales dentro de las cajas. Las muestras se analizaron estadísticamente usando el test de T-student con un nivel de confianza del 95% (se indican los valores de p para cada comparación). **B.** Diagrama de Venn de los sueros reactivos contra TSSAII (azul), TSSAII y III (verde), TSSAII y IV (violeta) y TSSAII, III y IV (amarillo). La población de sueros no reactivos para ninguna isoforma se indica en gris. **C.** Heatmap de reactividades de todos los sueros ensayados contra

TSSAII, III y IV 'completas'. La escala de colores (indicativa de la reactividad) se muestra a la izquierda. Para una mejor resolución de las señales, esta escala satura para reactividades mayores a 1.5. La señal está relativizada a los valores de cutoff globales establecidos para sueros negativos.

Dentro de la población de sueros positivos para infección con *T. cruzi* evaluados, 15 (15%) resultaron no reactivos para ninguna isoforma (sueros 'no reactivos') y 82 reconocieron a TSSAII (sueros TSSAII-reactivos). De estos últimos, la mayoría (n=55) reconocieron exclusivamente a TSSAII (de aquí en más, 'exclusivos'). Interesantemente, todos los sueros reactivos para TSSAIII (n=12) o TSSAIV (n=22), incluyendo un pequeño grupo de muestras que mostró reactividad mixta para ambas isoformas (n=7), mostraron también reconocimiento para TSSAII. De acuerdo a este perfil de reconocimiento, estos sueros (n=27) se denominaron 'cross-reactivos'. Un diagrama de Venn representando estos resultados se muestra en la Fig R9B. El perfil de reactividad de cada uno de los sueros contra las tres isoformas se detalla en la Fig R9C. Los distintos grupos de sueros (no reactivos, II-III-IV-; exclusivos, II+III-IV- y cross-reactivos, II+III+IV-, II+III-IV+ y II+III+IV+) fueron coloreados de acuerdo al diagrama de Venn.

Análisis de la respuesta serológica contra TSSAII

Dado que la población de sueros analizada era principalmente reactiva contra TSSAII (Fig R9), se procedió a realizar primeramente un análisis detallado de la respuesta serológica contra esta isoforma.

Epitopes A y B

A partir de la población de sueros TSSAII-reactivos (n=82), se realizó el análisis del reconocimiento de los epitopes individuales usando las proteínas TSSAII-A y TSSAII-B. El epitope A generó mayores reactividades que el epitope B ($0,82 \pm 0,59$ U.A. vs $0,46 \pm 0,45$ U.A.), lo cual mostró significancia estadística (Fig R10A). Además de más reactivo, el epitope A resultó ser más seroprevalente que el epitope B (87% vs 37%, respectivamente, Fig R10A). La clasificación de la población de sueros TSSAII-reactivos en base a su reconocimiento epitópico ('epitotipo') indicó que 50% de los mismos (n=41) tienen epitotipo A (reconocimiento exclusivo del epitope A), 36,6% (n=30) epitotipo AB (reconocimiento de ambos epitopes), 1,2% (n=1) epitotipo B (reconocimiento exclusivo del epitope B) y 12, 2% (n=10) epitotipo nulo (sin reconocimiento de ninguno de los dos epitopes) (Fig R10B). En conjunto, estos datos sugieren que i) los epitopes A y B propuestos recapitulan en línea general la reactividad de la región antigénica completa de TSSAII; y ii) hay inmunodominancia del epitope A respecto del B.

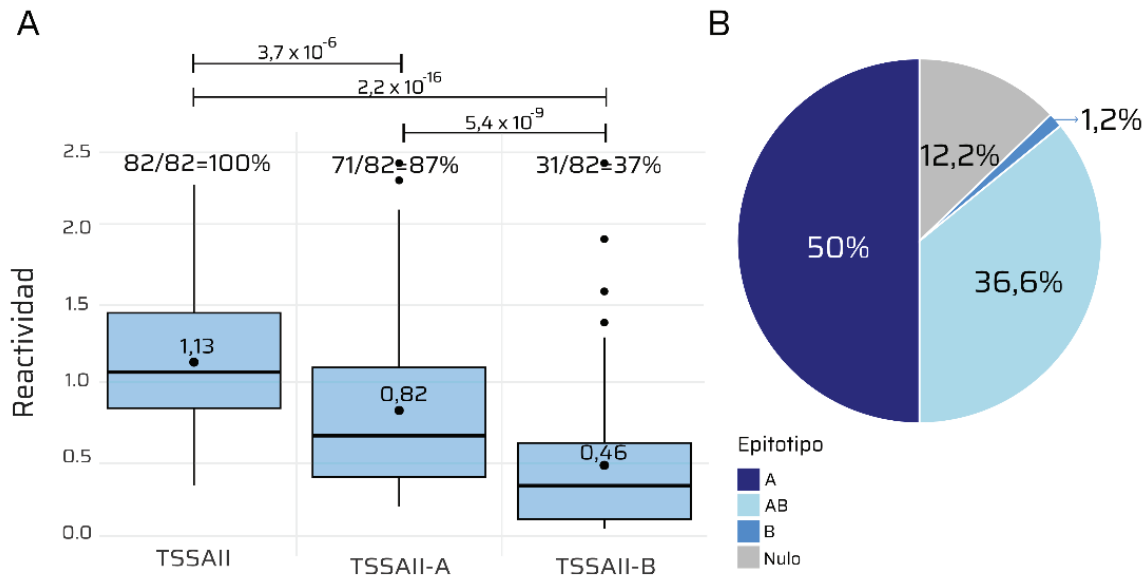


Figura R10: Respuesta serológica a los epitopos individuales derivados de TSSAII. A. Box-Plot mostrando la reactividad contra TSSAII-A y TSSAII-B de sueros TSSAII-reactivos ($n=82$). A fines comparativos, también se indica la reactividad contra la proteína TSSAII ‘completa’. Las medias están señaladas por un punto, y su valor numérico se indica encima. Las medianas se indican mediante líneas horizontales dentro de las cajas. Las muestras se analizaron estadísticamente usando el test de T-student con un nivel de confianza del 95% (se indican los valores de p para cada comparación). **B.** Gráfico de torta representando el epitotipo (tipo de reconocimiento epitópico) de los sueros TSSAII-reactivos: A (azul), B (turquesa), AB (cian) y nulo (gris).

Sueros cross-reactivos y exclusivos

A continuación, se estudió la reactividad contra distintas construcciones de TSSAII para las dos subpoblaciones de sueros TSSAII-reactivos: los sueros “cross-reactivos”, capaces de reconocer a más de una isoforma de TSSA y los “exclusivos”, que solo reconocen a TSSAII. A fines comparativos, también se incluyó la reactividad registrada para el grupo de sueros TSSAII-reactivos totales, previo a su clusterización. Para la TSSAII ‘completa’ se observó una reactividad ligeramente mayor, aunque no estadísticamente significativa, para los sueros cross-reactivos ($1,25 \pm 0,55$ U.A.) respecto de los exclusivos ($1,10 \pm 0,47$ U.A.) (Fig R11A). Para las variantes conteniendo a los epitopos A y B aislados (TSSAII-A y TSSAII-B), no se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de reactividad entre los sueros cross-reactivos ($0,81 \pm 0,65$ U.A. y $0,41 \pm 0,42$ U.A.) y los exclusivos ($0,82 \pm 0,56$ U.A. y $0,48 \pm 0,47$ U.A.) (Fig R11B). Tampoco se observaron diferencias significativas a nivel de la seroprevalencia de cada epitope para los distintos grupos de sueros, aunque los valores, comparados a los de la población total de sueros TSSAII-reactivos, fueron levemente mayores para los cross-reactivos y levemente menores para los exclusivos. Como se muestra en la Fig R11B, las seroprevalencias de TSSAII-A y -B, respectivamente, fueron del 87% y 37% para la población total, del 89% y 44% para los sueros cross-reactivos y del 82% y 33% para los exclusivos. De estos resultados se puede concluir que la clusterización de sueros

TSSAII-reactivos en base a su perfil de reconocimiento de isoformas (exclusivos o *cross-reactivos*) no conlleva un sesgo en los niveles de reactividad global ni en los de dominancia relativa entre epitopos.

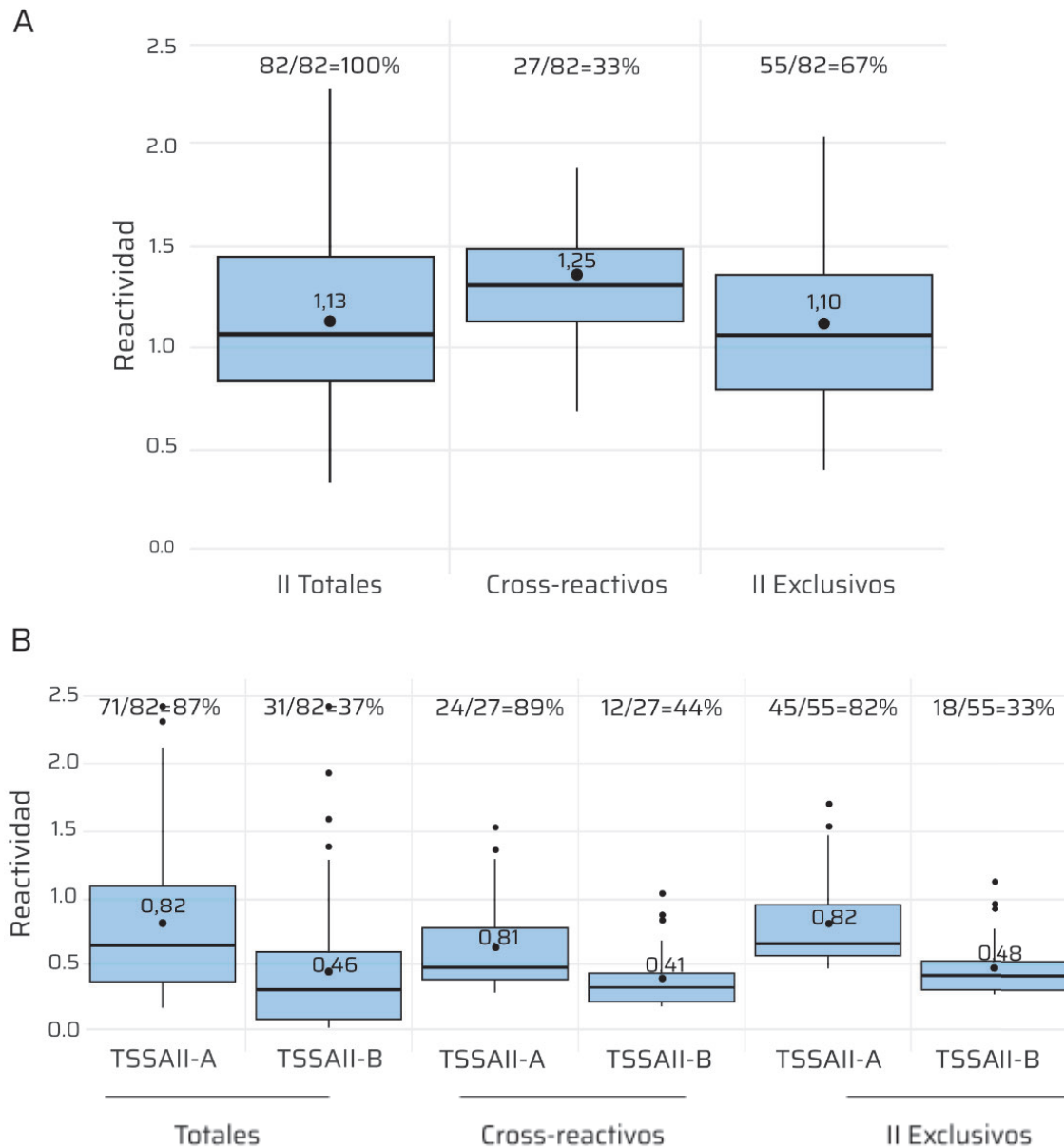


Figura R11: Respuesta serológica a TSSAII de los distintos tipos de sueros TSSAII-reactivos. A y B. Box-Plot mostrando la reactividad contra TSSAII 'completa' (A) y TSSAII-A y TSSAII-B (B) de sueros TSSAII-reactivos totales (izquierda, $n=82$), cross-reactivos (centro, $n=27$) y exclusivos (derecha, $n=55$). Las medias están señaladas por un punto, y su valor numérico se indica encima. Las medianas se indican mediante líneas horizontales dentro de las cajas. Las muestras se analizaron estadísticamente usando el test de T-student con un nivel de confianza del 95% y no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones.

Espaciador molecular

Para evaluar el efecto del espaciador molecular en la respuesta serológica contra TSSAII se comparó la señal de TSSAII 'completa' vs TSSAII-Sp para la población de sueros TSSAII-reactivos. Como se muestra en la Fig R12, las reactividades fueron muy similares ($1,13 \pm 0,60$ U.A. para TSSAII 'completa' y $1,16 \pm 0,66$ U.A. para TSSAII-Sp), diferencias que no resultaron estadísticamente significativas utilizando un nivel de confianza del 95%. La seroprevalencia para TSSAII-Sp (88%, 72/82), sin embargo, resultó un poco menor que para TSSAII 'completa' (100%, 82/82) (Fig R12). Estos resultados van en línea con los obtenidos previamente (Fig R11) e indican que, en líneas generales, los epitopes A y B están bien definidos para TSSAII, ya que la construcción conteniendo solamente estas secuencias (TSSAII-Sp) logra recapitular la respuesta serológica (reactividad y seroprevalencia) de la construcción 'completa'.

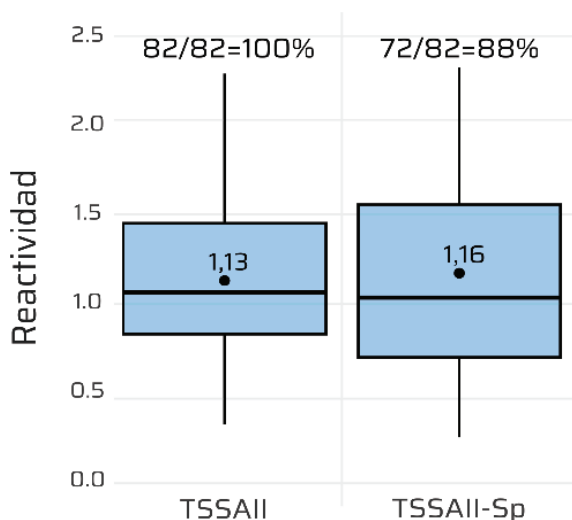


Figura R12: Efecto del espaciador molecular en la respuesta serológica contra TSSA. Reactividad contra TSSAII 'completa' y con el espaciador (TSSAII-Sp), para la población total de sueros TSSAII-reactivos (n=82). Las medias se indican con los valores numéricos dentro de las cajas. Las medianas se indican mediante líneas horizontales dentro de las cajas. Las muestras se analizaron estadísticamente usando el test de T-student con un nivel de confianza del 95% y no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Se realizó luego el mismo análisis pero desglosando los sueros TSSAII-reactivos según su epitotipo (Fig R10B). Para los sueros de epitotipo A (n=41), las reactividades contra las dos variantes resultaron similares ($0,98 \pm 0,51$ U.A. para TSSAII 'completa' vs $1,02 \pm 0,53$ U.A. para TSSAII-Sp), indicando que el agregado del espaciador tiene un mínimo impacto en la interacción antígeno-anticuerpo (Fig R13A). En cambio, para los sueros de reconocimiento mixto (epitotipo AB, n=30), la reactividad fue significativamente mayor contra la proteína con el espaciador ($1,55 \pm 0,50$ U.A. para TSSAII-Sp vs $1,32 \pm 0,47$ U.A. para TSSAII 'completa', Fig R13B), indicando que el agregado del espaciador tiene un impacto positivo en la interacción antígeno-anticuerpo. Otra forma de visualizar estos datos es determinando el

cociente de la reactividad contra TSSAII-Sp y TSSAII 'completa' en sueros individuales, agrupados de acuerdo a su epitotipo. El grupo de sueros de epitotipo A presentó un amplio rango de valores para este cociente (2,00 a 0,58), aunque la media y la mediana poblacional (1,02) resultaron muy cercanos a 1 (Fig R13C). El único suero de epitotipo B mostró la misma tendencia, con un cociente de reactividad TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' de 0,95 (Fig R13C). En sueros de epitotipo AB, en cambio, la media del cociente de reactividad TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' fue de 1,21 (Fig R13C) y la mediana poblacional de 1,11. En conjunto, estos resultados indican que para sueros de reconocimiento de tipo mixto (epitotipo AB), pero no para sueros de epitotipo A o B, la separación molecular de los epitopes A y B resulta en un mejor reactivo diagnóstico. Esto sugiere que la disposición adyacente de estos epitopes confiere algún tipo de impedimento estérico para el reconocimiento simultáneo de las 2 poblaciones de anticuerpos (anti-epitope A y anti-epitope B) presentes en estos sueros. Por último, y como era esperable, los sueros de epitotipo nulo (n=10), negativos para TSSAII-A y TSSAII-B, también mostraron baja reactividad contra la proteína TSSAII-Sp y, por lo tanto, bajos cocientes TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' (media=0,60; mediana=0,46, Fig R13C).

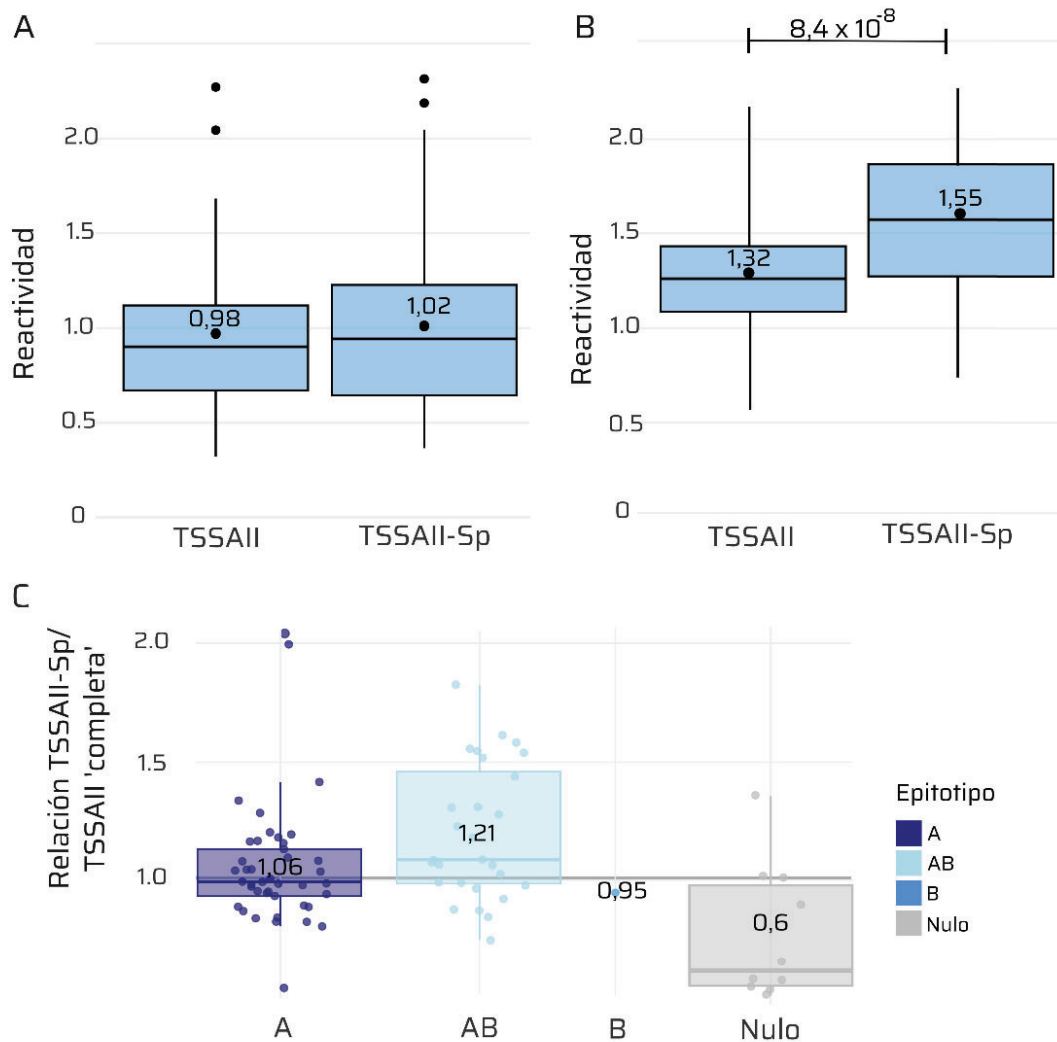


Figura R13: Respuesta serológica a TSSAII 'completa' y TSSAII-Sp. A y B. Box-Plot mostrando la reactividad contra TSSAII 'completa' y TSSAII-Sp de sueros TSSAII-reactivos con epitotipo A (A) y AB (B). C. Box-Plot del cociente de la reactividad contra TSSAII-Sp y TSSAII 'completa' de sueros de epitotipo A (n=41), AB (n=30), B (n=1) o nulo (n=10). En todos los casos, las medias están señaladas por un punto, y su valor numérico se indica encima. Las medianas se indican mediante líneas horizontales dentro de las cajas. Las muestras se analizaron estadísticamente usando el test de T-student con un nivel de confianza del 95% (se indica el valor de p).

A continuación, realizamos el análisis inverso de los datos. Brevemente, se graficó para cada suero la reactividad contra TSSAII 'completa' en función de la reactividad contra TSSAII-Sp, se utilizó un modelo de regresión lineal para analizar los datos y establecer los diferentes grupos. Por último se determinó la representación de los distintos epitotipos en cada uno de estos grupos. El grupo mayoritario fue el de los sueros que no varían su reactividad con el agregado del espaciador (relación TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' ~ 1 , n=46), seguido por el grupo de sueros que aumentan su reactividad con el espaciador (relación TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' > 1 , n=25), y por último, los que disminuyeron su señal con el espaciador (Relación TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' < 1 , n=11) (Fig R14A).

En línea con lo mostrado anteriormente, para el grupo de sueros que no varía su reactividad con el agregado del espaciador (TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' ~ 1), la población mayoritaria fue la de reconocimiento de tipo A (incremento de un 50% a un 60% respecto a la población total TSSAII-reactivos, Fig R14B y C). Para el grupo de sueros que aumenta su reactividad con el agregado del espaciador (TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' > 1), en cambio, la población que más se enriqueció fue la de reconocimiento de tipo mixto o epitotipo AB (de un 35,9% a un 52,2%) (Fig R14D). Para ambos grupos (TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' ~ 1 y TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' > 1), la población que más se redujo fue la de epitotipo nulo (de 12,2% a 4,4% y 4,3%, respectivamente. En cambio, para el grupo de sueros que disminuye su reactividad con el agregado del espaciador (TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' < 1), la población que se incrementó respecto a la población de sueros TSSAII-reactivos totales fue justamente la de epitotipo nulo (de un 12,2 a un 70%, 8/11) (Fig R14E). Dentro del grupo TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' < 1 , un 20% de los sueros mostraron un reconocimiento de tipo A, un 10% epitotipo AB, y no se encontraron sueros con reconocimiento de tipo B.

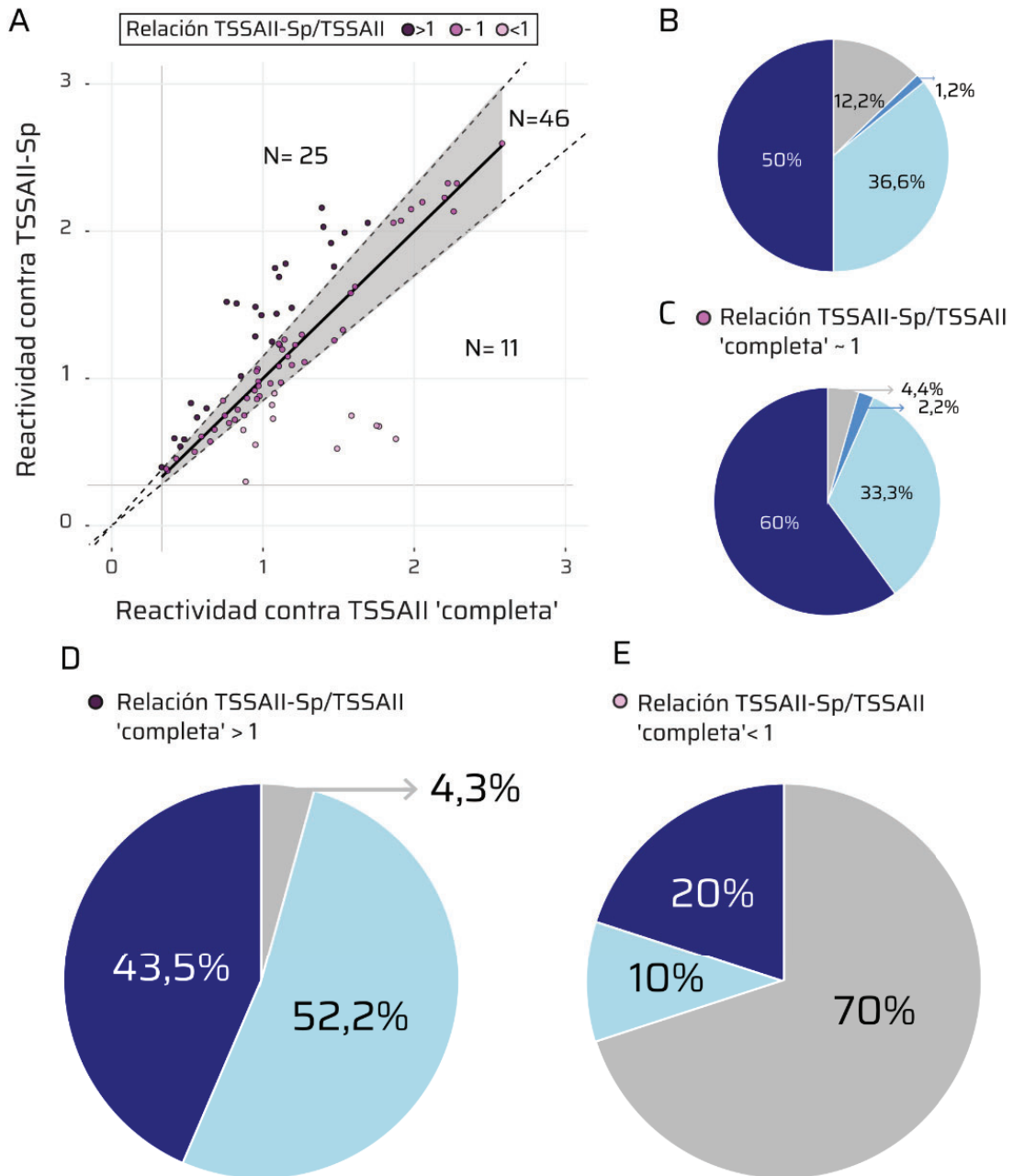


Figura R14: Respuesta serológica a TSSAII 'completa' y TSSAII-Sp y epitopos. A: Relación de la reactividad frente a TSSAII 'completa' (eje X) y TSSAII-Sp (eje Y) en sueros TSSAII-reactivos (n=82). Utilizando un modelo de regresión lineal con un intervalo de confianza del 99,9% se establecieron 3 grupos de sueros, de cociente TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' ~ 1 (n=46), > 1 (n=25) y < 1 (n=11). B-E. Gráfico de tortas del reconocimiento epitópico de la población total de sueros TSSAII-reactivos totales (B), de cociente TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' ~ 1 (C), > 1 (D) y < 1 (E). El epitotipo de los sueros se indica en azul (A), turquesa (B), cian (AB) y gris (nulo).

El perfil de reactividad contra todas las variantes de TSSAII para los 8 sueros de epitotipo nulo pertenecientes al grupo que disminuye su reactividad con el agregado del espaciador

se muestra en la Fig R15. Todos ellos (sueros 30515, 30517, 31070, 31368, 36629, 36670, 36854 y 392) resultaron positivos para TSSAII 'completa' y negativos para TSSAII-Sp, TSSAII-A y TSSAII-B. En base a estos resultados, podría interpretarse que para esta pequeña subpoblación de sueros, los epítopes A y B no están correctamente definidos. A fines comparativos, se muestran los perfiles de reactividad de dos sueros, pertenecientes a los grupos que aumentan (suero 29615) y no varían (suero 269996) su reactividad por el agregado del espaciador (Fig R15). Los otros 3 sueros TSSAII-reactivos de epitotipo nulo (2 pertenecientes al grupo TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' ~ 1 y el perteneciente al grupo TSSAII-Sp/TSSAII 'completa' > 1) también resultaron negativos para TSSAII-Sp (datos no mostrados), indicando que, al igual que para los sueros 30515, 30517, 31070, 31368, 36629, 36670, 36854 y 392 (Fig R15), los epítopes A y B de TSSAII no están bien definidos.

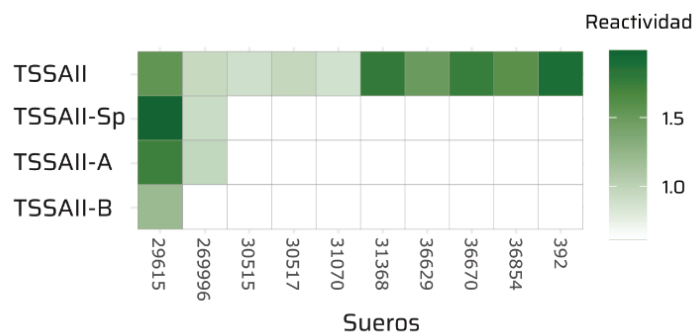


Figura R15: Perfil de reactividad contra variantes de TSSAII de sueros selectos. Heatmap de reactividades de los sueros TSSAII-reactivos indicados contra TSSAII 'completa', TSSAII-Sp, TSSAII-A y TSSAII-B. La escala de colores (indicativa de la reactividad) se muestra a la derecha.

Por último, procedimos a evaluar la señal de los 15 sueros no reactivos para TSSAII 'completa' (Fig R9B), contra la proteína con el espaciador (TSSAII-Sp). Diez de ellos resultaron también negativos para TSSAII-Sp (66%), por lo que podrían considerarse "verdaderos negativos" (Fig R16A). Más interesante, 5 de estos sueros (de aquí en más, "sueros recuperados") sí resultaron positivos contra TSSAII-Sp (reactividades ~ 0,8-1,6), por lo que podrían considerarse falsos negativos para TSSAII 'completa' que pudieron ser, en términos diagnósticos, 'rescatados' por TSSAII-Sp (Fig R16A). Cabe mencionar que estos 5 sueros eran los que más reactividad habían mostrado hacia TSSAII 'completa', con valores muy cercanos (aunque menores) al cutoff establecido como criterio de positividad (Fig R16A). Los perfiles de reconocimiento contra todas las construcciones derivadas de TSSAII revelaron que algunos sueros no reactivos frente a TSSAII 'completa' tampoco presentaron reactividad contra TSSAII-Sp, TSSAII-A y TSSAII-B (sueros 12, 13, 14 y 15) (Fig R16B). Los sueros 8, 9, 10 y 11 tampoco mostraron reactividad contra TSSAII-Sp, aunque no se pudo evaluar su reactividad contra TSSAII-A y IIB por falta de muestra (Fig R16B). Dentro de los "sueros recuperados", se observó reconocimiento de un epítope (epitotipo A, sueros 3, 4 y 5) o de dos epítopes (epitotipo AB, suero 6), salvo en un caso donde no se pudo determinar el

reconocimiento de los epitopes aislados (suero 7, nuevamente por falta de muestra). Por último, en algunos sueros se evidenció un fenómeno diferente, donde no se observó reactividad para TSSAII 'completa' ni TSSAII-Sp, pero sí para TSSAII-A (suero 1), o TSSAII-A y TSSAII-B (suero 2). Si bien estos dos sueros se clasificaron como no reactivos frente a TSSAII-Sp, debe notarse que sus señales (~0,75 U.A.) fueron relativamente altos y cercanos al valor de corte (*cutoff*) (Fig R16A). En conjunto, estos datos indican que la separación de los epitopes A y B de TSSAII podría ser implementado para el mejoramiento de la capacidad serodiagnóstica de esta molécula.

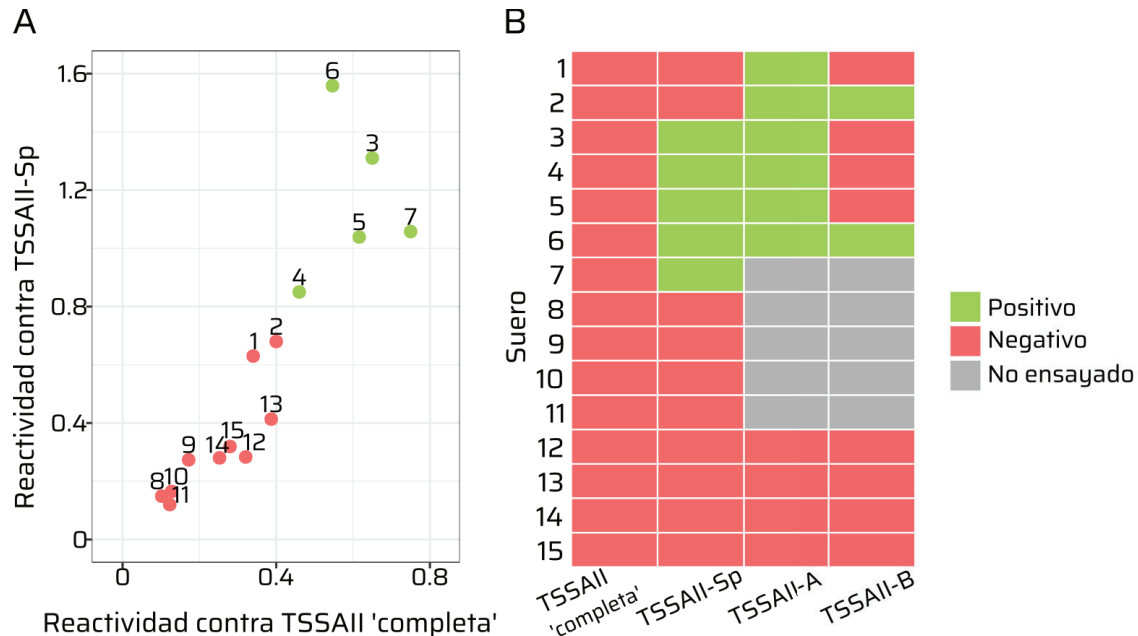


Figura R16: Perfil de reactividad contra variantes de TSSAII de sueros no reactivos contra TSSAII. A. Relación de la reactividad frente a TSSAII 'completa' (eje X) y TSSAII-Sp (eje Y) en sueros negativos para TSSAII 'completa' (n=15). En verde (n=5) se indican los sueros positivos y en rojo (n=10) los negativos para TSSAII-Sp. **B.** Heatmap de positividad (verde)/negatividad (rojo) de los sueros negativos para TSSAII 'completa' contra las proteínas indicadas. En gris se indican las combinaciones de suero/proteína no ensayadas.

Análisis de la respuesta serológica contra TSSAIII y TSSAIV

El análisis de las reactividades contra las distintas variantes de TSSAIII y TSSAIV se realizó siguiendo lineamientos similares a los usados para el análisis de la reactividad contra TSSAII (aunque restringido a los sueros que mostraron reactividad contra esas isoformas). A diferencia de lo que se observa en TSSAII, el agregado del espaciador en TSSAIII y TSSAIV afecta negativamente al reconocimiento serológico de las proteínas. Sobre todo para TSSAIV, donde las prevalencias (100% vs 45%) y las reactividades ($0,69 \pm 0,38$ U.A. vs $0,50 \pm 0,21$ U.A.) determinadas para TSSAIV 'completa' y TSSAIV-Sp, respectivamente, resultan significativamente diferentes (Fig R17A). Estos resultados sugieren que los epitopes A y B para estas isoformas, sobre todo para TSSAIV, no están tan correctamente definidos como

para TSSAII. Esto se puede atribuir a que, como ya se mencionó, los epitopes de TSSAIII y IV no fueron determinados empíricamente sino inferidos a partir de los de TSSAII (Fig R2).

Para ahondar más en este punto, en la Fig R17B se esquematiza la reactividad contra TSSA 'completa', TSSA-Sp y los epitopes A y B de las isoformas III y IV de sueros individuales selectos. Los sueros 13i y 28246 (a la izquierda de cada recuadro), se graficaron para ejemplificar casos donde las reactividades contra la TSSA 'completa' y TSSA-Sp resultaron similares. En estos casos, la reactividad contra la variante TSSA-Sp se correlaciona con cierta reactividad contra al menos uno de los epitopes aislados. Para los demás sueros mostrados, que no reconocieron a TSSA-Sp (III o IV, respectivamente), se puede notar que tampoco hay reactividad contra los epitopes A y B presentados por separado.

En cuanto al análisis del reconocimiento diferencial para cada epitope (Fig R17A), es posible notar que tanto para TSSAIII como para TSSAIV hay una reactividad significativamente mayor del epitope A respecto del epitope B (TSSAIII: $0,42 \pm 0,34$ U.A. para epitope A vs $0,15 \pm 0,08$ U.A. para epitope B; TSSAIV: $0,46 \pm 0,55$ U.A. para epitope A vs $0,24 \pm 0,16$ U.A. para epitope B). En la misma línea, la seroprevalencia de los epitopes A de ambas isoformas es mayor que la de los epitopes B correspondientes (TSSAIII: 75% vs 0%; TSSAIV: 50% vs 15%) (Fig R17A). Estos datos indican que, más allá de diferencias atribuibles a la mejor o peor definición de epitopes entre isoformas, el perfil de reconocimiento serológico es similar para todas ellas, claramente sesgado hacia el A.

Como se mencionó previamente, todos los sueros reactivos para TSSAIII y/o TSSAIV mostraron también reconocimiento (y en algunos casos cuantitativamente mayor, en términos de reactividad) para TSSAII (Fig R9B). En este contexto, decidimos evaluar el impacto de la reactividad cruzada de anticuerpos contra TSSAII en el reconocimiento de las isoformas TSSAIII y TSSAIV. El análisis de correlación de respuestas, sin embargo, sugiere que este fenómeno tiene una incidencia menor en nuestros resultados, y parece estar restringido a la reactividad de la proteína TSSAIV (Fig R17C, panel superior). Más aún, el desglose del análisis de correlación de respuestas serológicas entre epitopes, indica que el posible reconocimiento cruzado de anticuerpos entre TSSAII y TSSAIV se focaliza en el epitope A (Fig R17C, paneles central e inferior). Para evaluar mejor la especificidad de las respuestas contra los epitopes A y B, graficamos la cantidad de variantes de un mismo epitope reconocidas por todos los sueros 'cross-reactivos' (n=27). Para el epitope A, una pequeña fracción de estos sueros no reconocen ninguna variante (7,4%), y fracciones mayores reconocen a 1 (25,9%), 2 (40,7%) y 3 variantes (25,9%) (Fig R17D). Es decir, que el % de sueros 'promiscuos', que reconocen más de una variante del epitope A, alcanza el 66,6%. Para el epitope B, en cambio, el 48,1% de los sueros no reconocen a ninguna variante, otro 48,1% reconoce una sola variante, ninguno reconoce 2 variantes y sólo un suero (3,7%) reconoce a las 3 variantes. De estos resultados se puede inferir que los epitopes A resultan

inmunodominantes y más propensos a ser reconocidos en conjunto por un mismo suero mientras que los epitopes B resultan menos reactivos pero más específicos.

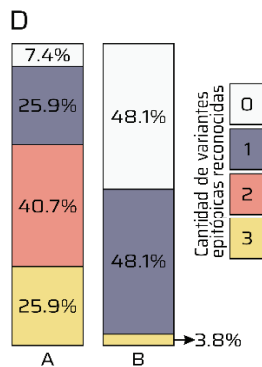
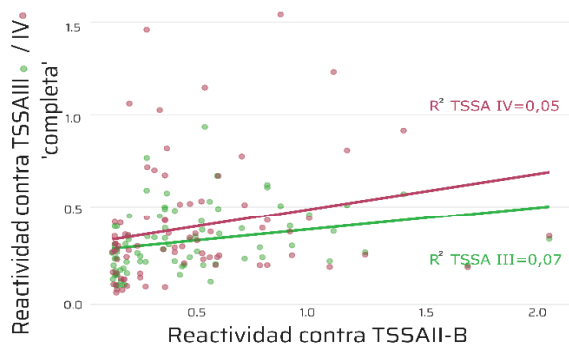
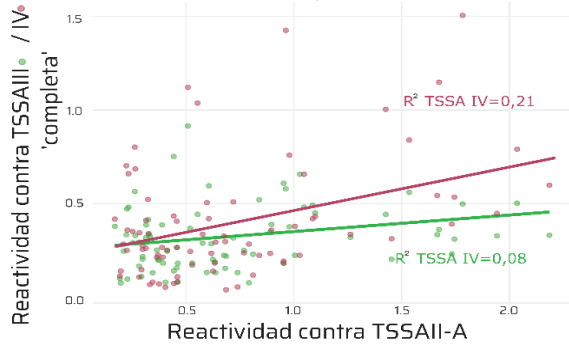
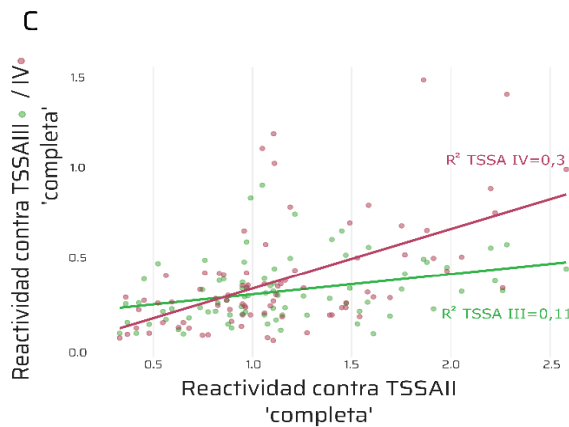
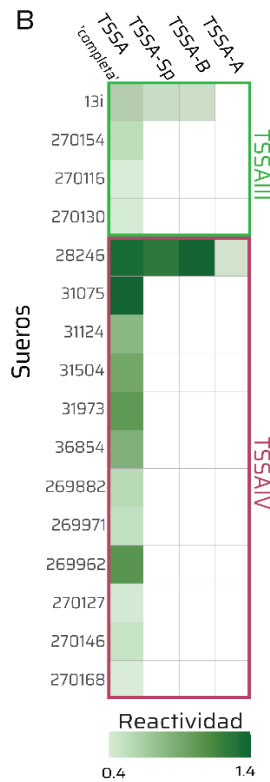
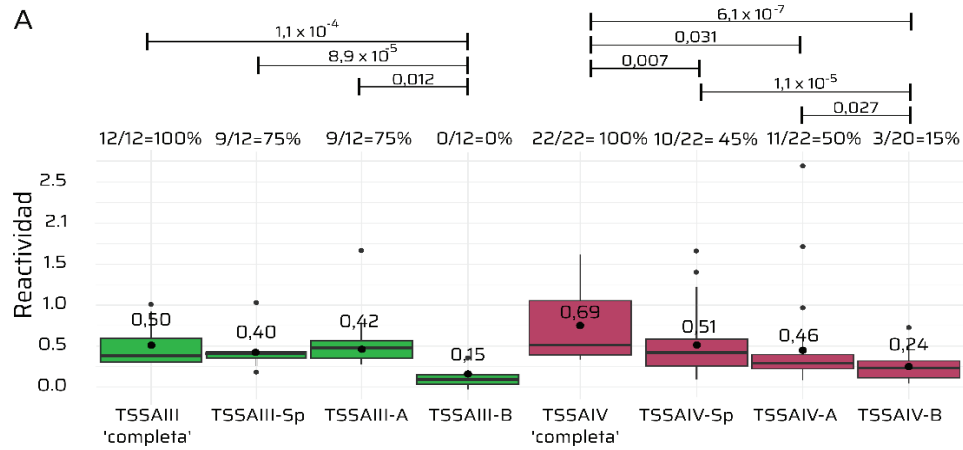


Figura R17: Análisis de la reactividad serológica contra las isoformas TSSAIII y TSSAIV. **A.** Box-Plot mostrando la reactividad de las distintas proteínas recombinantes generadas a partir de TSSAIII y TSSAIV. Las muestras se analizaron estadísticamente usando el test de T-student con un nivel de confianza del 95% (se indican los valores de p para cada comparación). **B.** Heatmap de reactividades de sueros selectos contra TSSA 'completa', TSSA-Sp, TSSA-A y TSSA-B para las isoformas III y IV. La escala de colores (indicativa de la reactividad) se muestra debajo. **C.** Reactividad contra TSSAII 'completa' (arriba), TSSAII-A (centro) y TSSAII-B (abajo) en función de la reactividad contra TSSAIII (verde) o TSSAIV (violeta), de todos los sueros TSSAII-reactivos (n=82). Se indican los coeficientes de correlación para cada población. **D.** Cantidad de variantes de epitopes A (A) y epitopes B (B) reconocidas por la población de sueros 'cross-reactivos' (n=27).

Discusión

En el presente trabajo se desarrollaron y evaluaron nuevas herramientas moleculares con aplicabilidad en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, basadas en el antígeno polimórfico TSSA de *T. cruzi*. En una primera instancia, y basados en resultados previos obtenidos mayormente de nuestro laboratorio, se implementaron metodologías bioinformáticas, de biología molecular, microbiología y bioquímica de proteínas para el diseño racional, la generación, la expresión, la purificación y la caracterización preliminar de diferentes variantes de TSSA (Figs R1 a R8). Estas variantes presentan diferente configuración epitópica: i) solo el epitope A; ii) solo el epitope B; iii) los epitopes A y B, en su disposición original; y iv) ambos epitopes, pero separados por un espaciador de 20 residuos (Fig M2). Todas estas construcciones se ensayaron por ELISA frente a una cohorte de pacientes infectados con *T. cruzi* y controles apropiados.

TSSAII resultó la isoforma más reconocida (85%), seguida de TSSAIV (23%) y TSSAIII (13%) (Fig R9). Un 15% de los sueros analizados no mostraron reactividad contra ninguna isoforma de TSSA. En cuanto a la reactividad, TSSAII fue la isoforma que generó mayores reactividades ($1,02 \pm 0,60$ U.A.), seguida por TSSAIII ($0,34 \pm 0,40$ U.A.) y TSSAIV ($0,36 \pm 0,44$ U.A.), diferencias que resultaron estadísticamente significativas (Fig R9). Los resultados de seroprevalencia son coincidentes con estudios previos [52,57,59,60,68] y son atribuibles al sesgo epidemiológico en la población de sueros analizada. Como ya se mencionó, la predominancia de los linajes TcII (cuyo genoma contiene ~10-14 copias de TSSAII) y TcV y TcVI (cuyos genomas contienen ~10-14 copias de TSSAII y una única copia de TSSAIII) en ciclos domésticos del sur de Sudamérica ha sido extensamente reportada [59].

Un aspecto importante a destacar es que todos los sueros que presentaron reactividad hacia TSSAIII y/o TSSAIV, también mostraron reconocimiento hacia TSSAII (Fig R9). Este resultado condujo al planteo de tres hipótesis, no mutuamente excluyentes: i) la probable co-infección de algunos pacientes con cepas de distintos linajes, que ya ha sido reportado [28]; ii) la expresión coordinada de los alelos de TSSA presentes en ambos haplotipos (TSSAII y TSSAIII) en cepas híbridas [59]; y iii) la existencia de algún grado de reactividad cruzada entre las distintas isoformas de TSSA. El análisis de correlación entre las respuestas serológicas frente a las diferentes isoformas sugiere que, al menos en el caso de TSSAIV, la reactividad cruzada podría ser un factor a considerar, especialmente en lo que respecta al epitope A (Fig R17). Esta observación va en línea con que los epitopes A de TSSAII, III y IV presentan una mayor similitud estructural que los epitopes B (88% vs 77% de cambios positivos/no penalizados según la matriz BLOSUM62). Más importante, esta observación también es consistente con el hecho de que el reconocimiento de anticuerpos contra estas secuencias es relativamente más permisivo a variaciones de residuos [68]. De hecho, los sueros 'cross-reactivos' (aquellos que reconocen a más de una isoforma de TSSA),

muestran en líneas generales un reconocimiento poliespecífico contra los epitopes A pero mono-específico para los epitopes B (Fig R17).

El análisis de las reactividades individuales de las proteínas TSSAII-A y -B permitió validar la presencia de (al menos) 2 epitopes B lineales y discretos en TSSAII, los que serían reconocidos por distintas poblaciones de anticuerpos (Figs R10 y R11). La existencia de múltiples epitopes dentro de la región central de TSSAII había sido sugerida en base a metodologías más indirectas y/o menos robustas, como ser la evaluación de unos pocos sueros individuales en arreglos peptídicos [68] o ensayos de desplazamiento de anticuerpos [57]. Los análisis realizados en este trabajo no solo validan la existencia de los epitopes A y B en TSSAII sino que, además, revelan diferencias en su perfil serodiagnóstico. En el caso de TSSAII, por ejemplo, el epitope A resultó ser inmunodominante sobre el epitope B, tanto en términos de reactividad como de seroprevalencia (Figs R10 y R11). Además, se determinó que un 50% de los sueros de la población de sueros TSSAII-reactivos analizada presentan reconocimiento exclusivo del epitope A, un 36,6% muestran reconocimiento mixto (A y B) y solo un 1,2% reconoce exclusivamente el epitope B (Fig R10). La misma tendencia (reactividad cuanti- y cualitativamente sesgada hacia el epitope A por sobre el epitope B) puede observarse para las isoformas TSSAIII y IV (Fig R17). En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que los epitopes A y B, respectivamente, son más relevantes para la sensibilidad y la especificidad de los métodos de serotipificación basados en TSSA y, por lo tanto, que la implementación de moléculas presentando estos epitopes por separado ayudaría a mejorar la resolución de los mismos.

Uno de los hallazgos más interesantes de nuestro trabajo es el impacto de separar los epitopes A y B, los que están dispuestos de forma adyacente en TSSAII (Fig R2). A nivel poblacional, se observaron reactividades comparables contra la molécula TSSAII 'completa' y TSSAII-Sp, lo que sugiere que la disposición estructural nativa de los epitopes no ofrece mayores impedimentos estéricos para su reconocimiento por anticuerpos (Fig R12). Al realizar un análisis más detallado, sin embargo, fue posible identificar tres subgrupos de sueros basados en la relación de la reactividad TSSA-Sp/TSSA 'completa': un grupo mayoritario (n=46) en los que esta relación era cercana a 1, un segundo grupo (n=25) en el que esta relación era > 1 , implicando un aumento de la reactividad en presencia del espaciador y un tercer grupo, muy minoritario (n=11), en el que esta relación era < 1 , implicando una disminución de la reactividad en presencia del espaciador (Figs R13 y R14). Interesantemente, mientras en el primer grupo predominan los sueros con reconocimiento exclusivo hacia el epitope A, en el segundo predominan los sueros de epitotipo AB (Fig R14). Esto sugiere que, para esta población en particular, el espaciador sí podría facilitar el acceso de anticuerpos a estos epitopes en simultáneo, por lo que esta estrategia podría ser considerada para el mejoramiento de las propiedades serodiagnósticas de TSSAII. Más aún, la evaluación serológica de la proteína TSSAII-Sp permitió 'recuperar' (diagnosticar

positivamente) algunos sueros que habían sido diagnosticados como 'negativos' por medio de la TSSAII 'completa' (Fig R16).

El análisis de los sueros en los que se observaba una disminución de la reactividad en presencia del espaciador reveló que la mayor parte de ellos (n=8, 70%) eran diagnosticados como 'negativos' tanto por TSSAII-Sp como por TSSAII-A y TSSAII-B (Fig R15). Estos resultados indican que los epitopes A y B no resultan estar bien definidos para este grupo en particular. Si bien no lo hemos explorado, la reactividad positiva contra TSSAII 'completa' para estos sueros podría estar dirigida contra un epitope 'solapado' entre las secuencias de los epitopes A y B y/o entre alguno de los dos epitopes y residuo/s por fuera de las posiciones 34-50. La presencia de un neo-epitope reconocido por estos sueros y formado exclusivamente por residuos por fuera de las posiciones 34-50 también podría explicar estos resultados, aunque no favorecemos esta hipótesis debido a que estas regiones son muy conservadas entre isoformas (Fig R2).

La proporción de sueros para los que los epitopes A y B no resultan estar bien definidos es mayor para TSSAIII (25% de los casos) y, sobre todo, para TSSAIV (55% de los casos) (Fig R17). Nuestra hipótesis es que esto podría deberse a que las secuencias de los epitopes de estas isoformas no fueron determinadas experimentalmente sino inferidas a partir de las de TSSAII. En este sentido, el mapeo antigénico detallado de las otras isoformas de TSSA (TSSAIII, TSSAIV, y especialmente TSSAI) usando poblaciones de sueros con distinto sesgo epidemiológico es fundamental.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a la caracterización antigénica de TSSA y, sobre todo, aportan información valiosa y posibles herramientas para la mejora de los protocolos de serodiagnóstico y serotipificación basadas en esta molécula.

Conclusiones

- Se diseñó, expresó, purificó y evaluó serológicamente un set de proteínas TSSA recombinantes conteniendo diferentes configuraciones epitópicas.
- La población de sueros analizada resultó más reactiva contra TSSAII, lo que era esperable de acuerdo a su sesgo epidemiológico.
- La población de sueros analizada mostró reactividad exclusiva para TSSAII o reactividad 'cruzada' para TSSAII y TSSAIII y/o TSSAIV.
- Los epitopes A y B de TSSAII pudieron ser validados y resultaron bien definidos para la mayoría de los sueros evaluados. Esto no se extiende a las otras isoformas evaluadas, sobre todo a TSSAIV.
- El epitope A de TSSAII es más prevalente y genera mayores reactividades que el epitope IIB. Esta jerarquía inmunológica se extiende a los epitopes de las isoformas TSSAIII y TSSAIV.
- Los epitopes A de TSSA muestran mayor promiscuidad de reconocimiento serológico en comparación con los epitopes B, que son más específicos.
- El agregado del espaciador en TSSAII mejora la performance diagnóstica de esta molécula (aumenta la reactividad de los sueros TSSAII-reactivos de epitotipo AB y permite el rescate de sueros 'falsos negativos').

Anexos

Tabla Suplementaria 1: Diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Adaptado de [83].*

Type of test	Diagnostic use	Reagents storage and transportation	Sample	Limit of detection	Quantitative results	Clinical sensitivity	Clinical specificity	Observations
Parasitological								
Fresh blood	Acute CD	NA	5–10 mL peripheral whole blood	>500 par/mL	No	<40%	>98%	Low complexity, but microscopy required; 15–30 min per preparation.
Strout	Acute CD	NA	5–10 mL peripheral whole blood	NA	No	<50%	>98%	Low complexity. Involves two centrifugation steps before microscopy. Ideally, it should be done within 2 h of blood collection.
MH/MM	Acute CD, congenital CD	NA	0.3–0.6 mL whole blood	>50 par/mL	No	50%	>98%	Same as the other parasitological methods, it is microscopy-based, operator dependent, has a low throughput (15–30 min per determination), and the time elapsed between sample collection and examination is critical.
Molecular								
PCR	a) Acute CD and infection reactivation, congenital CD b) Post-treatment follow-up	Reagents must be transported and stored at -20 °C	a) 1–5 mL whole blood (EDTA or GEB treated), biopsy samples, cerebrospinal fluid b) 1–5 mL whole blood (EDTA anticoagulated)	0.5 to 1 par/mL depending on DTU	Yes, upon including standard curve	70–98% Acute and congenital CD; 50–65% in untreated chronic CD	>98%	rtPCR assays based on satDNA or kDNA sequences. Require expensive equipment and molecular biology level facility, highly trained personnel, and the cost of reagents is high (single determination 35–70 USD).
LAMP	Acute CD, including congenital CD	Room temperature, no cold chain required	a) 30 µL liquid whole blood anticoagulated with heparine b) Single 3–6 mm punch of whole blood DBS in filter paper	a) 1 to 5 par/mL depending on DTU b) 10 to 20 par/mL depending on DTU	No	93–97%	>94%	LAMP assay based on satDNA sequence. POC test, no major or expensive equipment required. Feasible at low-resource settings. ASSURED compliance. Still need to be validated as a tool for treatment follow-up. Estimate cost range 8–12 USD per determination.
Serological^a								
HAI	Congenital CD > 9 months Chronic CD	Refrigerated	Serum	NA	Yes	73–99%	60–97%	Lower cost and no need of equipment make of HAI a first diagnostic option in vast areas endemic to CD. But poorer performance than ELISA or IIF assays described.
ELISA	Congenital CD > 9 months Chronic CD	Refrigerated	Serum or plasma	NA	Yes	28–99%	>96%	Better to use spectrophotometer for read out. Generally have a high performance with Se/Sp > 95%; in regions like Bolivia the agreement between ELISAs is nearly perfect, but in Central America and Mexico Se is <80%. Market cost per determination <3 USD.
IIF	Congenital CD > 9 months Chronic CD	Refrigerated	Serum or plasma	NA	Yes	NA ^b	NA ^b	Low throughput. Requires of fluorescent microscope and trained personnel. Used as tiebreaker test in reference laboratories; it is labor-intensive and often based on in-house protocols.
CMIA	Congenital CD > 9 months Chronic CD Blood bank screening	Refrigerated	Serum or plasma	NA	Yes	>99%	>99%	High throughput capacity, operator-independence, and automated functionality make it highly suitable for blood bank screening. High cost of equipment and reagents limits its use to centralized blood banks and high-resource settings.
(Continued from previous page)								
RDTs	Congenital CD > 9 months Chronic CD	No cold chain	5–100 µL whole blood finger-pricked	NA	No	27–99%	87–97%	POC tests with results turnaround within 1 h; easy-to-use and no equipment required. Performance feasible at low-resource settings (ASSURED compliance), and market costs ranging 2 to 8 USD per single test.

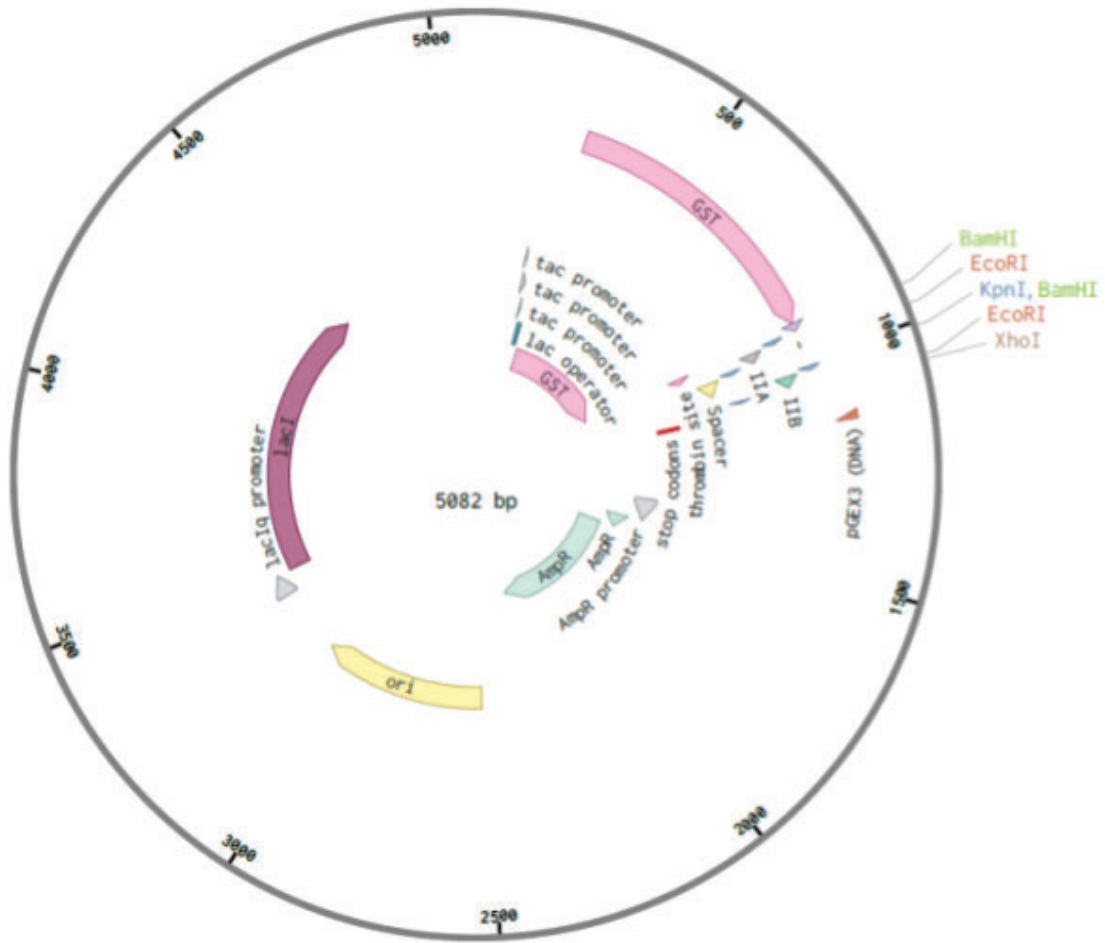


Figura Suplementaria 1: Mapa del plásmido pGEX-TSSAII-Sp. Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción de interés en este trabajo (EcoRI - naranja, BamHI - verde, XhoI - rosado, KpnI - celeste), las secuencias codificadas en este plásmido (GST, LacI, AmpR, epitopes TSSAII-A y TSSAII-B, espaciador), los promotores y el origen de replicación.

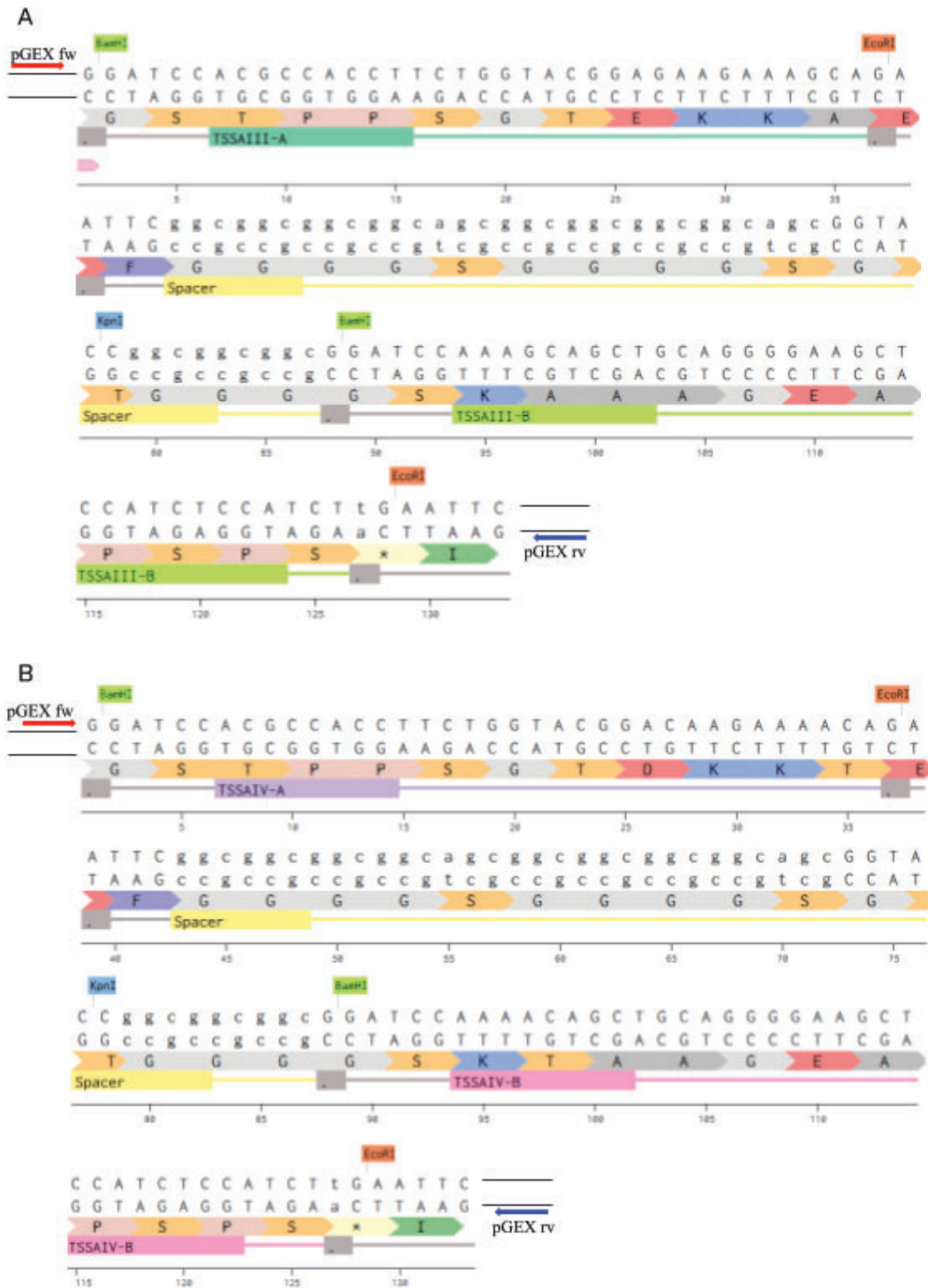


Figura Suplementaria 2: Estructura de los constructos contenidos en los vectores pGEX-TSSAIII-Sp y -TSSAIV-Sp. A y B. Secuencia de ADN (arriba) y proteína (debajo) de los distintos 'módulos': epitopes A (III-A verde oscuro y IV-A violeta oscuro), espaciador (spacer, en amarillo), epitopes B (III-B verde claro, IV-B violeta claro) y secuencias conectoras (gris) en pGEX-TSSAIII-Sp (A) y -TSSAIV-Sp (B). Se indican los sitios de restricción relevantes y los sitios de pegado de los oligonucleótidos pGEXfw (rojo) y pGEXrev (azul). Los nucleótidos en minúsculas no corresponden a TSSA ni a sitios de restricción.

TSSAII-A:

```
1080 1161
pGEX-II-5p CCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGGTGGATCCACGCCACCTTCTGGTACGGAAAAATAACCAGAATTCTgaACTCGA
pGEXfw → CCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGGTGGATCCACGCCACCTTCTGGTACGGAAAAATAACCAGAATTCTGAACTCGA
pGEXrv → AGAGGGTAAAAATGCTATCTGCTCTGGGTGATCCGCCACCCTCTGGTACGGAAATAAACCAAAATCTGAACTCGA
.....
1162 1215
pGEX-II-5p GCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG
pGEXfw → GCGGCCGCATCGTGCTGCTGACGATCTGCCTCGCGCGCTTTCGGTGATGACGG
pGEXrv → GCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG
.....
```

TSSAII-B

```
1144 1206
pGEX-II-5p aACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTG
pGEXfw → AACCGAGCGGCCGCATCGTGCTGCTGACCGAGCCNCAAGACGGAGTAGGGATGCTCCG
pGEXrv → AACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTG
.....
```

TSSAIII-A:

```
1100 1181
pGEX-III-5p ATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGA AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
pGEXfw → ATCTGCCTCGCCGCTTCGGTGAATAAGC
pGEXrv → ATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGA AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
.....
1182 1203
pGEX-III-5p CGGATGCCGGGAGCAGACAAGC
pGEXfw → -----
pGEXrv → CGGATGCCGGGAGCAGACAAGC
.....
```

TSSAIII-B:

```
2471 2552
pGEX-III-5p ATCTGGTTCGCGGTGGATCCAAAAGCAGCTGCAGGGGAAGCTCCATCTCCATCTTGAATTCTgaACTCGAGCGGCCGCATCGT
pGEXfw → ATCTGGTTCGCGGTGGATCCAAAAGCAGCTGCAGGGGAAGCTCCATCTCCATCTTGAATTCTGAACTCGAGCGGCCGCATCGT
pGEXrv → TCGGTTCGCGGTGGATCCAAAAGCAGCTGCAGGGGAAGCTCCATCTCCATCTTGAATTCTGAACTCGAGCGGCCGCATCGT
.....
2553 2562
pGEX-III-5p GACTGACTGA
pGEXfw → GACTGACTGA
pGEXrv → GACTGACTGA
.....
```

TSSAIV-A:

pGEX-IV-Sp 1112 1193
 CTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCACGCCACCTTCTGGTACGGACAAGAAAACAGAATTCTgaACTCGAGCGGC
 pGEXfw → CTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCACGCCACCTTCTGGTACGGACAAGAAAACAGAATTCTGAACTCGAGCGGC
 pGEXrv → GGC TCAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCACGCCACCTTCTGGTACGGACAAGAAAACAGAATTCTGAACTCGAGCGGC

pGEX-IV-Sp 1194 1242
 CGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG
 pGEXfw → CGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTCCGGAGAAAAGG
 pGEXrv → CGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG

TSSAIV-B:

pGEX-IV-Sp 1085 1166
 CATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCAAAACAGCTGCAGGGGAAGCTCCATCTCCATCTtGAATTCTgaACT
 pGEXfw → CATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCAAAACAGCTGCAGGGGAAGCTCCATCTCCATCTTGAATTCTGAACT
 pGEXrv → CAAGC CAAA TCGG TACTGG GTTCCGCGTGGATCCAAAACAGCTGCAGGGGAAGCTCCATCTCCATCTTGAATTCTGAACT

pGEX-IV-Sp 1167 1195
 CGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGA
 pGEXfw → CGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGA
 pGEXrv → CGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGA

Figura Suplementaria 3: Secuenciación de los clones obtenidos por colony-PCR. Alineamiento de la secuencia teórica del plásmido pGEX-TSSA-Sp para la isoforma correspondiente (arriba) con las secuencias obtenidas con el oligonucleótido forward (pGEXfw, rojo) y reverse (pGEXrv, azul). Las posiciones en rojo indican los "mismatches" observados entre las secuencias teóricas y experimentales.

Bibliografía

1. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27: 347–382.
2. Buscaglia CA, Kissinger JC, Agüero F. Neglected Tropical Diseases in the Post-Genomic Era. *Trends Genet.* 2015;31. doi:10.1016/j.tig.2015.06.002
3. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010;115. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.003
4. Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). En: Organización Mundial de la Salud [Internet]. Abr 2024 [citado 22 Nov 2024]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
5. Durães-Oliveira J, Palma-Marques J, Moreno C, Rodrigues A, Monteiro M, Alexandre-Pires G, et al. Chagas Disease: A Silent Threat for Dogs and Humans. *Int J Mol Sci.* 2024;25: 3840.
6. Cámara MLM, Balouz V, Centeno CC, Cori CR, Kashiwagi GA, Gil SA, et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins are involved in the attachment to the *Triatoma infestans* rectal ampoule. *PLoS neglected tropical diseases.* 2019;13. doi:10.1371/journal.pntd.0007418
7. Moretti NS, Mortara RA, Schenkman S. *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 2020;36. doi:10.1016/j.pt.2019.10.002
8. Teixeira ARL, Gomes C, Lozzi SP, Hecht MM, Rosa A de C, Monteiro PS, et al. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. *Cad Saúde Pública.* 2009;25: S32–S44.
9. American Trypanosomiasis. 14 Jun 2021 [citado 24 Oct 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
10. Peña-Callejas G, González J, Jiménez-Cortés JG, Fuentes-Vicente JA de, Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres MI, et al. Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *Típica.* 2022;25. doi:10.22201/fesz.23958723e.2022.449
11. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2018;391. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4
12. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;1. doi:10.1016/S1473-3099(01)00065-2
13. Lascano F, García BF, Altchek J. Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. *Br J Clin Pharmacol.* 2022;88. doi:10.1111/bcp.14700
14. Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Advances in parasitology.* 2017;97. doi:10.1016/bs.apar.2016.10.001
15. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization; 21 Sep 2012 [citado 15 Oct 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-975>
16. Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, Garg NJ, Engman DM. Pathology and pathogenesis of

Chagas heart disease. *Annu Rev Pathol.* 2019;14: 421–447.

17. Mora G. Chagas cardiomyopathy. *European Society of Cardiology.* 2016;14. Disponible en: <https://www.escardio.org/Journals/E-Journal-of-Cardiology-Practice/Volume-14/Chagas-cardiomyopathy>
18. Matsuda NM, Miller SM, Evora PR. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics .* 2009;64. doi:10.1590/S1807-59322009001200013
19. Hajduk S, Ochsenreiter T. RNA editing in kinetoplastids. *RNA Biol.* 2010;7. doi:10.4161/rna.7.2.11393
20. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36. doi:10.1590/s0037-86822003000600024
21. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
22. Flores-Chavez MD, Abras A, Ballart C, Perez II, Perez-Gordillo P, Gállego M, et al. Evaluation of the Performance of the Loopamp *Trypanosoma cruzi* Detection Kit for the Diagnosis of Chagas Disease in an Area Where It Is Not Endemic, Spain. *Journal of Clinical Microbiology.* 2021. doi:10.1128/jcm.01860-20
23. Besuschio SA, Picado A, Muñoz-Calderón A, Wehrendt DP, Fernández M, Benatar A, et al. *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2020;14: e0008402.
24. Suárez C, Nolder D, García-Mingo A, Moore DAJ, Chiodini PL. Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. *Research and Reports in Tropical Medicine.* 2022;13: 25.
25. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009
26. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Da Silva F M, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology.* 2009;136. doi:10.1017/S0031182009005861
27. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10. doi:10.1371/journal.pntd.0004792
28. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 2018;184. doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017
29. Dario MA, Rodrigues MS, Barros JH da S, Xavier SC das C, D'Andrea PS, Roque ALR, et al. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors.* 2016;9: 1–14.

30. Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, et al. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9: e0003765.
31. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. *Acta Trop*. 2016;157: 145–150.
32. Velásquez-Ortiz N, Herrera G, Hernández C, Muñoz M, Ramírez JD. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Scientific Data*. 2022;9: 1–8.
33. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81. doi:10.1016/0035-9203(87)90020-4
34. Herreros-Cabello A, Callejas-Hernández F, Gironès N, Fresno M. *Trypanosoma Cruzii* Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. *Genes* . 2020;11. doi:10.3390/genes11101196
35. Sánchez-Guillén M del C, Bernabé C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J, Totolhua J-L, Méndez-López J, et al. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101: 585–590.
36. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13. doi:10.1586/14787210.2015.1056158
37. Acosta L.R.. Relación entre Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas. Bernal Rosas YE, Torres García OA, editors. Universidad Antonio Nariño. 2021. Disponible en: <https://repositorio.uan.edu.co/server/api/core/bitstreams/cb0a0a26-ac65-4255-bb8c-ffd407f1524a/content>
38. Tibayrenc M, Ayala FJ. The population genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model. *Acta tropica*. 2015;151. doi:10.1016/j.actatropica.2015.05.006
39. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Am MJ, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5. doi:10.1371/journal.pntd.0000931
40. Lewis, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;81. doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0305
41. Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR, et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *BioMed research international*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/284729

42. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and biochemical parasitology*. 1999;100. doi:10.1016/s0166-6851(99)90035-x
43. Braun SD, Müller E, Frankenfeld K, Gary D, Monecke S, Ehrlich R. A Proof-of-Concept Protein Microarray-Based Approach for Serotyping of *Salmonella enterica* Strains. *Pathogens*. 2024;13: 355.
44. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10. doi:10.1586/eri.12.76
45. Arranz-Solís D, Carvalheiro CG, Zhang ER, Grigg ME, Saeij JPJ. Toxoplasma GRA Peptide-Specific Serologic Fingerprints Discriminate Among Major Strains Causing Toxoplasmosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11: 621738.
46. Banerji S, Simon S, Tille A, Fruth A, Flieger A. Author Correction: Genome-based *Salmonella* serotyping as the new gold standard. *Sci Rep*. 2020;10: 10776.
47. Tessema SK, Nakajima R, Jasinskas A, Monk SL, Lekieffre L, Lin E, et al. Protective Immunity against Severe Malaria in Children Is Associated with a Limited Repertoire of Antibodies to Conserved PfEMP1 Variants. *Cell Host Microbe*. 2019;26: 579–590.e5.
48. Andrade Guzman OS, Vintimilla Rojas DA, Vallecillo Maza AJ, Agreda Orellana IS, Haro Haro AN, Vintimilla Rojas AE. Tipificación molecular de especies de *Brucella* en ganaderías lecheras de la provincia del Azuay – Ecuador. 2023. doi:10.52973/rcfcv-e33239
49. Soto-Fuenzalida GA, Hernández-Hernández JA, López-Sánchez R del C, Aguayo-Millán CD, Villela-Martínez LM, Espino-Rodríguez M, et al. Tipificación de serotipos del virus del papiloma humano de alto riesgo. *Ginecol obstet Méx*. 2020;88: 659–666.
50. Alessio GD, de Araújo FF, Côrtes DF, Júnior PAS, Lima DC, de Souza Gomes M, et al. Performance of TcI/TcVI/TcII Chagas-Flow ATE-IgG2a for universal and genotype-specific serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11: e0005444.
51. Alessio GD, de Araújo FF, Silva JS, Júnior PAS, de Souza Gomes M, do Amaral LR, et al. Human Chagas-Flow ATE-IgG1 for advanced universal and *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units-specific serodiagnosis of Chagas disease. *Scientific reports*. 2020;10. doi:10.1038/s41598-020-69921-z
52. Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195. doi:10.1084/jem.20011433
53. Cánepa GE, Mesías AC, Yu H, Chen X, Buscaglia CA. Structural Features Affecting Trafficking, Processing, and Secretion of *Trypanosoma cruzi* Mucins. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287: 26365–26376.
54. Cánepa GE, Degese MS, Budu A, Garcia CR, Buscaglia CA. Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *The Biochemical journal*. 2012;444. doi:10.1042/BJ20120074

55. Cámara MLM, Cánepa GE, Lantos AB, Balouz V, Yu H, Chen X, et al. The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates *Trypanosoma cruzi* infectivity and differentiation. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11. doi:10.1371/journal.pntd.0005856
56. Carmona SJ, Nielsen M, Schafer-Nielsen C, Mucci J, Altcheh J, Balouz V, et al. Towards High-throughput Immunomics for Infectious Diseases: Use of Next-generation Peptide Microarrays for Rapid Discovery and Mapping of Antigenic Determinants. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2015;14. doi:10.1074/mcp.M114.045906
57. Balouz V, de los Milagros Cámara M, Cánepa GE, Carmona SJ, Volcovich R, Gonzalez N, et al. Mapping Antigenic Motifs in the Trypomastigote Small Surface Antigen from *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2015 [citado 12 Nov 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CVI.00684-14>
58. Bhattacharyya T, Brooks J, Yeo M, Carrasco HJ, Lewis, Llewellyn MS, et al. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *International journal for parasitology*. 2010;40. doi:10.1016/j.ijpara.2010.01.002
59. Balouz V, Bracco L, Ricci AD, Romer G, Agüero F, Buscaglia CA. Serological Approaches for *Trypanosoma cruzi* Strain Typing. *Trends in parasitology*. 2021;37. doi:10.1016/j.pt.2020.12.002
60. De Marchi CR, Di Noia JM, Frasc ACC, Neto VA, Almeida IC, Buscaglia CA. Evaluation of a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Mucin-Like Antigen for Serodiagnosis of Chagas' Disease. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18: 1850.
61. Ricci AD, Bracco L, Salas-Sarduy E, Ramsey JM, Nolan MS, Lynn MK, et al. The *Trypanosoma cruzi* Antigen and Epitope Atlas: antibody specificities in Chagas disease patients across the Americas. *Nature communications*. 2023;14. doi:10.1038/s41467-023-37522-9
62. Macchiaverna NP, Enriquez GF, Buscaglia CA, Balouz V, Gürtler RE, Cardinal MV. New human isolates of *Trypanosoma cruzi* confirm the predominance of hybrid lineages in domestic transmission cycle of the Argentinean Chaco. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2018;66. doi:10.1016/j.meegid.2018.10.001
63. del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, et al. Lineage Analysis of Circulating *Trypanosoma cruzi* Parasites and Their Association with Clinical Forms of Chagas Disease in Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4: e687.
64. Rodrigues-Dos-Santos Í, Melo MF, de Castro L, Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PEAA, Silvestre de Sousa A, et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12: e0006939.
65. Cimino RO, Rumi MM, Ragone P, Lauthier J, D'Amato AA, Quiroga IR, et al. Immuno-enzymatic evaluation of the recombinant TSSA-II protein of *Trypanosoma cruzi* in dogs and human sera: a tool for epidemiological studies. *Parasitology*. 2011;138. doi:10.1017/S0031182011000540
66. Risso MG, Sartor PA, Burgos JM, Briceño L, Rodríguez EM, Guhl F, et al. Immunological Identification of *Trypanosoma cruzi* Lineages in Human Infection Along the Endemic Area.

The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2011;84: 78.

67. Romer G. Caracterización antigénica y análisis genómico de TSSA (trypomastigote small surface antigen) de *T. cruzi*. Balouz V, Buscaglia CA, Agüero F, editors. Universidad de San Martín. 2021.
68. Romer G, Bracco LA, Ricci AD, Balouz V, Berná L, Villar JC, et al. Deep serological profiling of the *Trypanosoma cruzi* TSSA antigen reveals different epitopes and modes of recognition by Chagas disease patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2023;17: e0011542.
69. Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). World Health Organization. 2024. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
70. Benchling [Biology Software]. Disponible en: www.benchling.com
71. Genscript [Gene Synthesis Service]. Disponible en: <https://www.genscript.com/gene-synthesis-service>
72. Wolf L, Barric J, Suarez G, Li V, Rodriguez A. Ethanol Precipitation. Barric Lab. 2021. Disponible en: <https://barricklabb.org/twiki/bin/view/Lab/ProtocolsEthanolPrecipitation>
73. Weiss B, Jaquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC. Enzyme breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia Coli* infected with bacteriophage T4. *Biol Chem*. 1968. 10;243(17):4542-55. PMID: 4879167.
74. Sambrook J, Russell DW. The inoue method for preparation and transformation of competent *e. Coli*: “ultra-competent” cells. *CSH Protoc*. 2006;2006. doi:10.1101/pdb.prot3944
75. Colony PCR Protocol. Sigma Aldrich. 2024. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/AR/es/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/colony-pcr>
76. Joseph BC, Pichaimuthu S, Srimeenakshi S. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Cell Sci Ther*. 2015;06. doi:10.4172/2157-7013.1000221
77. Protein A280, Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. 2024. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Warranties/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Protein-Technical-Guide-EN.pdf>
78. Varadi M, Bertoni D, Magana P, Paramval U, Pidruchna I, Radhakrishnan M, et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res*. 2024;52: D368–D375.
79. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA. 2020. Available: <http://www.rstudio.com/>.
80. O’Connor J. Matriz de puntuación BLOSUM62 para sustituciones de aminoácidos. En: *Investigaciones en Biología Celular y Molecular (Capítulo: 9.5)*. 2022. Disponible en: [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Biolog%C3%ADa_Celular_y_Molecular/Libro%3A_Investigaciones_en_Biolog%C3%ADa_Celular_Molecular_\(O'Connor\)/09%3A_Conservaci%C3%B3n_](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Biolog%C3%ADa_Celular_y_Molecular/Libro%3A_Investigaciones_en_Biolog%C3%ADa_Celular_Molecular_(O'Connor)/09%3A_Conservaci%C3%B3n_)

de_Prote%C3%ADnas/9.05%3A_Matriz_de_puntuaci%C3%B3n_BLOSUM62_para_sustituciones_de_amino%C3%A1cidos

81. Prueba T para muestras independientes y dependientes. IBM. 2024. Disponible en: <https://www.ibm.com/docs/es?spss-statistics/saas?topic=tests-independent-samples-t-test>
82. Liu Q, Li J, Li R-L, Ma Y-T, Zhou P-L, Gao W-W, et al. Expression and immunoreactivity of a recombinant multi-epitope antigen designed based on four major structural proteins of avian infectious bronchitis virus. *3 Biotech.* 2020;10. doi:10.1007/s13205-020-2079-8
83. Schijman AG, Alonso-Padilla J, Britto C, Bernal CPH. Retrospect, advances and challenges in Chagas disease diagnosis: a comprehensive review. *The Lancet Regional Health – Americas.* 2024;36. doi:10.1016/j.lana.2024.100821

Aclaración:

Este archivo corresponde a la versión final del manuscrito de la Tesis de Licenciatura en Biotecnología con las sugerencias y correcciones del jurado incorporadas.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. Rojas', written in a cursive style.

Firma del Director

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J.M.S.', written in a cursive style.

Firma del Alumno Tesista

