



**XXX Reunión de la
Sociedad Argentina
de Protozoología**
Resistencia, Chaco

1al 3 de noviembre de 2018

Comité Organizador

Presidente: Dr. Horacio Lucero

Miembros: Dr. Luis Merino
Mgtr. Bettina Brusés
Mgtr. Laura Formichelli
Dra. Fernanda Tracogna
Dra. María E. Cattana
Téc. Alejandra Vallejos Benítez
Prof. Mariana Climent
Téc. Sebastián Alonso

Comité Científico

Presidente: Dra. Fernanda M. Frank

Miembros: Dra. Catalina Alba Soto
Dra. Patricia B. Petray
Dra. Paula A. Sartor
Dra. María Laura Belaunzarán
Dra. Paola Zago
Dra. Maria Victoria Cardinal
Dra. Salomé C. Vilchez Larrea
Dr. Guillermo D. Alonso

Sociedad Argentina de Protozoología Comisión Directiva

Presidente: Dra. Silvina Wilkowsky
Vicepresidente: Dra. Adelina Riarte
Secretaria: Dra. Karina Gómez
Pro-Secretaria: Dra. Mónica Esteva
Tesorera: Dra. Silvia Fernández Villamil
Pro-Tesorera: Dra. Silvia Longhi
Vocales: Dr. Claudio Pereira
Dra. Paola Zago

Índice general

Jueves 1 de Noviembre	9
Taller	9
¿Cómo hablamos y qué decimos cuando hablamos de Chagas?	9
Conferencias	9
Actualización sobre el tratamiento de la Enfermedad de Chagas Humana	9
Mesas Redondas	10
¿Podemos hablar de cura en la enfermedad de Chagas?	10
Avances y desafíos en el control de <i>T. infestans</i> en Argentina	12
Viernes 2 de Noviembre	15
Mesas Redondas	15
Biología Parasitaria	15
Epidemiología y Vectores	17
Diagnóstico	21
Inmunología	24
Pósters	26
Biología Parasitaria	26
2 - Caracterización bioquímica y molecular de las proteínas TolT de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
4 - Disrupción del metabolismo de ADP-ribósidos en <i>T. cruzi</i> por CRISPR/Cas9: Alteración en la respuesta al daño genómico y progresión del ciclo celular	27
6 - ESCRT III Complex in Trypanosomatids: unraveling the role of Vps32 in membrane scission required processes	28
8 - Función biológica de la histona H2B.Z de <i>Toxoplasma gondii</i>	29
10 - Identificación de nuevos inhibidores del transporte de poliaminas en <i>Trypanosoma cruzi</i> reposicionados como drogas tripanocidas	29
12 - Nucleosome positioning and histone methylation in <i>Trypanosoma cruzi</i>	30

14 - Presencia y posible funcionalidad de la Poli (ADP-ribosa) polimerasa en el nucléolo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
16 - RNA-seq analysis on <i>TcHMGB</i> -overexpressing epimastigotes: a role in <i>T. cruzi</i> chromatin structure and transcription control	31
18 - TcVps34-Vps15 complex is involve in autophagy and promotes metacyclogenesis in <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
20 - Trypomastigote small surface antigen ablation causes infection impairment in <i>Trypanosoma Cruzi</i>	32
Epidemiología y Vectores	33
2 - Asociación entre asimetría fluctuante alar y la exposición a insecticidas piretroides en <i>Triatoma infestans</i> de un área con moderada resistencia a piretroides	33
4 - Cuando camina sobre una superficie tratada con permetrina, una ninfa de <i>Triatoma infestans</i> hiperactivada por eugenol se intoxica más rápido que una ninfa no hiperactiva	34
6 - Diversidad genética en poblaciones de <i>Triatoma Infestans</i> de la región chaqueña argentina con distintos grados de resistencia a insecticidas	34
8 - Estudio del riesgo de coinfección entre helmintos transmitidos por el suelo. ¿Todas las especies cenan en el mismo lugar?	35
10 - Influencia del reloj biológico en la expresión de genes relacionados con la resistencia a insecticidas en <i>Triatoma infestans</i>	36
12 - Presencia y distribución de flebótomos en parajes rurales de Orán	36
14 - Variación fenotípica a macro-escala en poblaciones de <i>Triatoma infestans</i> del Gran Chaco boliviano, paraguay y Monte argentino	37
16 - Estudio de la fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) y detección de ADN de <i>Leishmania</i> en ambiente urbano de la ciudad de Corrientes	38
18 - Infectividad a <i>Triatoma infestans</i> mediante xenodiagnóstico artificial en personas seropositivas de dos áreas endémicas para la enfermedad de Chagas	39
20 - Prevalencia de anticuerpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> en la Ciudad de Chascomús	39
Inmunología	40
2 - Análisis de la activación celular y la expresión de marcadores de respuesta exhausta en linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica	40
4 - Cambios en la frecuencia de células productoras de IFN- γ específicas para <i>Trypanosoma cruzi</i> luego de la administración <i>in vitro</i> de IL-7, IL-27 e IL-15	41

6 - Caracterización de vesículas extracelulares como mediadores en la comunicación de células dendríticas y <i>T. cruzi</i> in vitro	41
8 - Impacto del bloqueo de CD40-CD40L en la génesis de la patología chagásica	42
10 - Participación de la autofagia inducida por ácido ursólico en la eliminación de <i>Trypanosoma cruzi</i> en macrófagos	43
12 - La vía AMPc-Epac estaría involucrada en la entrada del parásito y a la alteración de la respuesta en Células Dendríticas humanas infectadas con <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
14 - Proteínas antigénicas semipurificadas desde una línea celular de <i>Echinococcus granulosus</i> G1, EGPE, son reconocidas por sueros de pacientes infectados	44
16 - De la brucelosis a la tripanosomiasis: la Omp19 como un inmunomodulador de la respuesta frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
18 - La subfamilia TcTASV-C de <i>Trypanosoma cruzi</i> junto con uOmp19 genera protección contra una infección letal del parásito	45
20 - Respuesta inmune celular y humoral tras la inmunización en mucosa oral o nasal: estrategias para el desarrollo de una vacuna anti- <i>T. cruzi</i>	46
Diagnóstico y Tratamiento	47
2 - Adherencia a los controles médicos en la Enfermedad de Chagas (ECH) en un área urbana de Buenos Aires, Argentina	47
4 - Control integral de la Enfermedad de Chagas en el departamento de Quitilipi de la Provincia del Chaco	48
6 - Desarrollo de una técnica de diagnóstico molecular para la detección simultánea de <i>Trypanosoma vivax</i> y <i>Trypanosoma evansi</i>	48
8 - Ensayo de susceptibilidad a Metronidazol en aislamientos de <i>T. foetus</i> por citometría de flujo	49
10 - Fine mapping of <i>Trypanosoma cruzi</i> epitopes using high-density peptide chips: alanine and length scans	50
12 - Identificación de polifenoles con actividad trypanocida mediante el uso de herramientas computacionales	50
14 - A 3D Printer based DNA extraction method for molecular diagnosis of Chagas disease	51
16 - Nanotecnología aplicada al mejoramiento del perfil de disolución de benznidazol	52
18 - Urticaria crónica y asma en un paciente con Toxocariosis	52
7 - Efectos de nanoformulaciones de benznidazol sobre <i>Trypanosoma cruzi</i> y sobre la progresión de la patología cardíaca en la infección crónica murina	53

22 - Diagnóstico molecular de estrongiloidosis en pacientes con eosinofilia	54
24 - Evaluación biológica de nuevos compuestos anti- <i>T. cruzi</i> basados en paladio y platino . .	55
26 - Mecanismos de acción de derivados sintéticos del alcaloide indólico tetrahidro- β -carbolina con actividad tripanocida	55
28 - Valoración de los datos clínicos en el diagnóstico de parásitos intestinales por métodos coproparasitológicos	56
Sábado 3 de Noviembre	58
Conferencias	58
Extracellular vesicles: a new language in cellular communicattion during parasite host cell interaction	58
Mesas Redondas	58
Bioquímica y Biología Molecular	58
Búsqueda de Fármacos	61
Vacunas-Inmunología	64
Herramientas de Biología Molecular	67
Pósters	70
Biología Parasitaria	70
3 - Diseminación de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en cultivos tridimensionales . . .	70
5 - Efecto de daunorubicina y doxorubicina en el transporte de poliaminas y la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
7 - Estudio comparativo del rol de la proteína TcHTE de <i>Trypanosoma cruzi</i> en el transporte de hemina y hemoglobina	71
9 - Functional characterization of the Cest Motif (Chaperone for the <i>E. Coli</i> secretion of TIR) in Trypanosomatids	72
11 - Molecular and Biochemical Characterization of Adenosine Deaminases acting on tRNA of <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
13 - Perfil proteico de vesículas extracelulares y proteínas solubles secretadas por <i>Echinococcus</i> <i>granulosus</i> s. l. y <i>Echinococcus multilocularis</i>	73
15 - Puesta a punto y establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de amastigotas axénicos de <i>Trypa-</i> <i>nosoma cruzi</i> como posible modelo de estudio de amastigotas celulares	74
17 - TcAMPK: Identification and characterization of a cellular energy homeostasis hub regu- lator in <i>Trypanosoma cruzi</i>	74

19 - Tripanosomátido en canino de paraje Ensenada, departamento de San Cosme, Corrientes, Argentina	75
21 - Análogos estructurales del cristal violeta inhiben el transportador de prolina TcAAAP069 de <i>Trypanosoma cruzi</i> y presentan actividad tripanocida	76
23 - Polimorfismo de genes asociados en la generación de resistencia a fármacos nitroheterocíclicos en <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
Epidemiología y Vectores	77
1 - Aplicación de fumígenos en triatominos resistentes a piretroides: Una alternativa de control	77
3 - Correlación entre la prevalencia de uncinarias y <i>strongyloides stercoralis</i> – ¿una nueva herramienta diagnóstica en salud pública?	78
5 - Development of duplex TaqMan PCR assays for detection and quantification of <i>Trypanosoma cruzi</i> infection in wild and domestic reservoirs	78
7 - Estructura genética y detección de migrantes de <i>Triatoma infestans</i> (Reduviidae: Hemiptera) en el Chaco argentino	79
9 - Geolocalización de los genotipos de <i>Trypanosoma cruzi</i> detectados en infectados crónicos del noreste argentino. Asociación con variables bioclimáticas	80
11 - Oportunidades de prevención de la leishmaniasis tegumentaria en el norte de Argentina .	81
13 - Toxocariosis humana en el NEA: Relevamiento epidemiológico 1998-2018	81
15 - Chagas Congénito: Relevamiento del diagnóstico y situación clínico epidemiológica del binomio madre infectada - hijo en centros de salud de Santa Fe	82
17 - Identificación de criaderos y presencia de <i>Schistosoma mansoni</i> en el género <i>Biomphalaria</i> en colecciones hídricas en la Provincia de Corrientes	83
19 - Prevalencia de anticuerpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> en la Ciudad de Chascomús	83
Inmunología	84
1 - <i>Trypanosoma cruzi</i> infection in human placentas <i>in vitro ex vivo</i> induces the production of pro-inflammatory cytokines	84
3 - Avances en el estudio de células con fenotipo inmunoregulatorio afectadas por el candidato vacunal TSf-ISPA contra el <i>Trypanosoma cruzi</i>	85
5 - Caracterización de poblaciones de linfocitos T con especificidad por epítopes de <i>Trypanosoma cruzi</i> identificados mediante predicción bioinformática	86
7 - Estudio de los marcadores CD24 y CD38 en células B totales y células B10 en sangre periférica de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica	86

9 - Inducción de mediadores inflamatorios cardiopatogénicos por efecto del antígeno GIPL de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la citoquina MIF sobre endotelio vascular	87
11 - La infección experimental causada por <i>Trypanosoma cruzi</i> altera la homeostasis del tejido adiposo	88
13 - Lípidos de promastigotes de <i>Leishmania amazoniensis</i> y su efecto en la polarización de la respuesta macrófaga	89
15 - Uso terapéutico del prototipo vacunal TSf-ISPA para prevenir lesiones cardíacas durante la infección crónica por <i>Trypanosoma cruzi</i>	89
17 - Enfermedad de chagas en inmunosuprimidos: evaluación de riesgo de infección activa y desarrollo de daño de órgano blanco.	90
21 - Anticuerpos específicos contra la arginina quinasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> en pacientes con infección crónica	91
Diagnóstico y Tratamiento	91
1 - LAMP y Enfermedad de Chagas: detección de ADN de <i>T. cruzi</i> y monitoreo de tratamiento en brote por transmisión oral y reactivación por inmunocompromiso	91
3 - Compuestos híbridos de alcaloides con ácidos biliares con propiedades tripanocidas	92
5 - Desarrollo de un test de inmunocaptura de IgM para el diagnóstico de Chagas congénito	93
20 - Validación de dos métodos automatizados para la detección de molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> en muestras de sangre	93
9 - Evaluación de un nuevo inmunoblot comercial para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	94
11 - Identificación de geohelmintos y biohelmintos en pacientes de la Provincia de Corrientes	95
13 - Importancia de la detección molecular en el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea	96
15 - Leishmaniasis cutánea y cromomicosis. Coinfección de dos patologías endémicas de clima subtropical	96
17 - Pacientes con Leishmaniosis Tegumentaria Americana (LTA) y factores de riesgo para leishmaniosis mucosa en pacientes de la provincia de Corrientes	97
19 - Utilización de tarjetas FTA para el diagnóstico de Chagas Congénito	98
21 - Caracterización del N-glicoma serico como potencial fuente de biomarcadores para pronóstico de pacientes con Enfermedad de Chagas crónico	98
23 - Enhidrina y Fluctuanina: Lactonas sesquiterpénicas con actividad antiparasitaria	99
25 - Evaluación de extractos y metabolitos de origen vegetal utilizados en medicina tradicional frente a epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	100

Jueves 1 de Noviembre

Taller

¿Cómo hablamos y qué decimos cuando hablamos de Chagas?

Carrillo C.1,2, Frank F.M.3, Sanmartino M.2,4

1 ICT Milstein, CONICET. CABA, Argentina

2 Grupo “De qué hablamos cuando hablamos de Chagas”, CONICET-UNLP. Argentina

3 IMPaM, CONICET – UBA. CABA, Argentina

4 Grupo de Didáctica de las Ciencias, IFLYSIB, CONICET-UNLP. La Plata, Argentina

Esta propuesta consiste en un taller participativo para pensar el Chagas, y nuestro hacer científico, desde otros lugares y con ojos renovados, asistido por diversos recursos audiovisuales desarrollados por el Grupo de Extensión e Investigación en Ciencias Sociales y Ciencias de la Educación “¿De qué hablamos cuándo hablamos de Chagas?” (www.hablamosdechagas.com.ar).

Objetivos del taller:

- Invitar a reflexionar sobre la complejidad de la problemática de Chagas de manera “caleidoscópica”
- Realizar una mirada crítica sobre discursos clásicos frente a una problemática que cambia
- Reconocer nuestro rol político y social, incluso cuando escribimos subsidios y/o papers

Contenidos. Justificación:

Somos una comunidad que habitualmente se pregunta y problematiza respecto de aspectos biomédicos y/o epidemiológicos sobre el Chagas. Sin embargo, el avance en el conocimiento científico no se refleja tan claramente en un bienestar de las personas directa o indirectamente afectadas por el Chagas.

¿Por qué elegimos trabajar en Chagas? Aquel motivo original ¿se refleja en lo que hacemos?

¿Desde dónde y cómo hablamos del Chagas? ¿Qué decimos? ¿Tiene un impacto social y político nuestra actividad?

Mediante un recorrido interactivo a través de diferentes voces y miradas nos acercarnos de manera dinámica y no convencional a la problemática del Chagas para re-pensar colectivamente por qué y cómo hablar de –y trabajar en- Chagas.

Conferencias

Actualización sobre el tratamiento de la Enfermedad de Chagas Humana

Apt W.

Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico- Programa de Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Desde hacer cerca de 50 años que la terapia para la enfermedad de Chagas (ECh) se basa en la utilización de dos fármacos el benznidazol (BNZ) y el nifurtimox (NF) aceptados por la OMS. El NF actúa por la producción de radicales libres: aniones superóxido, peróxido de hidrogeno y metabolitos electrofilicos, el BNZ inhibe la síntesis proteica y la degradación de la biosíntesis de macromoléculas, ambos producen efectos colaterales especialmente en adultos entre un 30 al 80% de los casos, la mayoría leves y moderadas. La ECh debe ser tratada siempre en el período agudo, crónico indeterminado y determinado en las etapas iniciales e intermedias. La terapia se fundamenta en los casos crónicos en la presencia del DNA del parásito en casos donde la microscopia óptica no los pesquisa. Los casos agudos: adquiridos a través del vector, por vía congénita, accidentales, por reactivación de casos crónicos, por trasplantes, y adquiridos por vía oral, se deben tratar con NF 8mg/k/día ó 10mg/k/día ó con BNZ 5mg/k/día ó 7,5mg/k/día en adultos y niños respectivamente por 60 días excepto en pacientes con ECh crónica que adquieren un SIDA o un agente inmunosupresor en los cuales la terapia se prolonga por lo menos por 6 meses. En los casos crónicos se utilizan los mismos fármacos ya señalados tanto en los casos indeterminados como determinados (cardiópatas chagásicos crónicos).

Nosotros hemos tratados pacientes con ECh crónica en período indeterminado y cardiópatas con itraconazol (ITRA) con “curación” del 20% a 20 años y mejoría del ECG en el 50%. En los últimos años se han agregado al ITRA una serie de otros fármacos antiergosterolicos: posaconazol (POS), ravuconazol (RAV) y fexinidazol (FE). En relación a POS y RAV si bien producen una baja notable de la parasitemia inmediatamente después de ser aplicados, este decrecimiento no se mantiene en el tiempo (Proyectos Stop Chagas, Chagasazol, RAV en Cochabamba, Bolivia). FE se encuentra en estudio clínico en España y sus resultados se conocerán en el 2019. Hasta la fecha no tenemos un fármaco eficiente que cure todos los casos sin efectos secundarios y de bajo precio. Los pacientes con ECh tienen una condición económica precaria y por consiguiente el precio de la terapia es un factor relevante. Creemos que la terapia futura se basará en fármacos antiguos con nuevos esquemas y/o combinación de fármacos ejemplo: BNZ + ITRA; BNZ + FE, etc.

Mesas Redondas

¿Podemos hablar de cura en la enfermedad de Chagas?

Moderadores: Esteva M., Riarte A.

- **Monitoring of parasitological treatment response using molecular methods**

Schijman A.

INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Patients infected with *T. cruzi* and treated with trypanocidal drugs must be followed-up for a period of time, in order to assess if antibodies disappear, which is interpreted as cure, or if Ab titers are coming down, suggesting treatment response. This can be attained in months for neonates or patients treated during the acute phase, demands some years for children treated during a recent chronic phase and for those in late chronic phase, Ab switch or clearance may be observed after decades. Parasitological tests have limited sensitivity and a negative result does not necessarily means parasite eradication, but in contrast, a positive result indicates treatment failure. As promissory alternative highly sensitive reliable molecular methods have been developed and more recently validated and evaluated in clinical trials. Indeed, quantitative PCR techniques are being consistently used to detect therapeutic failure in trials with traditional and novel trypanocidal drugs.

However, clearance can be transient in bloodstream and give misleading conclusions when follow-up is performed at the short term. Due to the intracellular live forms of the parasite, the predictive value of a negative bloodstream-based PCR outcome to assess cure is unknown. Relapses have been observed time after repetitive non-detectable PCR results in clinical trials and follow-up of transplanted patients, so ideally, molecular methods should be performed for several years after treatment to confirm sustained response. Although treatment objective for infectious diseases should be pathogen elimination, it is difficult to assert if in Chagas disease this will be the case. Control and reduction of the

pathogen burden are well-recognized strategies for some other infections and low *T.cruzi* loads have been associated to better response to treatment and to a lower risk of vertical transmission.

On the other hand, further research is needed to elucidate the clinical meaning of DNA detection. Investigation of active transcription of parasite genes in target cells could give a clue regarding parasite viability. Direct molecular detection of parasite genes associated to drug susceptibility, as well as molecular typing of parasite populations during treatment to investigate emergence of resistance subpopulations may aid in treatment planning.

Recent discovery of dormant amastigote subpopulations refractory to drug action may also represent a key factor leading to treatment failure that deserves investigation.

- **Biomarcadores serológicos de eficacia terapéutica. La relevancia del antígeno F29 de *Trypanosoma cruzi***

Riarte A.

Instituto Nacional de Parasitología Dr. M. Fátala Chaben. ANLIS-Malbran. Ministerio de Salud. Argentina

No existe en la actualidad consenso absoluto sobre la validez de biomarcadores, serológicos y/o moleculares, tempranos predictores de eficacia terapéutica, y está en discusión el significado de cura de la enfermedad de Chagas (ECH) dado que son diferentes el efecto tripanocida (ET) del efecto clínico (EC). El ET se refiere a la eliminación de los parásitos de *T.cruzi*, y el EC se refiere a la no progresión clínica ambos potenciales efectos por la acción del tratamiento.

Es un concepto histórico que la serología convencional (SC) se negativiza tardíamente cuando existe ET. Así biomarcadores serológicos no convencionales tempranos podrían ser subrogantes de ET y/o EC.

El antígeno F29 de *T.cruzi* se describió en 1996¹, y se demostró que estaba altamente representado en diferentes aislados de *T.cruzi* (82%). Su uso como biomarcador como ELISA-F29 en un ensayo clínico aleatorizado (ECA) en niños en fase indeterminada de la ECH, tratados con benznidazol (BZN) vs placebo (PL) mostró 62% de seronegativización a 4 años pos tratamiento (pt)². En el 2013 en una cohorte retrospectiva de 29 pacientes adultos tratados con BZN y Nifurtimox vs 37 no tratados se comparó la SC con ELISA-F29 a 23 años pt. Los pacientes BZN fueron seronegativos por ELISA-F29 tanto aquellos con SC negativa como aquellos con reducción de títulos³. Actualmente un ECA a doble ciego (TRAENA) en pacientes adultos tratados con BZN vs PL durante 12 años de seguimiento mostró un claro ET a 5 años pt. En el grupo BZN 38.2% (126/330) de los pacientes fueron seronegativos por ELISA-F29 mientras que 29,1% (96/330) por ELISA convencional. En el grupo PL 10,7% (36/337) fueron negativos por ELISA-F29.

Conclusion. El antígeno F29 es un biomarcador aceptable para evaluar ET temprano por su expresión elevada (más del 90%) en el tiempo basal de la población y en aquellos que hay ET la reactividad va disminuyendo hasta ser negativa a los 5 años pt. En general existe una gran heterogeneidad en otros biomarcadores publicados en la evaluación de ET. La estandarización y validación de todos incluso la ELISA-F29 son criterios necesarios para determinar en forma temprana la eficacia o falla terapéutica en la aplicación de nuevas drogas.

Experimental Parasitology, 84: 387-399, 1996. ². Am. J. Trop. Med. Hyg., 59:526-529, 1998. ³. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 55:167-172, 2013

- **Uso de parámetros inmunológicos como herramientas para el seguimiento del tratamiento en la enfermedad de Chagas crónica**

La enfermedad de Chagas, causada por el patógeno intracelular *Trypanosoma cruzi*, es la enfermedad parasitaria de mayor impacto en América Latina y la causa más común de miocarditis infecciosa en el mundo. El sistema inmune presentaría un rol central en el control de la infección crónica por *T. cruzi*. A través de un gran número de trabajos, hemos demostrado que la infección persistente por *T. cruzi* induce un agotamiento de la respuesta celular T específica para *T. cruzi*. La lenta caída observada en los anticuerpos específicos de *T. cruzi* en adultos con enfermedad de Chagas crónica tratados con benznidazol, y el hecho de que la reversión completa de la serología a valores negativos ocurre solo en aproximadamente el 20% de los individuos tratados, explica en parte la baja indicación del tratamiento en la etapa crónica en adultos. Por lo tanto, es importante identificar marcadores tempranos de eficacia terapéutica. Nuestros estudios en individuos adultos y niños infectados con *T. cruzi* revelaron diferencias notables entre estos grupos en términos de la calidad y magnitud de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* que probablemente expliquen el diferente impacto del tratamiento con benznidazol entre niños y adultos infectados por *T. cruzi*. Recientemente demostramos que el tratamiento etiológico en niños de 5 a 16 años, indujo un descenso en el número de células productoras de IFN- γ e IL-2 específicas para *T. cruzi*, así como también en los niveles de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Las frecuencias totales de células T efectoras, activadas y con experiencia antigénica también disminuyeron después del tratamiento y encontramos un aumento en las células T que expresan el receptor de la citocina homeostática IL-7. Los cambios pos tratamiento en estos marcadores fueron capaces de distinguir a niños que presentaron una respuesta serológica decreciente de aquellos con respuestas serológicas sin variaciones pos tratamiento en un estudio de seguimiento de cinco años. El descenso temprano en los niveles de anticuerpos observado en los niños a los seis meses pos tratamiento contrasta con los hallazgos en pacientes adultos en los que la caída de anticuerpos empieza a evidenciarse a partir de los dos años luego del tratamiento. Estos hallazgos demuestran la utilidad de estas herramientas alternativas para el monitoreo de la eficacia del tratamiento tripanocida.

Avances y desafíos en el control de *T. infestans* en Argentina

Moderadores: Sartor P., Weinberg D.

- **Control vectorial de *Triatoma infestans* y detección de *Trypanosoma cruzi* en zonas urbanas de San Juan**

Provecho Y.1, Salva L.2, Meli S.2, Cano F.2, Sartor P.3, Carbajal de la Fuente A.L.4

1 Coordinación de Vectores, Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina

2 Programa Provincial de Control de Vectores, Ministerio de Salud de San Juan, San Juan, Argentina

3 Departamento de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Ministerio de Salud del Chaco, Resistencia, Argentina

4 IEGEBA Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

La infestación urbana por *T. infestans* (*Ti*) se evidencia como un serio problema para la salud pública en la provincia de San Juan, caracterizada como de alto riesgo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas. Datos del Ministerio de Salud Provincial indican que las tasas de infestación por *Ti*, principal vector de la enfermedad en el país, varían entre 2-25% en viviendas del Gran San Juan con población mayoritariamente urbana. Esto, sumado a la detección de casos agudos de transmisión

vectorial en menores de edad, evidencia un problema crítico de salud pública. Actualmente no existe un protocolo de control vectorial para el área urbana, donde el escenario es diferente al rural, y existen estrategias consensuadas y validadas. El objetivo del trabajo consiste en desarrollar y evaluar nuevas estrategias de abordaje del Chagas urbano en la provincia de San Juan. Para ello, inicialmente nos abocamos a determinar el grado de infestación por *Ti* e infección por *T. cruzi* (*Tc*) en 2.840 viviendas urbanas agrupadas en 75 manzanas del Depto. Rawson y posteriormente a establecer un protocolo de intervención química evaluando la efectividad de tres estrategias de rociado con insecticida: a) rociado focalizado, b) rociado colindante c) barrido total. Todas las viviendas infestadas (y las viviendas no infestadas dependiendo de la estrategia aplicada), fueron rociadas con dosis estándar (25 mg/m²) de deltametrina floable (SC, Bayer). En cada vivienda infestada se tomó una muestra de triatominos (30%) y se analizó la infección por *Tc* mediante microscopio óptico (40x). El 70% de las viviendas fueron evaluadas, mientras que las restantes estuvieron cerradas (20%), sus habitantes no permitieron el ingreso de personal especializado (8%) o estaban deshabitadas (2%). El 2,4% (n=42) de las viviendas evaluadas estuvieron infestadas con ninfas y/o adultos en el intra y/o peridomicilio. *Tc* se encontró en 15% (n= 8) de las viviendas. Se presentan datos de la etapa basal del ensayo. Aún se encuentra en proceso la etapa de post-rociado, re-evaluación entomológica y monitoreo que permitirá definir la mejor estrategia de rociado en el ámbito urbano. El desarrollo de una estrategia de control exitosa representaría un gran progreso para ésta y otras áreas del país donde existe esta problemática, así como para el resto de los países donde el Chagas urbano representa un problema de salud pública. PPChSJ, PNCh, PICT (2014-3746).

■ ***Triatoma infestans* en áreas (peri)urbanas de un municipio endémico del Chaco argentino: desafíos para el control**

Gaspe M.S.

Laboratorio de Eco-Epidemiología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. IEGEBA-CONICET

El creciente hallazgo de *Triatoma infestans* en ambientes (peri)urbanos a lo largo de su distribución representa un desafío para el control y vigilancia vectorial. Como parte del programa de investigación del Lab. de Eco-Epidemiología, nuestro objetivo fue determinar la infestación por *T. infestans* y el impacto de un protocolo de intervención, en el municipio de Avia Terai, Chaco. Se realizó la evaluación entomológica de todas las viviendas del área rural (AR) y de los barrios periurbanos de alto riesgo, y de una muestra en el área urbana (AU) y barrios de bajo riesgo, junto con el Programa Provincial y Nacional de Chagas. Se rociaron las viviendas con insecticidas piretroides a dosis simple (domicilios) y doble (peridomicilios) con cobertura total en AR (87%) y parcial en el área periurbana (AP) (35%) y AU (8%). La prevalencia de infestación pre-intervención (2015-2016) evaluada por hora-hombre (HH) aumentó a través del gradiente AU-AP-AR desde el 12% (n=408), 21% (n=275) al 43% (n=275), respectivamente. Las infestaciones domiciliarias por HH registraron un gradiente similar (0,5%, 6% y 9%, respectivamente). La infestación se distribuyó a través de toda el AU y el AR, y fue muy variable entre barrios periurbanos (rango, 0-59%). A 1 año post-intervención (API), la infestación de las viviendas por HH disminuyó significativamente ($P < 0,005$) en dicho gradiente al 4% (n=614), 12% (n=365) y 17% (n=269), respectivamente, concentrándose en sitios peridomésticos con gallinas. El impacto general fue menor al esperado y marcadamente mayor en AR que en AU y AP. La mitad de las manzanas urbanas y el 53% de las viviendas en AP infestadas, eran persistentes, lo que determinó rociar todas las viviendas de las manzanas infestadas. A 2 API la infestación en AP por HH disminuyó al 4,7%; la mitad de los focos hallados eran persistentes. Cerca del 70% de las muestras peri(urbanas) colectadas a 1 y 2 API sometidas a ensayos de dosis discriminante en el CIPEIN/CONICET presentaron mortalidad reducida a los piretroides. Aunque el protocolo aplicado permitió reducir la infestación sin necesidad de recurrir a un rociado con cobertura completa, se identificaron diversos focos persistentes.

tes probablemente asociados a resistencia incipiente a los piretroides, y a la infestación en estructuras peridomésticas de difícil tratamiento. El desafío es adaptar las estrategias de control para eliminar la infestación de manera costo-efectiva y sostenible en ambientes (peri)urbanos del Gran Chaco.

■ **Situación actual de la resistencia a insecticidas en *Triatoma infestans* de Argentina**

Mougabure-Cueto G.1,2

1 Laboratorio de Investigación en Triatominos (LIT), Centro de Referencia de Vectores (CeReVe) (Programa Nacional de Chagas, Ministerio de Salud de la Nación). Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina

2 CONICET

En los últimos años han sido detectados varios focos de resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *Triatoma infestans* de distintas zonas de Argentina y Bolivia. Coincidentemente, se ha reportado una disminución en la efectividad de las acciones de control químico en alguna de aquellas zonas sugiriendo a la evolución de resistencia como causa de las fallas en el control. Estos focos han sido descriptos toxicológicamente e investigados sus mecanismos de resistencia, sus costos biológicos y sus distribuciones macro y micro geográfica. Metabolismo incrementado, sitio de acción alterado y penetración reducida han sido descriptos como los principales mecanismos de resistencia. Las diferencias entre los perfiles y mecanismos de resistencia de algunos focos sugieren que la resistencia ha evolucionado de manera independiente en diferentes zonas. Por otro lado, la resistencia ha sido asociada a modificaciones en la reproducción, los patrones de excreción/defecación y la dispersión activa y estas modificaciones fueron interpretadas como costos biológicos. Además de permitir entender la evolución de la resistencia a insecticidas en *T. infestans*, estos estudios resultan necesarios para la planificación de la estrategia de control alternativa óptima en cada área particular. En esta charla se presenta un panorama actualizado de la resistencia a piretroides en *T. infestans* de Argentina con especial referencia al foco de alta resistencia del departamento de General Güemes de la provincia del Chaco.

Viernes 2 de Noviembre

Mesas Redondas

Biología Parasitaria

- ***Trypanosoma cruzi* High Mobility Group B protein (*TcHMGB*) can alter the nuclear structure affecting the parasite fitness**

Cribb P.1,2, Tavernelli L.E.1, Motta M.C.M.3, Gonçalves C.S.3, Santos da Silva M.4,5, Elias M.C.4,5, Serra E.1,2

1 Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET-UNR), Rosario, Argentina

2 Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Rosario, Argentina

3 Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

4 Laboratório Especial de Ciclo Celular, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

5 Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling – CeTICS, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Kinetoplastid parasites, included *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease, are unique regarding genome organization and gene expression. Although they regulate gene expression mainly post-transcriptionally, chromatin accessibility plays a fundamental role in transcription initiation. High mobility group B (HMGB) proteins are abundant non-histone chromatin proteins that play key roles in important nuclear functions like transcription, DNA replication, recombination and repair. *TcHMGB*, the HMGB from *Trypanosoma cruzi* has two HMG box domains like mammalian HMGBs, and a 110 amino acid long N-terminal domain that is conserved among the TriTryp sequences (70–80% similarity) and seems to be restricted to kinetoplastid HMGBs. *In vitro* studies showed that *TcHMGB* can recognize and bind distorted DNA structures such as cruciform or small circular DNA molecules, like its orthologs. It also has other architectural functions like the ability to bend the linear DNA, thus modifying the DNA structure. Immunofluorescence and western blot assays showed that *TcHMGB* is a nuclear protein expressed in all life cycle stages. However, protein levels vary throughout the life cycle in an apparent correlation with the known differences in chromatin structure and transcription rates of the replicative versus non-replicative forms. Using an inducible expression system, we verified that *TcHMGB* can also act as an architectural protein *in vivo*. *TcHMGB* over-expression induced changes in the *T. cruzi* nuclear structure, showing a marked reduction of the nucleolus and an increase in the euchromatin:heterochromatin ratio. Epimastigotes replication rate was markedly reduced presumably associated to a delayed cell cycle progression with accumulation of parasites in G2/M phase and impaired cytokinesis. Some functions involved in pathogenesis were also altered in *TcHMGB*-overexpressing parasites, like the decreased efficiency of trypomastigotes to infect cells *in vitro*, the reduction of intracellular amastigotes replication and the number of released trypomastigotes. Finally, we also observed that *TcHMGB* can be secreted, and induce the production of inflammatory mediators in mammalian cells, suggesting a putative role for the protein in the interaction with the host cell. Taken together, our results show that the *TcHMGB* protein is a pleiotropic player that controls cell phenotype and it

is involved in key cellular processes.

■ **La proteína Hsp40 DNAJA1 de *Toxoplasma gondii* (Tgj1): conservada pero con nuevos roles**

Munera López J.1, Moreno S.N.2, Angel S.O.*1

1 Laboratorio de Parasitología, INTECH (CONICET/UNSAM), Chascomús, Provincia de Buenos Aires

2 Department of Cellular Biology, University of Georgia, Athens, Georgia, USA

Toxoplasma gondii es un parásito apicomplejo intracelular obligado, que produce la toxoplasmosis, afectando principalmente a pacientes inmunodeprimidos y a recién nacidos. En el humano el parásito presenta dos estadios, el taquizoito, responsable de la etapa aguda y de los síntomas, si los hubiera, y el bradizoito, que puede permanecer latente dentro de los tejidos por muchos años. Las proteínas de choque térmico (Hsp por sus siglas en inglés) como ser Hsp70 y Hsp90 demostraron estar involucradas en el proceso de diferenciación. En este estudio se analizó el rol de la proteína de la familia Hsp40 Tgj1 de *T. gondii*, ortóloga del grupo DNAJA1. La generación de una línea celular de knock down condicional demostró que la expresión de la misma es esencial a diferencia de lo que ocurre en levaduras y en líneas celulares de mamíferos. Dado que los miembros de DNAJA1 tienen un motivo CaaX farnesilable, muy importante para sus funciones, se generó una mutante por reemplazo alélico donde dicho motivo se deletó (DCaaX). La proteína Tgj1 salvaje mostró una localización perinuclear y citosólica en condiciones normales mientras que en estrés por calor o pH alcalino (inducción a bradizoito) su localización incluye el núcleo del parásito. En la versión mutante la proteína se localiza en citosol y núcleo. La línea celular DCaaX mostró un grado de crecimiento más lento que la cepa parental (Par) durante el estadio de taquizoito. Los procesos afectados serían la invasión a la célula hospedadora y la replicación. La línea Par corresponde a la cepa RH, poco cigotogénica *in vitro*. Sin embargo, la línea DCaaX mostró una alta tasa de formación de quistes conteniendo bradizoitos en condiciones de cultivo inducidos a la diferenciación. A su vez la cepa RH (Par) es altamente virulenta *in vivo*, matando al ratón dentro de los 15 días con dosis baja de taquizoitos. La infección de ratones con la línea DCaaX fue ineficaz para matarlos pero generó una respuesta inmune que ante una re-infección con la cepa RH salvaje (Par) resultó completamente protectora. En conclusión, la proteína DNAJA1 de *T. gondii* (Tgj1) ha adquirido nuevos roles en el parásito que son esenciales para la sobrevivencia de este. Por otro lado, la falta del motivo predicho de ser blanco de farnesilación (CaaX), afecta algunas funciones de Tgj1 principalmente afectadas al ciclo lítico, diferenciación y virulencia.

Expositor

■ **Estudio de la división celular del parásito *Tritrichomonas foetus***

Coceres V.M.

INTECH (Instituto Tecnológico de Chascomús), Provincia de Buenos Aires, Argentina

Tritrichomonas foetus es un protozoo extracelular flagelado, agente causal de una enfermedad venérea de impacto económico negativo en las explotaciones ganaderas bovinas de diferentes regiones del mundo.

El parásito se divide mediante fisión binaria pero no existen aún reportes de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de este proceso en trichomonadidos. Se sabe que la ejecución exacta

de la división celular es esencial para la supervivencia de los diferentes organismos; y que los errores en la segregación cromosómica o la citocinesis pueden afectar el mantenimiento de la estabilidad genómica de cualquier tipo celular. En este contexto, considerando que la escisión final de la citocinesis de la división celular, en otros tipos celulares, está mediada por la maquinaria ESCRT (formada por los complejos multiproteicos 0, I, II, III); analizamos el rol de la proteína VPS32 (subunidad del ESCRT III) mediante ensayos de sobreexpresión y reportamos que la delección de las dos últimas hélices del extremo C-terminal de la proteína VPS32 ó TfVPS32 $\Delta\alpha4/5$ afectaban el crecimiento de los parásitos transfectados; algunos de los cuales presentaron múltiples núcleos. Observamos, además, que los parásitos sobreexpresando TfVPS32 $\Delta\alpha4/5$ presentaron un arresto en las fases G2/M del ciclo celular; lo cual estaría indicando un rol de la proteína en la división celular final de este parásito.

- **Autofagia: un proceso necesario durante la metaciclologénesis de *Trypanosoma cruzi***

Romano P.S.

Laboratorio de Biología de *Trypanosoma cruzi* y de la célula hospedadora. Instituto de Histología y Embriología (IHEM-CONICET-UNCUYO), Mendoza, Argentina

Trypanosoma cruzi, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un protozoario flagelado con un ciclo de vida complejo, llevado a cabo en insectos vectores y en hospedadores mamíferos que son los reservorios de la enfermedad. Para poder infectar al ser humano, *T. cruzi* debe transformarse de la forma epimastigote, presente en el insecto, a la forma tripomastigote metacíclico. Este proceso, denominado metaciclologénesis, es crucial para continuar el ciclo biológico parasitario. La autofagia es una vía de transporte vesicular cuya función es degradar elementos presentes en el citoplasma celular. La autofagia permite el mantenimiento de la energía celular en condiciones de ayuno, como así también el reciclaje de proteínas de vida media larga y de organelas envejecidas o dañadas. Por este motivo, este proceso se activa no sólo en ausencia de nutrientes, sino que es necesario durante el desarrollo y la diferenciación celular. En trabajos previos se había descrito la presencia de genes de la autofagia en *T. cruzi* y el aumento en su expresión en parásitos sufriendo diferenciación espontánea. En nuestro laboratorio utilizando un proceso de metaciclologénesis *in vitro*, observamos que la autofagia era activada en las 2 primeras horas de diferenciación, evidenciada por un aumento en el número de compartimentos positivos para Atg 8.1, una proteína clave en la formación y transporte de autofagosomas. Por otro lado, tanto el ayuno de nutrientes como la rapamicina inducen la autofagia en *T. cruzi*, mientras que wortmanina y bafilomicina, la inhiben. A diferencia de las células de mamífero, bafilomicina reduce el número de autofagosomas mientras que la poliamina espermidina es requerida para la respuesta autofágica aumentando el número de autofagosomas marcados con Atg 8.1. También demostramos que la inducción de la autofagia promueve la metaciclologénesis resultando en una mayor proporción de tripomastigotes metacíclicos generados en condiciones de ayuno o con inductores autofágicos. Además, hemos observado que el ayuno incrementa el transporte de cruzipaina a los reservosomas, los que a su vez se vuelven más ácidos y degradativos. Concluimos que la autofagia es un proceso necesario en la metaciclologénesis de *T. cruzi* y que su regulación presenta similitudes y diferencias con la descrita para las células de mamífero, pudiendo ser un blanco interesante para afectar la supervivencia y la diferenciación parasitaria.

Epidemiología y Vectores

- **Toxoplasmosis y genotipos de *Toxoplasma gondii*: aportes desde la investigación clínica**

Servicio de Parasitología y Enfermedad de Chagas, Hospital Gutiérrez, IMIPP Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas, CONICET-GCBA, Buenos Aires, Argentina

La toxoplasmosis, que afecta a un tercio de la población humana mundial, es causada por el parásito *Toxoplasma gondii*, un protozooario intracelular obligado perteneciente a la familia Apicomplexa. Se han descrito 3 genotipos I, II y III los cuales se han asociado a diferente virulencia, comportamiento biológico y patrones epidemiológicos de ocurrencia. Se describió inicialmente una estructura poblacional altamente clonal y con baja diversidad genética. Estudios recientes han revelado que las cepas de América del Sur son genéticamente más diversas y comprenden distintos genotipos y haplogrupos que los previamente descritos en EEUU y Europa. Los diversos genotipos han sido asociados con infecciones graves en los seres humanos en América del Sur. Estudios recientes en Brasil y Colombia han descrito una alta prevalencia de cepas atípicas. En Argentina solo aislados han sido genotipificados y no se han realizado estudios que describan las poblaciones de *T. gondii* directamente en muestras clínicas.

La toxoplasmosis es una enfermedad desatendida que en Argentina afecta principalmente a la población con escasos recursos y atención no adecuada en el sistema de salud. Normalmente es una infección asintomática aunque puede presentar manifestaciones clínicas en inmunosuprimidos (TIS) o congénitos (TC). Su diagnóstico es de crucial importancia pues el tratamiento es efectivo si se realiza a tiempo. TIS: Varios factores responsables de la inmunidad pueden conducir a reactivaciones graves, entre las que se encuentran la infección por VIH y las terapias inmunosupresoras. La encefalitis toxoplásmica es la manifestación más prevalente en estos pacientes aunque otros órganos pueden ser afectados. TC: La primoinfección de la mujer embarazada puede infectar al feto por vía transplacentaria. En Europa el 85% de los TC son subclínicos al nacer. En la población asistida en nuestro hospital observamos un alto impacto clínico por TC y TIS. Así como como un inadecuado seguimiento de las mujeres embarazadas lo que determinó que un pequeño porcentaje fuese diagnosticado durante la gestación. Se implementó la utilización de técnicas moleculares para la detección de *T. gondii* para evaluar la presencia del parásito en tejidos, circulación sanguínea y otros líquidos como marcador diagnóstico temprano de infección congénita y reactivaciones así como para detectar los genotipos circulantes en nuestra región.

■ **Factores asociados a la parasitemia e infectividad al vector *Triatoma infestans* en hospedadores infectados por *Trypanosoma cruzi***

Enriquez G.F.1, Macchiaverna N.P.1, Argibay H.D.1, Orozco M.1, Bua J.2, Garbossa G.3,4, Gürtler R.E.1, Cardinal M.V.1

1 Laboratorio de Eco-epidemiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (FCEN-UBA). Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires (UBA-CONICET)

2 Instituto Nacional de Parasitología Dr. M. Fátala Chaben, Administración Nacional de Laboratorios e Instituto de Salud Dr. C.G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina

3 Laboratorio de Parasitología Clínica y Ambiental, FCEN, UBA

4 Instituto de Investigación en Salud Pública, Universidad de Buenos Aires

La competencia de un hospedador como reservorio de patógenos transmitidos por vectores está directamente relacionada con su infectividad al vector, y ésta a la parasitemia. Ambas suelen presentar un patrón heterogéneo en la población infectada asociadas a variables como edad, sexo, estado nutricional e inmunológico del hospedador, su genética y la del parásito y a la coinfección con otros parásitos. La relevancia de estudiar la heterogeneidad en la infectividad, parasitemia, y las variables relacionadas, radica en identificar a individuos superinfectuosos y desarrollar herramientas de control para reducir el riesgo de transmisión. Guiados por las siguientes preguntas: ¿existe una distribución heterogénea

en la parasitemia e infectividad de hospedadores infectados con *Trypanosoma cruzi*? ¿qué variables se asocian al patrón observado? ¿puede la infección por otros parásitos modificar la parasitemia e infectividad? realizamos dos estudios en el Chaco húmedo argentino. La infectividad al vector fue determinada por xenodiagnóstico y la carga parasitaria (cantidades equivalentes de ADN por ml, EP/ml) por qPCR. En el primer estudio realizado en 2008, la infectividad de 44 perros (media 48 %, 95 % intervalo de confianza [IC] = 33–62 %) y 15 gatos (media 44 %, 95 % IC = 10–63 %) estuvo agregada, asociada positiva y significativamente con la carga parasitaria de *T. cruzi* (mediana 8,1 EP/ml; OR = 1,02; 9,7 EP/ml; OR = 1,02, respectivamente), inversamente con un índice de la condición corporal en los perros (OR = 4,45), pero no con la UDT parasitaria. Sin embargo, los dos gatos y el único perro infectado con TcI tenían nula infectividad a pesar de tener entre 7 y 21 EP/ml. Este hallazgo de hospedadores con parasitemia patente pero con nula infectividad sugiere la presencia de otros factores afectando la asociación infectividad-carga parasitaria. Un segundo estudio fue realizado en 32 perros en 2013. Hallamos que la infectividad y la mediana de la carga parasitaria de *T. cruzi* también estaban agregadas, y asociadas positiva y significativamente con la coinfección con dos helmintos gastrointestinales (*Ancylostoma caninum* y un trematodo) (OR = 27; P <0,01, respectivamente). La metodología empleada resultó útil para identificar hospedadores con elevada infectividad que podrían ser blanco de nuevas estrategias de control. Nuestros resultados sugieren que el estado nutricional y las coinfecciones pueden ser modificadores de la parasitemia en hospedadores infectados con *T. cruzi*.

■ Seroepidemiología de la strongiloidiasis en el norte de Argentina

Cimino R.O.

Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IIET), Sede Regional Orán. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta. Investigador Adjunto CONICET

Las Enfermedades Tropicales Desatendidas u Olvidadas (NTD, Neglected tropical Diseases) son aquellas enfermedades que principalmente afectan a poblaciones pobres, y con un limitado acceso a los servicios de salud; especialmente aquellas que viven en áreas rurales remotas y en barrios marginales. La geohelmintiasis son enfermedades parasitarias frecuentes en la Argentina y se estima que hay 3 millones de niños parasitados por geohelminetos. Se distribuyen primariamente en las zonas de clima tropical y subtropical. Estas enfermedades son generadas por los parásitos intestinales que se transmiten desde el suelo, donde cumplen un período de sus ciclos de vida. El grupo está compuesto por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y *Strongyloides stercoralis*.

La strongiloidiasis afecta entre 30 a 100 millones de personas en el mundo y en Argentina se estima que 1 millón de personas se encuentran infectadas por *S. stercoralis*. Este parásito se diferencia de los demás por sus particularidades de su ciclo biológico y principalmente por la posibilidad de autoinfección, rol importante en la perpetuación de la infección (cronicidad) y consecuentemente en la morbilidad, aún varios años después de la exposición.

Desde el año 2010 el Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IIET) de la Universidad Nacional de Salta viene desarrollando actividades en la región apoyados en tres ejes: 1) Desparasitación comunitaria, 2) Alternativas diagnósticas de la strongiloidiasis y 3) epidemiología de la infección por *S. stercoralis*.

Nuestro grupo de trabajo viene evaluando nuevas alternativas en el diagnóstico de estas parasitosis. a) como serología (ELISA), usando el antígeno recombinante NIE de *S. stercoralis* pudimos definir su capacidad diagnóstica y calculamos una sensibilidad del 75 % y especificidad del 95 %; b) diagnóstico molecular mediante PCR convencional y real time (qPCR) dieron resultados muy satisfactorios, tanto en materia fecal y orina tuvieron sensibilidades del 99 % y 75 %, respectivamente. Alternativas en el diagnóstico es el desafío actual para las parasitosis. Los Departamentos de Orán y San Martín en

la provincia de Salta son áreas hiperendémicas para la geohelmintiasis en general y *S. stercoralis* en particular. Estudios previos de nuestro grupo realizados en el área revelan una alta prevalencia de enteroparasitosis ($\geq 90\%$), con predominio de *S. stercoralis* (50%) y uncinarias (47%). Recientemente en un estudio molecular utilizando PCR cuantitativa se detectó un 21% de infección por *S. stercoralis*, 19% de *A. duodenale* y 36% con *N. americanus*. Mientras que por métodos serológicos en la localidad de Tartagal, se reportaron prevalencias de 26% y del 21% de infección de *S. stercoralis* y uncinarias, respectivamente. Los estudios de seroepidemiología realizado por nuestro grupo están sugiriendo que la prevalencia de estrongiloidiasis en la región del gran Chaco ronda entre un 20%-25% (datos sin publicar). El norte de la provincia de Salta, al ubicarse geográficamente en la zona subtropical, se ve afectada por este tipo de parasitosis y otras enfermedades endémicas de gran impacto como la Enfermedad de Chagas, leishmaniasis, dengue, hantavirus, entre otras. El aporte de estos trabajos de investigación realizado en conjunto con otras instituciones públicas, son de gran ayuda para el conocimiento de la geohelmintiasis en general y esperamos además que tenga impacto sobre el diseño de estrategias prevención y promoción de la salud por parte del sistema de salud pública en la región.

■ Situación entomo-epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en la provincia del Chaco

Maza Y.1, Wasilewski S.3, Alarcón O.3, Weinberg D.2, Fabiani M.1, Abril M.2, Sartor P.1*

1 Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública del Chaco

2 Fundación Mundo Sano

3 Control de Vectores, Secretaría de Salud de la Nación

El Chaco se extiende en 99633 km² divididos en 25 departamentos endémicos para la enfermedad de Chagas. En 2015, el gobierno nacional con una inversión de U\$25 millones del préstamo FONPLATA fortalecer las capacidades operativas de 10 provincias entre ellas el Chaco. Desde entonces, se realizó control entomológico en 4 departamentos: Quitilipi (Q), 25 de Mayo (25M), Maipú (M) y General Güemes (GG) que ocupa un 25.5% del territorio provincial. Los índices de infestación en áreas rurales fueron de Q: 12,65%; 25M: 20,5%; M: 47,3% y GG: 16,7% variando entre un 1,9 y un 23,1% según el municipios siendo El Sauzalito el más bajo y Misión Nueva Pompeya el más alto. Los índices de infestación en Q, 25M y GG se determinaron por evaluación del 100% de las viviendas mientras que en M se realizó por muestreo sistemático. Sólo se detectó triatomismo (peri)urbano en Q. En las localidades trabajadas se determinó el status toxicológico de triatomos capturados y se detectó resistencia a piretroides en GG en el Municipio de Juan José Castelli en el paraje Pampa Argentina. Se implementó un tratamiento químico de barrido con insecticidas piretroides alcanzando una cobertura del 87,5% en Q del 107% en 25M. Sólo el 23% de M pudo ser tratado mientras que el barrido de GG se encuentra en proceso alcanzando hasta el momento una cobertura del 71,2%. En el año 2017 no se registraron casos agudos de transmisión vectorial.

En relación a la transmisión congénita, en 2017 se registraron 15.317 nacimientos en el subsector público (SSP). Se testearon y notificaron 9.060 mujeres embarazadas siendo la cobertura de la vigilancia en SSP del 62,6% (Fuente: SIVILA). La seroprevalencia global fue del 10,8%, variando según los departamentos entre el 2,5 al 25,0%. La seroprevalencia en embarazadas en la provincia del Chaco varió de 10,8 a 12,6% entre 2010 y 2017. Asumiendo una tasa de transmisión vectorial del 5%, nuestras estimaciones indican que nacerían anualmente en Chaco alrededor de 100 niños con Chagas congénito. Para el año 2017 se diagnosticaron y trataron 22 niño/as con Chagas congénito confirmado por Microstruot y 10 por serología.

Es necesario continuar con las acciones de control entomológicas en el resto del territorio provincial así como realizar un segundo ciclo en las áreas tratadas debido a los altos índices de infestación registrados. Se deben generar estrategias para fortalecer la detección y a notificación de niño/as con Chagas agudo congénito.

Diagnóstico

- **Tipificación molecular aplicada al seguimiento de la estrongiloidosis en inmunocomprometidos**

Repetto S.A.1, Argüello L.1, Batalla E.1, Burgos J.M.2, Gonzalez Cappa S.M.1, Alba Soto C.D.1, Risso M.G.1, Ruybal P.1

1 IMPaM Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, UBA-CONICET, CABA, Argentina

2 IIB Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM, San Martín Provincia de Buenos Aires, Argentina

Strongyloides stercoralis es un geohelmintho que afecta a un 10-40 % de la población mundial en áreas tropicales y subtropicales. Produce infecciones crónicas y cuadros severos en pacientes inmunocomprometidos con una mortalidad del 80 %. Si bien la cura parasitológica se define como la ausencia de larvas al año post-tratamiento, hemos observado reactivaciones a partir del segundo año. En base a su amplia distribución geográfica e impacto en salud pública evaluamos la diversidad genética y su posible asociación con las características clínicas y evolución de esta parasitosis. Se evaluaron 22 pacientes (18 inmunocomprometidos) con diagnóstico y seguimiento de estrongiloidosis oriundos de Argentina, Bolivia, Paraguay, Perú y Rep. Dominicana. El ADN extraído de la muestra de materia fecal al momento del diagnóstico se utilizó como templado para la amplificación y secuenciación de una región de 404 pb. del gen mitocondrial *cox1*. Las secuencias fueron analizadas en el contexto de secuencias de *S. stercoralis* (581), *S. fuelleborni*, *S. ratti*, *S. venezuelensis*, *S. planiceps*, *S. mirzai*, *S. papillosus* y *A. lumbricoides*. Los resultados se expresaron en frecuencias y porcentajes. El nivel de significación se consideró $p < 0.05$. Las asociaciones entre variables categóricas se analizaron mediante test de Fisher y RR (riesgo relativo). De un total de 80 haplotipos, 65 correspondieron a la especie *S. stercoralis* (PD=0.774) siendo HP24 el más frecuente (26 %). Ocho haplotipos correspondieron a casos de Latinoamérica y 6 de ellos a los pacientes en seguimiento (HP24, 34, 42-45). El HP24 y el HP43 se encontraron en el 72.7 % y el 27.3 % de los casos, respectivamente. El 62.5 % de los pacientes con HP24 no presentaban síntomas y 11 presentaron reactivación parasitaria sin asociarse con los haplotipos más frecuentes ($p > 0.05$). Sin embargo, en todos los pacientes inmunocomprometidos que reactivaron (7/18) se detectó la variante HP24 del parásito. La presencia de HP24 incrementó el riesgo de reactivación con un RR de 2.16 ($p < 0.05$). Esta variante ha sido descrita en humanos en Asia y Latinoamérica. Su extensa distribución geográfica y elevada frecuencia describiría una variante con elevado "fitness". En este contexto, este haplotipo permitiría predecir reactivaciones en pacientes inmunocomprometidos aportando nuevas herramientas para la conducta clínica.

-
- **Transmisión materno-fetal del *Trypanosoma cruzi*: Aspectos del diagnóstico precoz del bebé con Chagas congénito.**

Bustos P.L.1, Perrone A.E.1, Mildubegger N.1,2, González C.1,2, Volta B.J.1, Bua J.1,2.

1 Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chaben, ANLIS/Malbrán, Ministerio de Salud, Buenos Aires, Argentina

2 CAECIHS, Universidad Abierta Interamericana, Buenos Aires, Argentina

La transmisión vertical de la infección por *T. cruzi* es de gran importancia epidemiológica, ya que aún no logra controlarse, al no ser posible el tratamiento con drogas tripanocidas de las mujeres gestantes, por desconocerse sus efectos adversos sobre el embarazo. Los aportes de nuestro laboratorio se concentraron en fortalecer la detección temprana de la infección por *T. cruzi* en hijos de mujeres infectadas para un inmediato tratamiento del bebé, abordando el problema desde diferentes enfoques. Determinamos que la parasitemia en embarazadas que transmitieron la infección por *T. cruzi* a sus bebés, cuantificada por qPCR, era significativamente mayor a la de las embarazadas seropositivas que dieron a luz niños no infectados. Establecimos las diferencias en carga parasitaria que existen en los grupos de bebés congénitamente infectados en los tres controles durante su primer año de vida, debido a que 22 de 51 bebés infectados mostraron una muy baja parasitemia al nacer (detectable por qPCR pero no por microscopía óptica) y sólo pudieron ser diagnosticados por serología específica luego de los 10 meses de edad. Encontramos un bebé que no pudo ser diagnosticado ni con amplificación de ADN del parásito hasta los 7 meses de vida. También evaluamos los niveles de anticuerpos contra un antígeno recombinante definido (SAPA) y establecimos que, disponiendo de las muestras de suero del binomio mamá-bebé recién nacido, se pueden diagnosticar por serología los niños infectados por *T. cruzi* durante el primer mes de vida con un 90% de sensibilidad. Además, abordamos el estudio de los perfiles inmunológicos en el plasma de 35 bebés con infección congénita por *T. cruzi*, demostrando que los niveles circulantes de las citocinas IFN-gamma e IL-17A y las quimiocinas MCP-1 y MIG permiten diferenciar los neonatos infectados de los bebés no infectados nacidos de madres seropositivas. En cuanto a las mujeres embarazadas, nuestros resultados evidencian que existe una expresión diferencial de determinadas citocinas y quimiocinas en el suero de las mujeres que transmitieron o no la infección por *T. cruzi* a sus bebés tanto por inmunoensayos como por citometría de flujo, estudio que nos permite definir a estos mediadores inmunológicos como biomarcadores, con el fin de desarrollar un ensayo de ELISA de captura antigénica que forme parte de un diagnóstico predictivo de la transmisión vertical del parásito en embarazadas infectadas. Si se lograra advertir a una mujer gestante seropositiva que tiene un alto riesgo de transmitir el parásito a su bebé, facilitaría su adherencia a un diagnóstico de la infección en el niño recién nacido, que posibilitaría su acceso inmediato a un tratamiento altamente eficaz, que impactaría positivamente en la Salud Pública.

Financiado por PIP 2014 / PICT 2016-2693.

- **El uso de proteínas recombinantes quiméricas para el diagnóstico de Chagas crónico y congénito**

Marcipar I.

Laboratorio de Tecnología Inmunológica (Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas, Universidad Nacional del Litoral)– Santa Fe – Argentina.

Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas (Facultad de Ciencias Médicas –Universidad Nacional del Litoral)–Santa Fe– Argentina.

CONICET

El uso de moléculas quiméricas que fusionan varios determinantes antigénicos es una estrategia prometedora para el desarrollo de kits de bajo costo, estandarizados y confiables para determinar anticuerpos específicos. Sin embargo, luego de la evaluación empírica, el desempeño de los antígenos diseñados no siempre es satisfactorio. Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica se han descrito varios de estos antígenos y actualmente algunos Kits comerciales ya los utilizan. Las quimeras descriptas hasta el presente se componen casi exclusivamente por diferentes combinaciones de antígenos repetitivos del parásito que fueron identificados mediante la tecnología del ADN recombinante a fines de los años 80. En nuestro laboratorio hemos ensayado diferentes construcciones para lograr que las combinaciones de antígenos se complementen. Recientemente hemos obtenido una nueva construcción que, utilizada en conjunto con la quimera CP1previamente desarrollada (antígenos FRA y SAPA), permite

diagnosticar la enfermedad de Chagas crónica (CCD). La nueva proteína quimérica, llamada CP3, está compuesta de determinantes antigénicos MAP, TcD y TSSAII / V / VI. Comparamos el desempeño de ambos antígenos quiméricos mediante la técnica de ELISA indirecto. La sensibilidad de CP3 frente a CP1 fue del 100 % y 90,2 % y la especificidad fue del 92,5 % y 100 %, respectivamente, mientras que la mezcla de CP1 + CP3 alcanzó el 100 % de sensibilidad y especificidad. Además hemos analizado un subconjunto adicional de 17 sueros de pacientes con resultados discordantes de métodos serológicos convencionales; la mezcla CP1 + CP3 nos permitió clasificar con precisión 14 de ellos con respecto a IIF, la técnica habitual utilizada en la mayoría de los centros de referencia. Estos resultados muestran un desempeño mejorado de la mezcla CP1 + CP3 en comparación con los ensayos comerciales ELISA e IAH. Además, haciendo uso de estos antígenos, optimizamos un ELISA de captura de IgM para el diagnóstico de Chagas congénito. El uso de un método de captura para la detección de IgM en infecciones agudas no presenta antecedentes en la bibliografía disponible. El ensayo se evaluó con muestras de suero provenientes de neonatos y niños pequeños (<1 año), hijos de mujeres infectadas. El desempeño fue muy prometedor para el diagnóstico de Chagas congénito en las muestras provenientes de recién nacidos que es el principal grupo de interés para su aplicación clínica.

■ Caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi* en poblaciones originarias del Nordeste Argentino

Lucero R.H.

Área Biología Molecular. Instituto de Medicina Regional-UNNE. Av. Las Heras 727 Resistencia, Chaco, Argentina

A pesar de haberse obtenido una reducción de los indicadores de la enfermedad de Chagas en muchos países endémicos, en la zona del Gran Chaco persiste aún la transmisión vectorial activa.

El objetivo general del trabajo presentado fue caracterizar la infección por *Trypanosoma cruzi*, empleando métodos moleculares de diagnóstico y genotipificación, en individuos pertenecientes a pueblos originarios (Wichi, Mocoví, Qom y Pilagá) y criollos de la región del NEA, estudiando pacientes chagásicos crónicos. Para lograr este objetivo se estandarizaron técnicas de PCR convencional y en tiempo real (qPCR) para detectar y cuantificar ADN de *Trypanosoma cruzi* e identificar las unidades discretas de tipificación (UDTs) y el polimorfismo intra-UDT mediante tipificación molecular directamente del extracto de ADN de la muestra.

Estas metodologías fueron aplicadas al estudio de 689 pacientes de comunidades aborígenes y criollas de la región.

Se observó heterogeneidad en la positividad de la PCR ADNk, con valores muy bajos en la comunidad Wichi de Misión Nueva Pompeya, confirmados en dos operativos espaciados 4 años, sugiriendo una particularidad en el control de la parasitemia en esta población.

La positividad de PCR ADNk mostró asociación con el grupo etario y la etnia.

El linaje de *T. cruzi* prevalente en las comunidades estudiadas, incluyendo recién nacidos con Chagas congénito fue Tc V, con casos puntuales de pacientes infectados con Tc VI, Tc I e infecciones mixtas.

Al analizar muestras de pacientes de diferentes zonas pero cercanas geográficamente, mediante técnicas de tipificación molecular intra linaje (LSSP-PCR y RFLP-PCR), se pudo comprobar una similitud genética entre algunas muestras de diferentes localidades, lo que podría representar un flujo de poblaciones parasitarias entre dichas regiones favorecido por la proximidad geográfica.

Pero en general, las muestras de la misma procedencia tendieron a agruparse en *clusters*, lo que se vio sustentado con los Dendrogramas obtenidos.

La carga parasitaria mostró diferencias significativas según la procedencia, zona rural o urbana, edad y sexo y los valores registrados en equivalentes de parásitos /ml, van desde no detectables hasta 50 eq. par./ml. Estos datos mostraron valores más elevados en población aborígen, que aquellos generalmente observados en pacientes con enfermedad de Chagas crónica viviendo en centros urbanos de Argentina.

Inmunología

- **Immune response triggered by *Trypanosoma cruzi* infection affects adipocyte homeostasis and adipokine axis**

González B.F.1, Villar S.R.1,3, Toneatto J.2, Pacini M.F.1, Márquez J., D´Attilio L.1, Bottasso O.A.1, Pivien-Pilipuk G.2, Pérez A.R.1,3.

1 Institute of Clinical and Experimental Immunology of Rosario (IDICER - CONICET UNR), Rosario, Argentina

2 Institute of Biological and Experimental Medicine (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina

3 Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos (CIPReB), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina

Adipose tissue is an endocrine, but also immune organ, producing a wide range of mediators, like adipocytokines. Adipose tissue is a target of *T. cruzi* infection being a parasite reservoir during the chronic phase in mice and humans, but its role during the acute phase is still not well known.

C57BL/6 mice infected with *T. cruzi* showed a fatal disease associated with a dysregulated immune-endocrine response characterized by deleterious synthesis of pro-inflammatory cytokines, hypoglycemia and a marked reduction in the adipose tissue. Moreover, the infection coexists with a dysregulation of leptin/hypothalamic ObR circuitry dissociated from adipose tissue loss and food intake control. The severe adipose tissue loss may be triggered by inflammation, as well as caused by the parasite itself. To determine how the infection impacts on adipose tissue we also evaluated immune-metabolic parameters in the epididymal adipose tissue. Our studies showed that during *in vivo* infection, both lipolytic and lipogenic pathways are profoundly affected since the expression of lipolytic and lipogenic enzymes was intensely down-regulated. A similar pattern was observed in isolated adipocytes from infected animals and in 3T3-L1 adipocytes infected *in vitro* with *T. cruzi*. Moreover, *in vivo* infected adipose tissue reveals a pro-inflammatory profile, with increased leucocyte infiltration accompanied by TNF- α and IL-6 overexpression and leptin and adiponectin downregulation. The nuclear factor PPAR- γ is a key factor involved in adipogenesis and metabolism and has been also implicated in the down-regulation of inflammation. During *in vivo* *T. cruzi* infection, PPAR- γ expression is strongly diminished in adipocytes. Attempts to favor PPAR- γ -mediated actions in the adipose tissue of infected animals by using agonists failed, indicating that inflammation or parasite-derived factors are strongly involved in PPAR- γ inhibition. Here we report that experimental acute *T. cruzi* infection disrupts adipocyte catabolic and anabolic metabolism secondary to PPAR- γ robust downregulation, tipping the balance towards to an adverse status compatible with the adipose tissue atrophy and the acquisition of an inflammatory phenotype.

- **Mediadores intracelulares involucrados en la polarización de macrófagos en la infección con *Trypanosoma cruzi*.**

Cerban F.M.

CIBICI-CONICET. Depto. Bioquímica Clínica. Fac. Ciencias Químicas. UNC. Córdoba. Argentina

El macrófago representa a una clase de célula de la inmunidad innata cuya actividad fagocítica y antimicrobiana le permite internalizar a las formas tripomastigotes del *T. cruzi* para luego digerirlas

en su interior. Sin embargo, ha sido ampliamente estudiada la habilidad que tiene este parásito para evadir los sistemas microbicidas del macrófago y transformarlo en un nicho ideal para su replicación. Los eventos intracelulares involucrados en la modulación del fenotipo de esta célula frente al *T. cruzi* son ejercidos en gran parte por la actividad de la vía de mTOR, una vía de señalización encargada del metabolismo y homeostasis de las células en general y que particularmente en el macrófago participa en la activación de sus funciones inmunológicas. En nuestro grupo se abordaron los aspectos relacionados a la señalización intracelular y a las funciones efectoras de macrófagos murinos. Los resultados obtenidos mostraron que la sobrevivencia y replicación del *T. cruzi* en macrófagos peritoneales y macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6, dependen de eventos importantes como la producción de IL-10, la activación de la enzima arginasa y la participación de la vía de mTOR. Sin embargo, cuando se llevó a cabo la inhibición de dicha vía de señalización, se redujo significativamente la replicación intracelular del parásito al tiempo que se elevó significativamente la producción de IL-12. Sorprendentemente, en estos experimentos la expresión de la enzima iNOS se redujo significativamente, así como la producción de ON. Se observó además un descenso en la expresión de arginasa, así como también en la producción de IL-10. Es decir que cuando mTOR se encontraba inhibido, los macrófagos se volvieron más inflamatorios. Dado que el efecto microbicida provocado por la inhibición de mTOR ocurre a través de mecanismos independientes de la expresión y actividad de iNOS, se realizó un estudio sobre el estado de activación de otros mecanismos inflamatorios. Se pudo demostrar que el control de la replicación del parásito durante la inhibición de mTOR ocurrió a través de mecanismos independientes a la actividad de la enzima IDO y de la producción de ROS citoplasmáticos, al tiempo que se demostró la activación del inflamasoma NLRP3 junto con la producción de ROS mitocondriales. Como resumen, destacamos la gran plasticidad del macrófago, su importancia durante la infección con *T. cruzi* y su utilidad para el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas.

▪ **De la predicción in silico a la caracterización in vitro: epitopes de *Trypanosoma cruzi* activadores de linfocitos T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.**

Acevedo G.R.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET), Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ con especificidad por antígenos de *T. cruzi* son componentes cruciales de la respuesta inmune desarrollada por los pacientes con enfermedad de Chagas. El estudio de la especificidad de estas células presenta dificultades impuestas por el tamaño del repertorio antigénico del parásito y la diversidad de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En ese sentido, el uso de herramientas predictivas resultan una alternativa interesante para la identificación de epitopes T y el análisis de la respuesta que activan en el contexto de la infección. Nuestra aproximación utilizó algoritmos basados en redes neuronales artificiales para la detección de motivos peptídicos con alta capacidad de unión teórica por moléculas del CMH humano de clase I y II. Las secuencias de 53 proteínas inmunogénicas de *T. cruzi* fueron sometidas a este método, y la lista de péptidos resultante se optimizó de manera de seleccionarse las mejores 50 secuencias peptídicas de 15 aa, no sólo en función del puntaje obtenido en el paso anterior, sino también de la promiscuidad de unión por distintas variantes alélicas de HLA. Estos péptidos fueron sintetizados y utilizados para desafiar células mononucleares obtenidas a partir de muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Experimentos de ELISPOT para IFN- γ permitieron confirmar la reactividad de 7 de estos péptidos, 5 de los cuales contienen epitopes novedosos. Puesto que la respuesta observada mostró indicios de una marcada restricción por HLA, nos propusimos caracterizar la distribución de haplotipos de estos genes en la muestra poblacional. Los resultados pusieron de manifiesto discordancias entre las variantes de prevalencia regional, información utilizada durante la etapa de predicción bioinformática, y las encontradas en la muestra poblacional, resaltando la necesidad de implementar

este tipo de caracterización en la población endémica para este mal. Adicionalmente, se utilizó el método de marcación con multímeros de CMH para caracterizar, por citometría de flujo, la frecuencia y el fenotipo de células específicas para 2 de los nuevos epitopes identificados. Los resultados demostraron la presencia de linfocitos T epitope-específicos, con fenotipo predominante de células (i) de memoria central y efectora o (ii) terminalmente diferenciadas, según el paciente y el péptido. En este último caso, se observó una recuperación de la abundancia relativa de fenotipos menos diferenciados frente al enriquecimiento in vitro por estimulación de PBMC con el péptido en cuestión.

■ **Estudio de la respuesta inmune frente a *T. cruzi* como blanco para el desarrollo de nuevas terapias contra el Chagas**

Poncini C.V.

IMPam Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario que afecta a millones de personas en América Latina. En zona endémica, la infección ocurre comúnmente por transmisión vectorial, siendo la piel y/o mucosas, vías comunes para la entrada del parásito. Ciertos tejidos no linfoides, como por ejemplo la piel, contienen numerosas poblaciones de células presentadoras de antígeno (CPAs) con identidad fenotípica-funcional. Esto convierte a tales tejidos en sitios estratégicos para el estudio de la interfase entre la respuesta inmune innata y adaptativa como blanco para el desarrollo de nuevas terapias.

Estudios previos del grupo demostraron que *T. cruzi* modula la funcionalidad de células dendríticas (CDs) hacia un fenotipo con propiedades tolerogénicas, independientemente de la invasión celular. Durante la infección experimental, observamos que órganos linfoides secundarios presentan infiltrados ricos en células mieloides con funcionalidad alterada y que la transferencia adoptiva de CDs inmunogénicas deficientes en la lectina galectina-1 (Gal-1) con fines terapéuticos, favorece la inducción de respuestas Th1, la disminución del número de parásitos en sangre y la sobrevida de animales infectados en comparación con CDs controles.

En estudios más recientes, encontramos que la inoculación del parásito en piel provocó un foco inflamatorio leve, con células monocíticas que migran a órganos linfoides secundarios, condicionando el contexto de la presentación antigénica. Aún más, la infección por piel con tripomastigotes metacíclicos (mTp) versus circulantes (cTp) mostró diferencias en el reclutamiento de leucocitos al sitio de entrada del parásito además de cambios en la proporción y activación de de CDs en órganos linfoides secundarios (ganglio y bazo). En animales inoculados con mTp se observó un 100 % de sobrevida y ausencia de parásitos en sangre, mientras que los inyectados con cTp exhibieron un 80 % de mortalidad y altas parasitemias, sugiriendo que mTp y cTp generarían inmunidad diferencial.

La instrucción de CPAs en el sitio de entrada de ciertos patógenos y la inducción de respuestas controladas, son desafíos pendientes. El redireccionamiento de la inmunidad temprana, en el marco de una presentación antigénica apropiada y la generación de respuestas efectoras eficientes, prometen el desarrollo de tratamientos exitosos enfocados principalmente en el retraso o la desaparición de síntomas de la enfermedad de Chagas.

Pósters

Biología Parasitaria

2 - Caracterización bioquímica y molecular de las proteínas TolT de *Trypanosoma cruzi*

Lobo M.M.1, Balouz V.1, Cámara M. de los M.1, Buscaglia C.A.1

TolT fue caracterizado originalmente como un antígeno flagelar de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, codificado por un reducido número de genes homólogos dispuestos en tándem. Posteriormente, se determinó que era blanco de una fuerte respuesta inmune celular y humoral en animales, por lo que se evaluó su potencial como candidato vacunal y reactivo para serodiagnóstico. Búsquedas en bases de datos más recientes revelaron una mayor complejidad para los genes TolT en tripanosomátidos, tal que agrupamos sus secuencias, en 3 subfamilias llamadas TolT-A, TolT-B y TolT-C. Se procedió con la caracterización preliminar de estas subfamilias, determinándose que, estructuralmente, con algunas excepciones, sus miembros poseen un péptido señal clivable en el extremo N-terminal seguido por una región madura más conservada con algunos motivos y residuos Cys conservados y una señal de anclaje por GPI en su extremo C-terminal; además TolT-A y B son muy similares entre sí hacia su región C-terminal (desde aa 180), mientras que TolT-C diverge globalmente de estas. Sin embargo, a pesar del alto grado de similitud estructural entre secuencias, tanto sus perfiles de expresión a nivel de ARN y proteína a lo largo del ciclo de vida del parásito como los antigénicos son diferentes, fundamentando la agrupación en subfamilias. Recientemente, nos adentramos en un análisis más exhaustivo con el objetivo de iniciar una futura caracterización funcional de TolT. En primer lugar la secuenciación del genoma de TCC, cepa híbrida de igual linaje que CL Brener, permitió definir la disposición de las secuencias en el genoma. Luego ampliamos la caracterización proteica a nivel subcelular, donde observamos que, en tripomastigotes, la localización de las 3 subfamilias se extiende a lo largo de la superficie del flagelo mientras que en amastigotes cada una de ellas se restringe a regiones discretas particulares. Además, exploramos el posible rol estructural de 2 residuos Cys presentes en la región madura de todos los productos TolT, determinando que *in vivo* solamente TolT-B se ensambla en oligómeros (posiblemente trímeros) en la superficie de tripomastigotes y que estos se enlazan por enlaces covalentes intermoleculares. Finalmente, extendimos el análisis del perfil antigénico a otras especies con el cual confirmamos lo observado en humanos: TolT es un importante *target* durante la infección por *T. cruzi* y su reconocimiento parece estar dirigido hacia el extremo C-terminal común a TolT-A y B.

4 - Disrupción del metabolismo de ADP-ribósidos en *T. cruzi* por CRISPR/Cas9: Alteración en la respuesta al daño genómico y progresión del ciclo celular

Vilchez Larrea S.C., Kevorkian M.L., Fernández Villamil S.H.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

La ADP-ribosilación es una modificación postraducciona de proteínas, partícipe en la reparación del daño en ADN, regulación transcripcional y transmisión de señales. En *T. cruzi*, este metabolismo es orquestado por la poli(ADP-ribosa)polimerasa (TcPARP) y la poli(ADP-ribosa)glicohidrolasa (TcPARG). Resultados previos mostraron que TcPARP se activa frente a agentes genotóxicos y que inhibidores de PARP-1 o PARG alteran la formación de ADPr y la tasa de crecimiento de epimastigotes. El uso de inhibidores para el estudio de la función de ADPr en *T. cruzi* ha sido útil, pero es posible que la inhibición parcial de estas enzimas enmascare otros efectos o que algunos roles se den por interacción directa con otras proteínas. La adaptación del sistema CRISPR-Cas9 para tripanosomátidos permitió la obtención de líneas de CL Brener transfectadas con sgRNA dirigido contra TcPARP (Cas9PARP) o TcPARG (Cas9PARG). En condiciones basales, 36 % de la población del cultivo Cas9PARG mostró acumulación ADPr nuclear, a diferencia de lo observado en la cepa silvestre (5,9 %) y Cas9Scramble (ARN guía sin blanco genómico) (6,6 %). También se observó acumulación del daño del ADN en la línea Cas9PARP, indicando que la ausencia de TcPARP impide la correcta reparación de rupturas del ADN, incluso aquellas ocasionadas por el metabolismo basal. El tratamiento con H₂O₂ (300 μ M – 10 min) provocó un aumento de ADPr en todas las líneas, excepto en 20 % de la población Cas9PARP, que demostró ser incapaz de generar estos polímeros. La acumulación de ADPr disminuyó a los 30 min post-tratamiento, menos en Cas9PARG, en la cual se mantuvo el polímero

nuclear en más del 99 % de la población. Cas9PARP y Cas9PARG mostraron una disminución de 26 % y 60 % de la tasa de crecimiento con respecto a la cepa silvestre, apoyando los resultados previos. El análisis de la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo indicó que Cas9PARG presenta un retraso en la entrada en fase S, así como un aumento, en condiciones basales, de la población necrótica (17,4 %). Este fenómeno también se observó en menor nivel (8 %) en la línea Cas9PARP. Ensayos preliminares indican que las líneas Cas9PARP y Cas9PARG presentarían una mayor tasa de metaciclógenesis en medio TAU3AAG, pero también se observó una menor capacidad autofágica que la línea silvestre durante el hambreado en PBS. Estos resultados señalan que el metabolismo de ADPr en estos parásitos podría estar cumpliendo múltiples y diversas funciones.

6 - ESCRT III Complex in Trypanosomatids: unraveling the role of Vps32 in membrane scission required processes

Barrera N.M.1, Schoijet A.C.1,2, Massimino Stepñicka M.1, Alonso G.D.1,3

1 INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

2 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

3 Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

The ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) is a machinery that drives a diverse collection of membrane remodeling events such as endocytosis, multivesicular body biogenesis, autophagy, release of enveloped viruses, reorganization of the nuclear envelope and cytokinetic abscission during mitosis exit. ESCRTIII is the effector sub-complex for the reason that is capable to form filaments and spirals, which produces membrane constrictions. Vps32 is the most abundant protein in ESCRTIII and its dynamic over membranes is given for its molecular structure that alternates between a monomeric-closed state to polymeric-open state. Here we investigate the conservation of Vps32 in replicative stages of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. The *Saccharomyces cerevisiae* gene corresponding to the Vps32 (Snf7) was used to screen TriTrypDB databases. We found the *T. cruzi* orthologue (TcVps32) which have two alleles in CL Brener strain: TcCLB.511589.250 (Esmeraldo) and TcCLB.511229.100 (Non Esmeraldo). These sequences were used to screen *T. brucei* database resulting in a high-scored target: Tb427tmp.01.1390. Protein domains, secondary structure composed of alpha helices and charges distribution (a basic N-terminal and an acid C-terminal) were determinate showing a high conservation among eukaryotic cells. To perform a functional characterization and detect regulatory regions of TcVps32, *T. cruzi* epimastigote cells were transfected with pRIBOTEX vector containing the following hemagglutinin (HA) tagged constructs: i) full length TcVps32 (HA-TcVps32), ii) deletion of helix 5 (HA-TcVps32 Δ 5), iii) deletion of helix 5 and the linker region (HA-TcVps32 Δ 5L) and finally, iii) deletion of helix 4, linker and helix 5 (HA-TcVps32 Δ 4y5L). Additionally, In *T. brucei* procyclic form we designed an RNAi strategy where a 405bp of TbVps32 was cloned into the p2T7 vector (TbVps32-RNAi) allowing a tetracycline inducible downregulation. We confirmed the successful silencing of TbVps32 by RT-PCR after 48h of silencing induction and after 72 h we observed that the viability of the parasites was severely affected. In both models of replicative forms (*T. cruzi* epimastigotes overexpressing TcVps32 and *T. brucei* procyclic forms TbVps32 RNAi induced), we observed alterations in cell cycle progression, presumably in cytokinesis due to the presence of aberrant flagellums and the abnormal nucleus-kinetoplast configurations.

8 - Función biológica de la histona H2B.Z de *Toxoplasma gondii*

Muñoz D.1, Ganuza A.1,2, Angel S.O.1, Vanagas L.1

1 Laboratorio de Parasitología Molecular, INTECH, CONICET/UNSAM, Av. Int. Marino Km. 8.2 (B7130IWA), Chascomús, Prov. Buenos Aires, Argentina.

2 Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), Prov. Buenos Aires.

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado de humanos y animales, perteneciente al Phylum Apicomplexa. Los moduladores epigenéticos y la alteración de la estructura de la cromatina son muy importantes en la regulación de la expresión génica, la replicación y el mecanismo de reparación del ADN. Las histonas canónicas y variantes son componentes principales de la cromatina. H2B.Z es una histona variante única de Apicomplexa que conforma nucleosomas con H2A.Z en *T.gondii*, posicionándose mayormente en promotores de genes transcripcionalmente activos. Ambas histonas son modificadas post-traduccionalmente y nuestra hipótesis es que esta regulación epigenética es fundamental para el pasaje de estadio taquizoito a bradizoito. Para determinar la importancia biológica de H2B.Z y de sus acetilaciones N-terminales obtuvimos parásitos que sobre-expresan la histona salvaje (c-Myc-WT) o mutantes: con las 5 lisinas acetilables mutadas ya sea por alaninas (c-Myc-A) (aminoácido neutro) o por argininas (c-Myc-R) (aminoácido con carga positiva), todas ellas etiquetadas con c-Myc. Los parásitos no mostraron diferencias significativas en su tasa de replicación, pero observamos un aumento de la tasa de diferenciación para la mutante c-Myc-R comparada con el parental, y una disminución de la misma en la mutante c-Myc-A. Dado que H2B.Z es esencial para la sobrevivencia del parásito, decidimos realizar la disrupción génica del gen endógeno mediante el sistema CRISPR/CAS9, en los parásitos que sobre-expresan las histonas mutadas. Para esto, se diseñaron sgRNAs de 20-40 nucleótidos del marco de lectura abierto del gen H2B.Z de la región N-terminal. Se co-transfectaron los parásitos con el vector y un amplicón portando el cassette de selección de DHFR + regiones de homología con el 3' y 5' UTR de la histona endógena para inserción disruptiva por doble recombinación homóloga. La eficiencia de la transfección fue analizada por Inmunofluorescencia Indirecta. Se seleccionaron los parásitos con pirimetamina y luego de 3 pasajes se clonaron por dilución límite. Los clones fueron analizados por PCR y Western Blot, además de enviarse a secuenciar. Los ensayos fenotípicos preliminares muestran un aumento en la tasa de diferenciación para los parásitos c-Myc-R, cuya histona endógena fue deletada. En conclusión, las acetilaciones en el N-terminal de la histona H2B.Z tendrían una función importante en el proceso de diferenciación del parásito.

10 - Identificación de nuevos inhibidores del transporte de poliaminas en *Trypanosoma cruzi* reposicionados como drogas tripanocidas

Reigada C.1, Valera-Vera E.A.1, Sayé M.1, Miranda M.R.1, Pereira C.A.1

1 IDIM Instituto de Investigaciones Médicas, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Los transportadores de poliaminas, principalmente de putrescina y espermidina, de *Trypanosoma cruzi* son buenos candidatos como blancos terapéuticos contra la enfermedad de Chagas puesto que son esenciales para la supervivencia del parásito. Recientemente demostramos que un análogo sintético de putrescina denominado Ant4 (N¹-antraceno-9-ilmetil-butano-1,4-diamina dihidrocloruro) diseñado para el tratamiento contra el cáncer, inhibe el transporte de poliaminas en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, con un alto efecto tripanocida sobre este último estadio, obteniéndose un valor de IC₅₀ en el rango nanomolar. Considerando que Ant4 no se encuentra aprobado para su uso en humanos, el objetivo de este trabajo es la búsqueda mediante simulaciones computacionales y ensayos *in vitro* de análogos químicos de Ant4, con efectos biológicos similares, aprobados para su uso en humanos reposicionados para su posible uso en la enfermedad de Chagas. Inicialmente realizamos un rastreo virtual por similitud estructural de ligandos en una base de datos de drogas aprobadas en el mundo y productos naturales (sweetlead), usando como molécula de referencia Ant4. Con los candidatos seleccionados se realizó un *docking* molecular utilizando un modelado

por homología del transportador de poliaminas TcPAT12. De los compuestos obtenidos, seleccionamos tres fármacos tricíclicos para los ensayos experimentales: los antipsicóticos levopromazina y clorpromazina, y el antidepresivo clomipramina. Demostramos que estos dos últimos medicamentos inhibieron el transporte de poliaminas en epimastigotes. Clorpromazina presentó una IC₅₀ de 17,97 μ M para putrescina y de 24,62 μ M para espermidina. En cambio, clomipramina solo inhibió el transporte de putrescina con una IC₅₀ de 43,39 μ M. Ambas drogas presentaron actividad tripanocida, con valores de IC₅₀ en tripomastigotes de 1,65 μ M para clorpromazina y de 4,71 μ M para clomipramina, mientras que en epimastigotes las IC₅₀ fueron significativamente mayores, de 50,82 y 49,43 μ M, respectivamente. En conclusión, estos resultados sugieren que la clorpromazina y la clomipramina son drogas prometedoras para el tratamiento de la enfermedad de Chagas debido a que mostraron un potente efecto tripanocida al inhibir el transporte de poliaminas. Además, estos fármacos se encuentran en el mercado, ampliamente utilizados en humanos, por lo que podría reducir considerablemente los requisitos para su posible aplicación como drogas antichagásicas.

12 - Nucleosome positioning and histone methylation in *Trypanosoma cruzi*

Massimino Stepñicka M.1, Vilchez Larrea S.C.1, Beati P.1, Barrera N.M.1, Alonso G.D.1, Ocampo J.1 1

INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite with a complex life cycle that varies from infective and non-replicative to replicative but non-infective forms. It is known that gene expression is barely regulated at the level of transcription, however some differences in gene transcription levels between life cycle stages have been observed and differential histone modification has been described in trypanosomatids. Based on these observations, we postulate that chromatin remodeling might influence the life cycle of *T. cruzi*. In the present study we aim to map and compare the nucleosome positioning in epimastigotes and trypomastigotes using MNase-seq and complementarily, characterize a histone methyl transferase that has differential expression between life cycle stages. To carry on with the first objective, we obtained mononucleosomes from CL Brener (DTU VI) and Sylvio X10 (DTUI) and mapped them genome-wide using paired-end sequencing. We found that the length distribution of the sequenced DNA had a peak at 147-148bp for CL Brener and at 148-159bp for Sylvio X10, indicating the good quality of the samples. Both by local and global analyses, we found that strand switch regions (SSR) are depleted of nucleosomes, consistent with previous observations that suggest these SSR as transcription initiation sites. Moreover, we divided up the genes into up- and down-regulated in epi- vs trypomastigotes, based on RNA-seq results. Up-regulated genes showed phased nucleosomes as opposed to the unphased disposition displayed at down regulated genes, suggesting the presence of a phasing complex upstream of the more active ones. Nucleosome assembly, positioning and its interaction with DNA and other protein complexes is influenced by histone posttranslational modifications. DOT1 is a H3 methyl transferase that catalyzes mono, di and tri methylation on lys79. In mammals and yeast it's implicated in transcription regulation, cell cycle progression and DNA damage response. In *T. brucei* there are two homolog isoforms involved in the parasite cell cycle. Here, we initiate the characterization of the two isoforms present in *T. cruzi*, TcDOT1A and TcDOT1B. To test their catalytic activity, we cloned the HA-tagged isoforms and transform *dot1* Δ yeast to analyze the phenotype. We confirmed the expression by western blot. Our results show for the first time the nucleosome positioning in *T. cruzi* and represent a new approach to understand the regulation of gene expression in this organism.

14 - Presencia y posible funcionalidad de la Poli (ADP-ribosa) polimerasa en el nucléolo de *Trypanosoma cruzi*

Kevorkian M.L., Vilchez Larrea S.C., Fernandez Villamil S.H.

La Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) de *T. cruzi* (TcPARP) transloca del citoplasma al núcleo en respuesta al daño genotóxico y adiciona cadenas de polímeros de ADP-ribosa (PAR) a proteínasceptoras. En eucariotas superiores, PARP1 se encuentra en el nucléolo participando en la regulación del procesamiento del rRNA y el sensado de estrés por daños en el ADN. En *T. cruzi* aún no se ha estudiado la localización y el posible rol de TcPARP en este compartimento nuclear. Con el fin de identificar el dominio responsable de la acumulación nuclear de TcPARP, se generaron epimastigotes de *T. cruzi* que sobreexpresan diferentes combinaciones de dominios de la enzima etiquetados con HA. Por inmunofluorescencia indirecta (IFI) se observó que la región N-terminal (NT) es suficiente para la localización nuclear y que la enzima completa recombinante (TcPARP-GFP) se comporta de manera equivalente a la nativa ante el estrés. A nivel funcional se evaluó, por IFI, la producción de PAR en epimastigotes transgénicos, en condiciones basales o luego de estrés oxidativo, no evidenciando diferencias significativas con la cepa silvestre. A través del estudio de curvas de crecimiento y del ciclo celular en epimastigotes sincronizados, se comprobó que la sobreexpresión de dominios de TcPARP no altera el crecimiento. A pesar de que la sobreexpresión de TcPARP-GFP, el dominio NT-HA y NT+WGR-HA dirigió estas proteínas a una localización preferentemente nucleolar, por microscopía confocal se observó que TcPARP-GFP co-localizó con el marcador de nucléolo L1C6, mientras que las proteínas truncas generaron la deslocalización del marcador nucleolar al núcleo y citoplasma del parásito. La formación de un hilo conector entre núcleos, con la presencia de material nucleolar durante la mitosis, ha sido previamente descripta. Nuestros resultados mostraron que las proteínas recombinantes se localizan en este hilo, junto con α -tubulina y, en condiciones de estrés, PAR. Mediante inmunoprecipitación seguida por espectrometría de masa, se encontraron numerosas proteínas ribosomales PARiladas en epimastigotes, incluso en ausencia de estrés. En conclusión, se determinó el dominio responsable de la localización de TcPARP en el núcleo y su enriquecimiento en el nucléolo. La presencia de PAR y el hallazgo de proteínas ribosomales PARiladas en el hilo conector entre núcleos podría sugerir una función de TcPARP en el nucléolo de *T. cruzi*.

16 - RNA-seq analysis on *TcHMGB*-overexpressing epimastigotes: a role in *T. cruzi* chromatin structure and transcription control

Tavernelli L.E.1, Diaz-Viraqué F.2, Grieff G.2, Robello C.2, Serra E.1, Cribb P.1

1 IBR Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Rosario, Argentina.

2 Laboratorio de Interacción Hospedero-Patógeno, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Trypanosoma cruzi is the causal agent of Chagas' disease. Unlike other eukaryotes, the protein-coding genes of *T. cruzi* are arranged in large polycistronic gene clusters which are transcribed as a single RNA unit. In the last decades it was thought that trypanosomes rely solely on posttranscriptional processes to regulate gene expression.

The High Mobility Group Bs is a family of chromatin proteins, capable of binding non-canonical DNA structures through one or more domains called “HMG box”. These proteins are highly conserved among eukaryotic organisms and they are involved in several nuclear processes including transcription, replication, recombination and DNA repair. In a previous work we identified and characterized a homologous protein of HMGB in *Trypanosoma cruzi*, called *TcHMGB*. Like the HMGB1 from mammals, *TcHMGB* has two DNA binding domains “HMG box”, but it lacks the typical acidic carboxyl terminal sequence. Interestingly, *TcHMGB* has a unique amino-terminal region restrained only to the trypanosomatid HMGBs, which may confer specific properties to these proteins, different from the other family members.

We constructed a *T. cruzi* strain capable of overexpressing *TcHMGB* after tetracycline induction. We showed that *TcHMGB* is capable of binding and modifying the chromatin structure, making it more open or relaxed when overexpressed in epimastigotes. Afterwards, we analyzed if this change in chromatin may induce an up- or down-regulation of specific genes expression. For this analysis, we performed an RNA-seq

assay using Illumina-MiSeq platform and compared *TcHMGB* overexpressing parasites with the non-induced control. The quality of the reads was first evaluated with FastQC program. Adapters and low quality sequences ($Q < 30$) were removed using CutAdapt. Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) was used on mapping process with the reference genome and DESeq2 for differential analysis. In order to identify differentially expressed genes, fold-change greater than two was set as threshold to define significance. We observed that 130 genes were up-regulated while 158 genes were down-regulated when *TcHMGB* was overexpressed in *T. cruzi* epimastigotes. Further analysis regarding these genes functions and locations in the genome will contribute to understand the *TcHMGB* role in transcription control in *T. cruzi*.

18 - TcVps34-Vps15 complex is involved in autophagy and promotes metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*

Schoijet A.C.1,2, Sternlieb T.1, Alonso G.D.1,3

1 INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

2 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

3 Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Autophagy is a widespread process that consists in removing old or damaged organelles and cytosolic components through their degradation into the lysosome. In mammals, two kinases differentially regulate the process of autophagy: mTor and PI3K Vps34. In mammals and yeast, Vps34 forms a major complex with the Beclin 1 and serine-threonine kinase Vps15 proteins to promote the formation and maturation of the autophagosome. Metacyclogenesis is a process that involves the transformation of non-infective epimastigotes into infective metacyclic trypomastigotes, and is a fundamental step in the life cycle of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. This process takes place in the insect's rectum due to many factors such as shortage of nutrient produced by the fast replication of epimastigotes, specific components of intestinal wall and lumen of the vector, etc. Several changes occur during metacyclogenesis, including nuclear structure modifications, chromatin remodeling and differential protein expression, changes in cell morphology, proliferation and infectivity. In addition, it has recently been reported that autophagy promotes this process.

In this work, we demonstrate for the first time that parasites of the Y strain that overexpress TcVps34 or TcVps15 induce both autophagy and metacyclogenesis. Whether after a two-hour nutritional stress in TAU medium (Triatomine Artificial Urine) or TAU 3AG for 48 hours (TAU supplemented with proline, aspartate, glutamate and glucose), parasites overexpressing TcVps34 or TcVps15 showed higher levels of monodansylcadaverine (MDC) staining, a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles, in comparison to control parasites. Moreover, parasites overexpressing these proteins showed a more intense labeling with the autophagosome marker Atg8.1 in the intermediate forms of differentiated parasites. Finally, TcVps34 or TcVps15 overexpressing cells were able to differentiate to metacyclic trypomastigotes in a higher proportion than wild-type cells, evidenced by DAPI staining and posterior quantification. Taken together, these data demonstrate the key role of phosphatidylinositol 3-phosphate pathway and autophagy process for *T. cruzi* differentiation and cycle progression.

20 - Trypomastigote small surface antigen ablation causes infection impairment in *Trypanosoma Cruzi*

Balouz V.1, Cámara M.M.1, Cruz-Bustos T.2, Docampo R.2, Buscaglia C.A.1

1 Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo A. Ugalde” (UNSAM-CONICET), Buenos Aires.
2 Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, Athens, Georgia, USA.

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease. *tssa* (*Trypomastigote Small j_uġS_i/uġ* surface Antigen) is a mucin-like gene coding for a glycoprotein displayed on the surface of infective trypomastigote forms that shows amino acids polymorphisms among parasite isolates. These polymorphisms correlate with differential antibody responses in *T. cruzi*-infected humans and differential adhesion towards non-macrophagic cell monolayers. The TSSAII variant (present in TcII, TcV and TcVI DTUs) has been characterized as a parasite adhesin, engaging surface receptor(s) and inducing signaling pathways on the host cell as a prerequisite for trypomastigote internalization. Most interestingly, trypomastigotes over-expressing TSSAII displayed improved adhesion and infectivity towards non-macrophagic cell lines *in vitro*. Moreover, TSSAII overexpression leads to an enhanced trypomastigote-to-amastigote conversion, indicating a possible role of TSSA also in parasite differentiation. To get further insights into the functional significance of TSSA, we applied CRISPR/Cas9 technique in the RA strain (TcVI) to obtain TSSAII-KO parasites. After antibiotic selection, epimastigotes were cloned and genotyped by PCR and sequencing. *tssa* genes were successfully ablated. Clones of interest were cycled *in vitro* to obtain infective forms. We confirmed the lack of expression of TSSAII protein in trypomastigotes by Western blot and IFA. Most interestingly, at least 2 independent TSSAII-KO clones were significantly less infective in non-macrophagic cell monolayers than control cell lines in *in vitro* infection assays (p <0,05, one-way ANOVA, Bonferroni post-test). *In vivo* infection assays using immunocompetent and immunodeficient mice are underway. Altogether, our results shed new light on the role of TSSAII on the interaction between *T. cruzi* and the host cell. Elucidation of this interaction and the molecules and signals involved is essential for the discovery of new drugable targets and development of new tools to fight against Chagas Disease.

Epidemiología y Vectores

2 - Asociación entre asimetría fluctuante alar y la exposición a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* de un área con moderada resistencia a piretroides

Nattero J.1,2, Piccinali R.V.1,2, Gaspe M.S.1,2, Gürtler R.E.1,2

1 Laboratorio de Eco-Epidemiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

2 IEGEBA Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Una manera de abordar la inestabilidad o estrés durante el desarrollo en insectos es mediante estimaciones de asimetría fluctuante (AF). Este marcador denota pequeñas variaciones entre los lados de estructuras bilaterales (e.g., alas) y es utilizado como un indicador de estrés ambiental. En este trabajo investigamos la ocurrencia y patrón de AF para tamaño y conformación de alas en hembras y machos de *Triatoma infestans* colectados antes y 4 meses post-rociado con insecticidas piretroides (4MPR) de todas las viviendas de un área rural bien definida del municipio de Pampa del Indio, provincia de Chaco, Argentina. Se fotografiaron las alas de 243 adultos (97 hembras y 146 machos) colectados en pre-rociado (Noviembre/Diciembre 2007) en 11 viviendas y 112 (52 hembras y 60 machos) a 4MPR (Abril 2008) en 34 viviendas. Se utilizó morfometría geométrica basada en “landmarks” para estimar AF. Se realizaron pruebas de ANOVA a 2 vías y de Procrusto para las estimaciones de AF de tamaño y conformación respectivamente. Tanto las hembras como los machos colectados a 4MPR presentaron significativamente menores niveles de AF para tamaño y conformación alar, y menor variabilidad en AF, que los colectados en pre-rociado. Se esperaba encontrar un incremento en AF en los triatomíneos colectados post-rociado en base a que la exposición al insecticida sería un generador de estrés durante el desarrollo. Contrario a esta hipótesis inicial, los adultos de *T. infestans* colectados a 4MPR tuvieron alas más simétricas, sugiriendo una supervivencia diferencial de estos individuos frente al rociado. Dado que las infestaciones a 4MPR se asociaron al menos parcialmente

a resistencia moderada a insecticidas, esto podría indicar que los *T. infestans* resistentes son más simétricos que los susceptibles. Este patrón se ha observado en otras especies de insectos y se asocia a efectos selectivos sobre genes que atemperan los costos de la resistencia incrementando el valor adaptativo de los individuos resistentes. Teniendo en cuenta que alas simétricas les confiere a otros insectos estabilidad y aerodinamia durante el vuelo, una mayor simetría alar les conferiría mayor capacidad dispersiva a grandes distancias lo que podría tener implicancias para el control vectorial en el Gran Chaco. Estudios experimentales permitirán confirmar este hallazgo.

4 - Cuando camina sobre una superficie tratada con permetrina, una ninfa de *Triatoma infestans* hiperactivada por eugenol se intoxica más rápido que una ninfa no hiperactiva

Reynoso M.M.N.1, Lucia A.1, Zerba E.N.1, Alzogaray R.A.1

1 UNIDEF-CITEDEF-CONICET-CIPEIN Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, J.B. de La Salle 4397, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina.

La chinche hematófaga *Triatoma infestans* es el principal vector de Chagas en Argentina. El eugenol es un monoterpeneo vegetal que hiperactiva a *T. infestans* y la permetrina es un poderoso triatomicida. El objetivo de este trabajo fue averiguar si una ninfa de *T. infestans* hiperactivada capta más insecticida de una superficie tratada, y por lo tanto se intoxica más rápido, que una no hiperactiva. Se colocó un grupo de diez ninfas sobre un papel impregnado con permetrina (1840 mg/m²), se registró a distintos tiempos la cantidad de insectos volteados y se calculó el Tiempo de Volteo 50 % (TV50). La exposición a la permetrina se realizó en diferentes escenarios: (a.i) inmediatamente después de la aplicación tópica de eugenol (100 µg/insecto); (a.ii) 30 min después de la aplicación tópica de eugenol (100 µg/insecto); (b) simultáneamente a la exposición a vapores de eugenol (33 µg/cm²). Se obtuvieron los siguientes TV50 (min): (a.i) 66,75 min (controles pretratados con acetona), y 46,27 min (ninfas pretratadas con eugenol); (a.ii) 66,79 min (controles), y 66,79 min (ninfas pretratadas con eugenol); (b) 51,90 min (controles), y 39,50 min (ninfas expuestas a vapores de eugenol). En un cuarto escenario (c) las ninfas fueron individualmente expuestas a la permetrina después de ser inyectadas con eugenol (2 ng/insecto). En este caso, el tiempo promedio de volteo fue 63 min (controles), y 65,30 min (ninfas inyectadas con eugenol). En los escenarios (a.i) y (b) las ninfas se intoxicaron significativamente más rápido que en (a.ii) y (c). También se evaluó el efecto de eugenol sobre la actividad locomotora de las ninfas en escenarios similares a los anteriores. Se usaron las mismas dosis de eugenol, pero se omitió la exposición a permetrina. Se filmó el movimiento de las ninfas, y con el software Ethovision XT se cuantificó la Distancia Recorrida (DR) (cm). El eugenol hiperactivó a las ninfas solamente en (a.i) y (b). En un experimento separado, se comprobó que la exposición a permetrina no produce hiperactividad. Finalmente, se cuantificó mediante cromatografía de gases la cantidad de permetrina recuperada de ninfas no hiperactivas e hiperactivas expuestas a permetrina. En promedio, se recuperaron 0,34 µg/insecto de las ninfas no hiperactivas y 0,65 de las hiperactivas. Todos los resultados apoyan la hipótesis de que una ninfa hiperactiva capta más insecticida de una superficie tratada, y por lo tanto se intoxica más rápido, que una no hiperactiva.

6 - Diversidad genética en poblaciones de *Triatoma Infestans* de la región chaqueña argentina con distintos grados de resistencia a insecticidas

Piccinali R.V.1,2, Fronza G.3, Mougabure-Cueto G.4, Toloza A.C.3

1 Laboratorio de Eco-Epidemiología. Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.

2 IEGEBA Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires, CONICET, CABA, Argentina.

3 CIPEIN Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, CONICET-UNIDEF, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina.

La Enfermedad de Chagas afecta a más de un millón y medio de personas en Argentina y es transmitida principalmente por *Triatoma infestans* (Klug, 1834). La principal herramienta para reducir la transmisión vectorial de esta enfermedad es el control químico con el insecticida piretroide deltametrina. En los últimos años se han detectado fallas de control a campo en zonas del Gran Chaco Argentino. Estudios previos detectaron un foco resistente heterogéneo en el Dpto. General Güemes, Chaco, compuesto por poblaciones susceptibles, y con baja y alta resistencia a deltametrina. El objetivo de este trabajo fue analizar la variabilidad y estructura genética de este foco de alta heterogeneidad toxicológica para conocer la dinámica poblacional de las vinchucas y el impacto producido por las actividades de control. Se emplearon 10 loci microsatélites y 67 individuos de 6 poblaciones con el siguiente perfil toxicológico: alta resistencia (GRs > 500 o 1000): Pampa Argentina (PA), La Rinconada (LR) y El Ñandú (EÑ); baja resistencia (GR = 5 o 3): Pozo Colorado (PC) y Colonia Castelli (CC); y susceptible (GR=1): El Techat (ET). Se calcularon distintos estimadores de variabilidad genética y el ajuste a Hardy-Weinberg (HW) en cada población. La estructura genética se analizó mediante los estadísticos F_{ST} y un análisis bayesiano. Las poblaciones PC y CC fueron las más variables. PC, LR y PA mostraron desvíos significativos de las proporciones esperadas por HW. Los F_{ST} fueron significativos entre todos los pares de poblaciones excepto PA y PC. El análisis bayesiano mostró la presencia de 4 grupos genéticos diferentes (K=4) y valores variables de mezcla de los mismos en los individuos. El grupo 1 se encontró en alta proporción ($\geq 77\%$) solo en ET. El grupo 2 estuvo presente de manera significativa en todas las poblaciones de alta resistencia. El grupo 3 se encontró en LR, EÑ y en CC. El grupo 4 fue mayoritario en PC pero también aparece en CC y en PA. Nuestros resultados avalan la presencia de alta variabilidad y fuerte estructura genética en este foco de heterogeneidad toxicológica. La presencia de un grupo genético solo en una población susceptible y de otro en todas las poblaciones resistentes sugiere un origen común de las mismas. Estos resultados son el primer paso de un estudio multidisciplinario toxicológico y genético a nivel regional dentro de la provincia del Chaco el cual permitirá mejorar las estrategias de manejo de la resistencia en condiciones de campo.

8 - Estudio del riesgo de coinfección entre helmintos transmitidos por el suelo. ¿Todas las especies cenan en el mismo lugar?

Fleitas P.1,2, Gil J.F.1, Vargas P.1, Caro N.1, Canabire M.1, Escalada A.1, Tejerina V.1, Juarez M.1, Cajal S.P.1, Nasser J.R.2, Krolewiecki A.J.1, Cimino R.O.1,2

1 IIET Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales, Sede regional Orán. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, San Ramón de la Nueva Orán, Salta Argentina

2 Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

Las principales especies de helmintos transmitidos por el suelo (HTS) son *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *S. stercoralis* y las uncinarias que comprenden dos especies *N. americanus* y *A. duodenale*. La coinfecciones entre especies de HTS son usuales dado que estos parásitos se encuentran en las mismas zonas geográficas y presentan patrones de infección similares. Se ha demostrado que parásitos coinfectantes pueden interactuar, ya sea positiva o negativamente, con implicaciones en la progresión de la enfermedad, transmisión y control. El objetivo del presente trabajo fue analizar la frecuencia de las coinfecciones con HTS y las posibles asociaciones entre las distintas especies de HTS. Para lo cual se analizaron 212 muestras de materia fecal recolectadas en los departamentos de Orán y San Martín de la provincia de Salta. Se les realizó diagnóstico parasitológico mediante Telemann, McMaster, Harada mori y Baerman. A su vez, para aumentar la sensibilidad diagnóstica para *S. stercoralis*, e identificar las especies de uncinarias se realizó PCR multiplex para estas tres especies. El 71% (151/212) de las muestras dieron positivas para HTS, siendo el 40% (84/212) infecciones por una única especie de HTS y 31% (67/212) con coinfecciones. Las coinfecciones más frecuentes fueron *S. stercoralis* y *N. americanus* 31% (21/67), *S. stercoralis* y *A. lumbricoides* 27% (18/67) y coinfecciones con más de dos especies 23% (15/67). Se realizó una tabla de contingencia y se

calculó la razón de probabilidades (OR) de coinfección entre las distintas especies de HTS. Se encontró una asociación positiva entre *S. stercoralis* y uncinarias (OR= 2, 1.11-3.59, P<0.0209). Sin embargo, al analizar la asociación entre *S. stercoralis* y cada una de las especies de uncinarias solo se observó asociación entre *S. stercoralis* y *N. americanus* (OR= 2.22, 1.15-4.29, P<0.0177). A su vez también se observó asociación positiva entre *N. americanus* y *T. trichiura* (OR= 10,87, 1.75- 75.68, P<0.0115). Estos datos establecen la importancia de incluir a *S. stercoralis* en las campañas de desparasitación de HTS. A su vez dado el alto riesgo de coinfección entre *S. stercoralis* y *N. americanus*, la presencia del último, cuyo diagnóstico es más simple, podría brindar una sospecha de infección con el primero. Estudios más amplios y en distintas localidades deberán confirmar estos hallazgos así como también evaluar los mecanismos implicados en esta asociación epidemiológica.

10 - Influencia del reloj biológico en la expresión de genes relacionados con la resistencia a insecticidas en *Triatoma infestans*

Varela G.M.1, Stroppa M.M.1, Garcia B.A.1

1 INICSA, CONICET y Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad de Córdoba, Argentina.

Los programas de control de la transmisión de la enfermedad de Chagas promueven la eliminación de las poblaciones del vector *Triatoma infestans* mediante la fumigación con insecticidas piretroides. Sin embargo, se han observado fallas en el control debido a la existencia de resistencia a los insecticidas. Esta resistencia puede ser causada por un aumento en la desintoxicación metabólica de los insecticidas. Análisis previos sobre la expresión de genes citocromo P450 y del gen NADPH citocromo P450 reductasa (CPR) en poblaciones resistentes y susceptibles a deltametrina, revelaron que genes P450 estarían involucrados en el desarrollo de resistencia a insecticidas en *T. infestans*. En *Drosophila melanogaster* se demostró que la expresión de genes que codifican para enzimas con funciones de desintoxicación se encuentra bajo regulación circadiana, sugiriendo que la desintoxicación de insecticidas estaría bajo el control circadiano del reloj. Con el propósito de investigar la presencia de ritmos en la expresión de genes relacionados con resistencia a insecticida en *T. infestans*, se determinaron mediante PCR en Tiempo Real los niveles de expresión diaria del gen CPR y un gen P450 (CYP4EM7) en cuerpo graso de individuos adultos de ambos sexos. Los insectos se dividieron en grupos experimentales mantenidos bajo condiciones de 12 hs luz-12 hs oscuridad (LO), oscuridad (OO) y luz (LL) constantes. En las hembras del grupo LO el perfil de expresión diario del gen CPR mostró dos picos significativos de expresión, que se conservan en el grupo OO y se pierden en el grupo LL. Estos resultados sugieren regulación en la expresión del gen CPR por el reloj endógeno y muestran la acción disruptiva de la luz sobre el ritmo de expresión. En los machos no se observó un perfil rítmico en la expresión diaria del gen CPR. Con respecto al gen CYP4EM7, se observaron variaciones diarias en su expresión en machos y hembras del grupo LO. Las hembras presentaron un pico significativo de expresión al amanecer y los machos dos picos significativos de expresión, uno al amanecer y otro al atardecer. Dado que el mecanismo metabólico que conduce a resistencia estaría regulado por incrementos del proceso de desintoxicación, el momento del día en que la expresión de genes relacionados con la desintoxicación y la consecuente actividad enzimática es mínima podría corresponderse con el momento en el que los insectos están más susceptibles a los insecticidas.

12 - Presencia y distribución de flebótomos en parajes rurales de Orán

Copa G.N.1,2, Almazán M.C.1,2, Hoyos C.L.1, Escalada A.1, Guantay E.A.3, Moreira Abán D., Aramay L.V.2, Nasser J.R.2, Gil J.F.1,4

1 Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales-unas-Sede Regional Orán

2 Cátedra de Química Biológica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, UNSa

Los flebotomos adultos hembras son hematófagas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) de importancia médica porque transmiten parásitos del género *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Estos insectos están presentes en ambientes tropicales y subtropicales del mundo. Así mismo, su diversidad y abundancia pueden variar entre ecorregiones y dentro de estas según el paisaje y el grado de antropización. El objetivo de nuestro estudio fue identificar la presencia y diversidad de flebotomos en un área rural, en áreas de vegetación silvestre de distintos pisos de la Yungas y en un área de Chaco Húmedo. Se realizaron capturas de flebotomos mediante tramas de luz CDC en 4 áreas del departamento de Orán: El Cedral (EC) (septiembre de 2018), Pichanal (PC) (diciembre de 2017), Los Naranjitos (LN) (noviembre 2017), San Andrés (SA) (noviembre 2017) y un área vegetación colindante con El Cedral (AVC) (enero de 2016-febrero 2018; una noche por mes). Los datos fueron analizados utilizando la prueba χ^2 . Se capturaron 1317 flebotomos de los cuales el 77% correspondió al seguimiento mensual del AVC observándose una mayor abundancia en los meses de enero de 2016 y marzo de 2017. La abundancia de flebotomos por área y especie fue: 142 en EC *Nyssomyia neivai* (81,69%), *Migonemyia migonei* (14,08%), Complejo *cortelezzii* (0,07%; $p < 0,0001$); 123 en PC (*Ny. neivai* (7,32%), *Mg. migonei* (22,72%), Complejo *cortelezzii* (30,03%) y *Ev. Cortelezzii* (30,89%); ($p < 0,001$); 21 en LN (*Ny. neivai* (63,63%) y en 6 en SA (*Lutzomyia sp.*). Del total de hembras (183) de PC, EC, LN y SA, el 32,79% se estaban grávidas. El mayor porcentaje de gravidez se observó en EC (54%) seguido por PC (33%), LN (0,11%) y SA (0,03%), $p < 0,0001$. *Nyssomyia neivai* estuvo en mayor abundancia absoluta en áreas que correspondieron a selva pedemontana (EC), mientras que en la zona de la ecorregión de chaco (PC) las especies mayoritarias fueron el complejo *cortelezzii* seguida por *Mg. migonei*. Por otro lado, nuestros resultados muestran que a mayor altura la abundancia flebotomos va disminuyendo como la gravidez de las hembras, esto puede estar asociado a la disponibilidad de alimentos, como animales domésticos cercanos. Todas las especies identificadas fueron encontradas infectadas naturalmente por parásitos del género *Leishmania*, lo cual demuestra que es fundamental conocer sus distribuciones y abundancias a los fines de poder diseñar medidas más eficientes de vigilancias y prevención de la leishmaniasis a nivel local.

14 - Variación fenotípica a macro-escala en poblaciones de *Triatoma infestans* del Gran Chaco boliviano, paraguay y Monte argentino

Carbajal de la Fuente A.L.1, Piccinali R.V.1, Lobbia P.2, Cano F.3, Rojas Cortez M.4, Rojas de Arias A.5, Monte-Goncalves T.6, Nattero J.1

1 IEGEBA Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires, CONICET, UBA, Buenos Aires.

2 CeReVe Centro de Referencia de Vectores, Ministerio de Salud de la Nación, Córdoba.

3 Programa Provincial de Control de Vectores, Ministerio de Salud San Juan.

4 SANIT Fundación Salud Naturaleza Integral, Cochabamba, Bolivia.

5 CEDIC Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica, Asunción, Paraguay.

6 FIOCRUZ/ IOC Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Insectos con amplio rango de distribución presentan variación morfológica, posiblemente respondiendo a factores geográficos y/o climáticos. Las ecoregiones del Gran Chaco (GCh) y Monte (Mo) son reconocidas por la persistencia de *Triatoma infestans* (Tin), principal vector de la enfermedad de Chagas en la región, a la vez que constituyen el último reducto de su distribución geográfica. Dado que no hay información disponible sobre la plasticidad fenotípica de Tin a macro-escala, el objetivo del trabajo fue evaluar la variación del tamaño y conformación de las alas a lo largo de un gradiente geográfico latitudinal norte-sur. Se incluyeron poblaciones del GCh Boliviano (GChB: Kuriarenda KU, Cochabamba CO); Paraguayo (GChP: Campo Largo CL, Concepción CP) y Monte (Mo: Salta SA, San Juan SJ, Mendoza MZ). Se digitalizaron 9 landmarks en el ala derecha de un total de 54 hembras. Mediante morfometría geométrica se comparó el tamaño (tamaño isométrico) y la conformación (distancias de Procrustes, dP) usando análisis de variación canónica (CVA). Se construyeron matrices euclidianas para tamaño y de dP para conformación y se

representaron en árboles de Neighbor-Joining (NJ). Se estudió la correlación entre variación morfológica y geográfica mediante pruebas de Mantel. Un ANOVA para el tamaño, no mostró diferencias significativas entre las poblaciones. El CVA (84% de la variación incluida en los 3 primeros ejes) mostró que Tin del GChB (KU) difiere significativamente del resto de las poblaciones (dP <0,01), excepto de CP (GChP). La población del Monte (SA) difiere significativamente de las poblaciones del GCh (dP <0,01) no así de las restantes (SJ y MZ). Las pruebas de Mantel no revelaron asociaciones significativas. El árbol de NJ para conformación agrupó las poblaciones del GChP (CL con CP), las del Mo (SA con SJ), mientras que KU estuvo separada. Por otro lado, CO se agrupó con MZ. La población de KU es proveniente de una comunidad de pobladores originarios aislada geográficamente. La semejanza morfológica entre CO y MZ podría explicarse debido al transporte pasivo de los insectos originado por procesos migratorios, favoreciendo el intercambio génico entre las poblaciones.

Programa Nacional de Chagas, Programa Provincial de Control de Vectores (Mendoza, San Juan), PDTSPX03; PICT (2013-2538, 2014-3746/1952).

16 - Estudio de la fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) y detección de ADN de *Leishmania* en ambiente urbano de la ciudad de Corrientes

Mierez M.I.1, Rea M.J.F.1,2, Borda C.E.2

1 Cátedra de Parasitología, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina

2 CENPETROP Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina

Los flebótomos son los vectores responsables por transmitir los protozoarios causantes de las leishmaniosis, y *Lutzomyia longipalpis* es el principal vector del agente etiológico responsable por la Leishmaniosis Visceral, y otras especies son responsables por la transmisión de los agentes de la Leishmaniosis Tegumentaria Americana (LTA).

Las leishmaniosis se encuentran en franca expansión geográfica, debido principalmente a factores que contribuyen para el proceso de urbanización, como invasión de focos zoonóticos, adaptación de hospederos y vectores, susceptibilidad del hombre a la infección, asociados a cambios ambientales.

En la fauna de flebótomos en la ciudad de Corrientes fueron reportadas especies: *Nyssomyia neivai*, *Migonemyia migonei*, *Psathyromyia shannoni*, *Lutzomyia longipalpis* y es área de transmisión de LTA en humanos. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis faunístico de flebotomínos capturados en área urbana del municipio de Corrientes, dirigida a una mejor comprensión de la ecología de estos insectos y caracterizar la especie de *Leishmania* circulante en los vectores.

Para las capturas fueron utilizadas trampas de luz tipo CDC durante tres noches consecutivas, que fueron colocadas de las 18h a las 7h, semanalmente, en el período de 2013 a 2017, en el peridomicilio de una vivienda en zona urbana de la ciudad de Corrientes.

Durante el período de estudio fueron encontrados 13.657 flebótomos. De estos, 11.197 machos y 2.400 hembras.

Se identificaron dos especies: *Lu. longipalpis* y *Ny. neivai*, principales vectores de leishmaniosis visceral y leishmaniosis tegumentaria, respectivamente.

Sólo ocho ejemplares de *Ny. neivai* (3 machos y 5 hembras) se identificaron en uno de los meses de capturas (junio).

Lu. longipalpis fue la especie más abundante y la única identificada, todos los meses, tanto en período seco como en el lluvioso. La abundancia relativa mensual de *Lu. longipalpis* fue mayor en los meses de marzo, abril y mayo y octubre a noviembre.

Para caracterizar la especie, el fragmento 120 pb de *Leishmania* de los minicírculos de DNA del kinetoplasto (kDNA), fue amplificado usando cebadores 150 y 152. Cepas de referencia *L. braziliensis* (M2904) y *L. amazonensis* (LTB00169).

Se demostró la presencia de *Leishmania amazonensis* en dos *Lu. longipalpis*

Pudimos observar en este municipio una adaptación de estos vectores al ambiente urbano, reforzando la

18 - Infectividad a *Triatoma infestans* mediante xenodiagnóstico artificial en personas seropositivas de dos áreas endémicas para la enfermedad de Chagas

Macchiaverna N.P.1, Enriquez G.F.1, Sartor P.2, Fernandez M. del P.3, Gürtler R.E.1, Cardinal M.V.1

1 Laboratorio de Eco-epidemiología-IEGEB-UBA/CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

2 Coordinadora Técnica, Programa de Chagas, Ministerio de Salud de la Nación y Profesora Adjunta, Universidad Nacional del Nordeste

3 Laboratory of Eco-epidemiology, Earth Institute, Columbia University, New York City, New York, Estados Unidos

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, es hiperendémica en la ecoregión del Gran Chaco. Nuestro laboratorio lleva a cabo un programa de investigación y control que incluye la vigilancia entomológica y diagnóstico serológico de la población en dos municipios del Chaco argentino. Uno de los objetivos del proyecto es caracterizar el rol de los humanos en el ciclo de transmisión doméstico. Particularmente, se buscó identificar individuos infecciosos y determinar la infectividad al vector de habitantes seropositivos de estas áreas. Definimos a un individuo como infeccioso si es capaz de infectar al vector, y a la infectividad como el porcentaje de triatomos infectados de los que se alimentaron de sangre del individuo. Se examinaron 177 residentes seropositivos de Pampa del Indio y Avia Terai, por xenodiagnóstico artificial (XDA) entre el 2013 y 2017. Se considera artificial ya que la persona no entra en contacto directo con los triatomos sino que 20 *Triatoma infestans* de IV estadio se alimentaron con 3ml de sangre heparinizada a través de un dispositivo. Se realizaron GLMs para identificar factores asociados a la infectividad.

El 60 % de los XDA fueron realizados en mujeres, el 54 % en personas de la etnia Qom, el 71 % en habitantes de Pampa del Indio y la edad media fue 24 años (rango= 3-71). El 31 % (IC=25-38) de los pacientes resultó infeccioso y la infectividad media fue de 5 % (IC=4-6). El número medio de triatomos infectados en XDA positivos fue de 3 y la infectividad media fue del 16 % (IC=13-19). La tasa de muda fue de 10 % y la de mortalidad a los 30 días fue de 11 %; similar a la hallada en XD naturales en perros, gatos y mamíferos silvestres (8-15 % y 3-6 %, respectivamente) por nuestro grupo de trabajo. La infectividad se vio afectada por la interacción entre etnia y edad, siendo que para los Qoms la infectividad disminuyó un 5 % más por cada año con respecto a los criollos. No hallamos asociación entre la infectividad y el género, municipio de residencia y el reporte de haber observado presencia de triatomos en la vivienda en algún momento de la vida de la persona.

En este estudio determinamos que el 31 % de la población seropositiva tiene parasitemia patente lo cual los transforma en una importante fuente de parásitos para el vector. El XDA tiene la ventaja de ser un método no invasivo en comparación con los XD naturales, y sería un buen método para la obtención de aislados parasitarios desde humanos seropositivos.

20 - Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en la Ciudad de Chascomús

Rivera E.M.1, Sanchez P.2, Gomez E.3, Lavayén S.N.4, Silva A.P.4, Clemente M.2, Angel S.O.1

1 Laboratorio de Parasitología Molecular, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) CONICET-Universidad Nacional de General San Martín

2 Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) CONICET-Universidad Nacional de General San Martín

3 Hospital Municipal San Vicente de Paul, Chascomús- Provincia de Buenos Aires. 4 Instituto Nacional de

La infección por *Toxoplasma gondii*, el agente causal de la toxoplasmosis, es muy común en humanos en todo el mundo, siendo la ingesta de carne cruda o mal cocida, frutas, vegetales y agua contaminadas con quistes las principales vías de ingreso. Se considera que la seroprevalencia a nivel mundial se encuentra entre el 30-50 % pero estos valores varían de acuerdo con la región, diferencias climáticas, dieta e higiene. Recientemente, en un estudio realizado por el Hospital Alemán de la ciudad de Buenos Aires se pudo observar un valor de prevalencia de 21.1 % en 2017. El objetivo general del presente trabajo fue determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres embarazadas en la ciudad de Chascomús y su asociación con hábitos de la población. Se realizó una recopilación de datos de serología de toxoplasmosis reportada en el Hospital Municipal San Vicente de Paul durante los años 2014, 2015, 2016 y 2017. Además, se confeccionó una ficha epidemiológica que fue completada por profesionales del área de ginecología y obstetricia, que nos permitió obtener información sobre posibles factores de riesgo asociados a la infección por *T. gondii*. Los datos fueron analizados por el software de acceso libre Epi Info 7. De esta forma se obtuvieron datos de serología de 983 pacientes que dieron a luz en dicho hospital. La prevalencia observada fue del 34,28 % (IC 95: 31,38 – 37,25), mediante la técnica de hemaglutinación indirecta (HAI). Los factores de riesgo analizados fueron: Residencia, urbana vs urbana/rural y urbana vs rural, *O.D:* 1.05 (0.56-1.96) y 0.45 (0.11-1.83) respectivamente. Fuente de agua en el hogar, red vs pozo, *OD:* 0.70 (0.41-1.20). Cría de animales, *OD:* 1.29 (0.75-2.24). Presencia de gato, *O.D:* 0.78 (0.45-1.38). Trabajos de jardinería, *O.D.:* 1.03 (0.48-2.20). Consumo de carne de cerdo, de oveja y embutidos con su frecuencia. Una vez por semana (*UPS*), más de una vez (*Más UPS*) y menos de una vez (*Menos UPS*). Carne de cerdo *O.D:* 1.32 (0.78-2.22), *UPS* 0.93 (0.40-2.17), *Más UPS* 1.96 (0.85-4.52) y *Menos UPS* 1.31 (0.75-2.30). Carne de oveja *O.D.:* 1.05 (0.65-1.71), *UPS* 0.99 (0.36-2.78), *Más UPS* 1.29 (0.55-3.04) y *Menos UPS* 1.01 (0.60-1.71). Embutidos *O.D.:* 0.68 (0.37-1.24), *UPS* 0.73 (0.34-1.58), *Más UPS* 1.11 (0.52-2.39) y *Menos UPS* 0.52 (0.27-1.02). En conclusión, la prevalencia del 34.28 % fue mayor a la observada en la ciudad de Buenos Aires (21.1 %) y no se encontró una asociación entre los factores de riesgo analizados y la infección por *T. gondii*.

Inmunología

2 - Análisis de la activación celular y la expresión de marcadores de respuesta exhausta en linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Alcaráz P.B.1, Girard M.C.1, Fernández M.2, Hernández Y.2, Chadi R.3, Gómez K.A.1, Acevedo G.R.1

1 Laboratorio de Inmunología de las Infecciones por Tripanosomátidos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET), Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chabén” (INP-ANLIS), Ciudad de Buenos Aires, Argentina

3 Hospital General de Agudos “Dr. Ignacio Pirovano”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Los linfocitos T juegan un rol central en la respuesta inmune adaptativa frente a la infección por *T. cruzi*. En el estadio crónico de la enfermedad de Chagas, se observó que los pacientes tienen una alta frecuencia de células T activadas y que estas son importantes para controlar la parasitemia. Aún así, se ha postulado que la exposición persistente al antígeno puede llevar al desarrollo de un perfil de células T exhaustas donde, entre otras características, hay una mayor expresión de receptores inhibitorios y pérdida de funciones efectoras. Adicionalmente, se ha descrito que la frecuencia de células con este perfil tiene relación directa con el desarrollo de patología cardíaca.

En el presente trabajo analizamos la activación de linfocitos T mediante el método de marcadores de activación en superficie celular (AIM, por Activation Induced Markers) en pacientes con enfermedad de Chagas crónico y evaluamos la expresión de los marcadores de células exhaustas TIGIT, TIM-3 y LAG-3 en los mis-

mos, cuyo perfil se desconocía hasta el momento. Para esto, células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Chagas crónico, tanto asintomáticos como con cardiopatía, e individuos no infectados con *T. cruzi*, fueron incubadas por 18-20 h bajo tres condiciones diferentes: ausencia de estímulo antigénico, lisado de tripomastigote-amastigote de *T. cruzi* y PHA (estímulo antigénico-inespecífico fuerte). Posteriormente se realizó la marcación con anticuerpos y la lectura de resultados por citometría.

Se observó una mayor activación de linfocitos T CD4⁺ en pacientes asintomáticos que en pacientes con cardiopatía y no infectados. Por otra parte la expresión de LAG-3 es mayor en los pacientes con cardiopatía, independientemente del estímulo. A su vez, frente al estímulo con PHA, los pacientes con enfermedad de Chagas crónica presentan una expresión mayor de este marcador comparado con los sujetos no infectados. También de forma independiente del estímulo, tanto TIGIT como TIM-3 presentan una expresión mayor en los pacientes con Chagas y entre ellos es más alta en los pacientes con cardiopatía.

En conclusión, el método AIM evidenció una activación diferencial de linfocitos T CD4⁺ entre los grupos de pacientes con enfermedad de Chagas crónico. Además se observaron diferencias en la expresión de los marcadores TIGIT, TIM-3 y LAG-3 en relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas crónica.

4 - Cambios en la frecuencia de células productoras de IFN- γ específicas para *Trypanosoma cruzi* luego de la administración *in vitro* de IL-7, IL-27 e IL-15

Natale M.A.1,2, Alvarez M.G.3, Castro Eiro M.D.1,2, Bertocchi G.3, Lococo B.3, Albareda M.C.1,2, Laucella S.A.1,2,3

1 Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 CONICET Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

3 Hospital Interzonal General de Agudos “Eva Perón”, San Martín Provincia de Buenos Aires, Argentina

Las citocinas IL-7, IL-15 e IL-27 poseen roles importantes en el mantenimiento y función de células T y señalizan a través de la vía JAK/STAT. Previamente, hemos demostrado que los individuos con infección crónica con *Trypanosoma cruzi* muestran señales de agotamiento inmune, con una baja frecuencia de linfocitos T productores de IFN- γ específicos para el parásito, y alteraciones en la señalización del receptor de IL-7. En este trabajo, evaluamos si la administración *in vitro* de IL-7, IL-27 e IL-15 restituye la producción IFN- γ en respuesta a antígenos de *T. cruzi* en células mononucleares periféricas, mediante la técnica de ELISPOT. La adición de 50 ng/ml de IL-7 o IL-27 en un ensayo de ELISPOT por 20 h, aumentó la producción de IFN- γ específica para *T. cruzi* en individuos infectados que presentaban niveles detectables de células productoras de IFN- γ antes del tratamiento. Por el contrario, no se observaron cambios significativos en aquellos pacientes en los que no se detectaban células productoras de IFN- γ . Posteriormente determinamos si un cultivo de 10 días con antígeno de *T. cruzi* en presencia de las citocinas lograba expandir la población de linfocitos T productores de IFN- γ . Coincidentemente con el ELISPOT de 20 h, solo mostraron un aumento en las células productoras de IFN- γ ante el agregado de las citocinas, aquellos individuos que presentaban respuesta celular hacia el *T. cruzi* en forma basal. No se observaron cambios en la producción de IFN- γ específica para *T. cruzi* en los controles no infectados. La adición de IL-15 no indujo un aumento en las frecuencias de células productoras de IFN- γ . En conclusión, la adición exógena de IL-7 o IL-27 no pudo mejorar la respuesta celular T específica para *T. cruzi* en pacientes con niveles basales no detectables de IFN- γ . Estos resultados sugieren que o bien la vía JAK/STAT es disfuncional o las células T específicas de *T. cruzi* no estarían presentes en circulación, probablemente como consecuencia del proceso de agotamiento inmunológico.

6 - Caracterización de vesículas extracelulares como mediadores en la comunicación de células dendríticas y *T. cruzi* *in vitro*

Ancarola M.E.1, Gutierrez B.1, Marcilla A.2, Cucher M.1, Poncini C.1

1 IMPaM, UBA-CONICET

2 Universidad de Valencia, España

La comunicación por mediadores solubles o vesículas extracelulares (VEs) juega un rol fundamental en la regulación de procesos celulares (Colombo, 2014). En la actualidad las VEs son consideradas vehículos importantes en la comunicación intercelular ya que transportan distintos componentes (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) de una célula a otra. Existen distintos tipos de VEs, siendo las mejor caracterizadas las microvesículas (MVs) y los exosomas.

Estudios de caracterización de mediadores involucrados en la comunicación intercelular liberados por células dendríticas (CDs) en contacto o no con tripomastigotes de *T. cruzi* (Tp) demostraron un aumento en la liberación de VEs por CDs en presencia del parásito. Al caracterizar la distribución de frecuencia de tamaños de VEs encontramos partículas compatibles con microvesículas y exosomas. Se analizó la presencia de proteínas por SDS-PAGE, encontrándose CD63 y moléculas del CMHI. Además, se detectó ARN intravesicular por electroforesis capilar. El análisis comparativo de la composición proteica de VEs de CDs controles (sin estimular) y estimuladas con el parásito por proteómica mostró diferencias en el perfil de proteínas con actividad de transporte y de localización extracelular. En ensayos funcionales de co-cultivo de CDs controles con VEs provenientes de CDs sin estimular o estimuladas con el parásito se observó un aumento en la incorporación de VEs provenientes de la interacción de CDs con Tp por microscopía confocal. En paralelo, observamos que las VEs controles o de interacción con el parásito no modificaron significativamente el perfil de expresión de moléculas de activación en CDs, tales como el CD86 y moléculas del CMHII. Sin embargo, resultados preliminares mostraron que tanto las VEs provenientes de CDs controles como las de la interacción con el parásito disminuyen la producción de TNF- α e IL-10 en sobrenadante de CDs activadas con LPS.

Proponemos una mejor caracterización de mediadores involucrados en la interacción CD-Tp con fines terapéuticos.

8 - Impacto del bloqueo de CD40-CD40L en la génesis de la patología chagásica

Frank F.M.1, Quebrada Palacio L.P.2, Wagner D.H.3, Postan M.2, Petray P.B.1

1 IMPaM, Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

2 Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

3 Webb Waring Center and Department of Medicine, University of Colorado, Denver, Anschutz Medical Campus, USA

El sistema CD40-CD40L es un mediador crucial de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes. Previamente demostramos que en la infección *in vitro* con *Trypanosoma cruzi* los miocardiocitos murinos expresan CD40 y la estimulación con su ligando induce producción de IL6. La expresión de CD40 se corroboró *in vivo* desde una fase temprana de infección. Establecida la miocarditis, su expresión se torna más extensiva, involucrando a linfocitos infiltrantes y miocardiocitos. Nuestro objetivo fue investigar el papel de CD40-CD40L en la génesis de la patología chagásica. Para ello recurrimos a una estrategia basada en el potencial de péptidos sintéticos para interrumpir interacciones ligando-receptor. Empleamos dos modelos experimentales: ratones Balb/c infectados con tripomastigotes RA (Balb/c-RA) y ratones C3H infectados con tripomastigotes Sylvio X-10/4 (C3H-Sylvio). El modelo Balb/c-RA se caracteriza por una fase aguda con elevada parasitemia y mortalidad, mientras que el modelo C3H-Sylvio muestra una fase aguda con baja parasitemia y una infección progresiva hacia la cardiopatía inflamatoria con severo daño tisular. Los ratones infectados recibieron el péptido bloqueante CD154-CU2376H por vía iv 3 veces por semana durante 1 mes a partir del día 0 pi (Balb/c-RA) o 30 pi (C3H-Sylvio). Se incluyeron controles tratados con péptido irrelevante o vehículo. Al final del tratamiento los ratones se eutanasiaron y se extrajo miocardio y músculo esquelético para histopatología. El grupo Balb/c-RA tratado desde el inicio de la infección con CD154-CU2376H fue incapaz de controlar la parasitemia y no sobrevivió frente a la infección aguda. En este grupo se observó un aumento ($p<0,05$) de la densidad de nidos de amastigotes y mayor área de calcificaciones ($p<0,05$) tanto en miocardio como en músculo esquelético, pero no se registraron diferencias en la magni-

tud de la inflamación respecto de los controles. El grupo C3H-Sylvio que recibió CD154-CU2376H a partir del día 30 pi presentó discretos focos inflamatorios y una disminución ($p < 0,05$) de la fibrosis en corazón comparado con los controles que mostraron intensos infiltrados inflamatorios, fibrosis y depósitos de calcio asociados a injuria tisular. No hubo diferencias significativas en músculo esquelético. Estos resultados sugieren que dependiendo del contexto temporal, la vía CD40-CD40L estaría involucrada en el control de la carga parasitaria aunque también contribuiría al desarrollo de patología cardíaca durante la infección por *T. cruzi*.

10 - Participación de la autofagia inducida por ácido ursólico en la eliminación de *Trypanosoma cruzi* en macrófagos

Vanrell M.C., Casassa A.F., Romano P.S.

IHEM-CONICET Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, Dr. Mario Burgos

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas que es endémica en América Latina. Afecta de 6 a 8 millones de personas en esta región y provoca, en promedio, alrededor de 12.000 muertes al año. La autofagia es una vía de transporte vesicular requerida para la homeostasis celular con importantes funciones en el organismo, principalmente degradativas. El ácido ursólico es un compuesto natural triterpénico pentacíclico, que en diferentes trabajos ha demostrado ser inductor de la autofagia, posee actividades antiinflamatorias y tripanocida. En estudios previos hemos demostrado que en ratones deficientes en la vía autofágica, la infección es más agresiva. Además, la inhibición de la vía autofágica incrementa el número de amastigotes por macrófago. Hemos observado reclutamiento en el parásito, de proteínas involucradas en la vía autofágica. Por lo que postulamos que esta vía participa en la eliminación de amastigotes intracelulares por medio de la xenofagia una vía de captura y degradación de microorganismos intracelulares dependiente de la autofagia.

El principal objetivo de este trabajo es estimular farmacológicamente la vía autofágica con ácido ursólico y de esta manera acelerar la eliminación de *T. cruzi*.

Trabajamos con células Raw, donde inicialmente verificamos que el ácido ursólico estimula la vía autofágica. Interesantemente, el porcentaje de macrófagos infectados disminuye a lo largo del tiempo y este proceso es más exacerbado en macrófagos tratados con ácido ursólico. Posteriormente corroboramos que el efecto observado en los macrófagos tratados es consecuencia de la inducción autofágica ya que se revierte el efecto con el inhibidor autofágico wortmanina. Al estudiar la respuesta oxidativa de los macrófagos en las diferentes condiciones, observamos un aumento de la producción de ROS en los macrófagos tratados con ácido ursólico. Debido a que hay antecedentes que demuestran que los ROS son inductores de la autofagia, consideramos que la inducción de la misma producida por ácido ursólico sería mediada por un aumento en la generación de ROS.

Concluimos que el ácido ursólico, a través de la producción de ROS, estimula la vía autofágica favoreciendo la eliminación de amastigotes.

12 - La vía AMPc-Epac estaría involucrada en la entrada del parásito y a la alteración de la respuesta en Células Dendríticas humanas infectadas con *Trypanosoma cruzi*

Musikant D.1, Gori S.2,3, Salamone G.2, Edreira M.M.3

1 Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA

2 Instituto de Medicina Experimental IMEX- CONICET, Academia Nacional de Medicina

3 IQUIBICEN-Departamento de Química Biológica, FCEN, CONICET-UBA

Trypanosoma cruzi altera la maduración de las células dendríticas (DC) hacia un fenotipo modulador e inmunosupresor de la respuesta inmune (Van Overtlet L, 1999; Poncini C, 2008; Alba Soto C, 2010). La

activación de vías mediadas por el AMPc está asociada al proceso de maduración de las DC orquestando la liberación de citoquinas asociada a un perfil de respuesta Th2 e inmunoregulatorio, por ejemplo: disminución de IL-12 y TNF α , aumento de IL-10 (Garay J, 2010; Bagley K, 2002, Rueda C, 2016). Tradicionalmente se asocia a esta vía con PKA, pero actualmente se sabe que también activa a la proteína intercambiadora de GTP (Epac) quien a su vez activa a la GTPasa Rap1. En distintos modelos se observó que PKA y Epac participan de manera independiente, sinérgica o antagónicamente en este proceso de maduración de las DC (Garay J, 2010). Recientemente, nuestro grupo describió la capacidad del parásito de inducir un aumento en los niveles de AMPc y en el porcentaje de infección, efecto mediado específicamente por la vía de AMPc-EPAC, al infectar con *T. cruzi* a una línea celular epitelial (Musikant, 2017). En un modelo de infección *in vivo* con *L. amazonensis* se asoció al aumento de AMPc con un perfil de citoquinas inhibitorias en las DC como mecanismo de evasión (Figueiredo, 2017). En el presente trabajo nos propusimos extender nuestro modelo de estudio de las vías de AMPc en la infección por *T. cruzi* a DC derivadas de monocitos humanas (hDC) de fenotipo inmaduro. Para ello, aislamos monocitos a partir de células mononucleares totales de sangre periférica mediante el método de Percoll y los mismos se cultivaron por 5 días en presencia de IL-4 (30 ng/ml) y GM-CSF (30 ng/ml) (Gori et al 2017). Cuando infectamos estas células 30 minutos con parásitos de la cepa Y de *T. cruzi*, observamos un aumento en los niveles intracelulares de AMPc ($p < 0,05$). Analizamos los efectos sobre la infección de hDC con una batería de activadores, inhibidores y análogos específicos de las vías de PKA y EPAC (tiempo) y observamos un aumento en los porcentajes de infección y en el número de amastigotes/100 células ($p < 0,05$) al activar la vía AMPc-Epac-Rap1. Coincidentemente con otros modelos de hDC inmaduras infectadas con *T. cruzi* (Van Overtlet, 1999) el nivel de producción de IL-10 e IL-12 fue bajo, no pudiendo observarse diferencias con las hDC no infectadas. Estos resultados constituyen una primera aproximación al estudio de las vías de señalización involucradas en los efectos inmunomoduladores que genera la infección con *T. cruzi* en el fenotipo y funcionalidad de la DC.

14 - Proteínas antigénicas semipurificadas desde una línea celular de *Echinococcus granulosus* G1, EGPE, son reconocidas por sueros de pacientes infectados

Fuchs A.1, Maglioco A.1,2, Peralta M.E.1, Jensen O.3, Gertiser M.L.3, Gentile J.4, Hernandez C.4, Canziani G.2

1 CECIHS-UAI. Centro de Altos estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, Universidad Abierta Interamericana, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 CONIET, ciudad de Buenos Aires, Argentina

3 Centro de Zoonosis, Ministerio de Salud, Prov. de Chubut, Argentina

4 Hospital Municipal, Ramnòn Santamarina, Tandil, Prov. de Buenos Aires, Argentina

Introducción: En nuestro laboratorio tenemos la línea celular EGPE (In vitro-animal 2010). Anteriormente hemos comunicado (SAI 2017, SAI 2016) que el extracto proteico de estas células es reconocido por el 100 % del suero proveniente de pacientes con hidatidosis cística y por el suero de ovinos infectados con *E. granulosus* por el método de Western blot (WB). **Objetivo:** Identificar las proteínas del extracto celular involucradas en el reconocimiento inmunológico. **Materiales y Métodos:** Se realizaron los extractos proteicos de las células EGPE, luego de 7 días de cultivo y del líquido y arenilla hidatídica (LH) provenientes de metacestodos G1 con 8 mM CHAPS, 10 mM Tris-HCl, pH 8; 2mM EDTA, 0,1 % β -ME, 1/ 100 inhibidor de proteasa. Las proteínas provenientes de las células se concentraron utilizando el concentrador 3K (Pierce) y se diluyeron en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,4. Se eluyeron por una columna de Sephacryl 200 HR (1,56 x 86 cm). Los picos de proteínas se leyeron a 215 nm. Los picos encontrados fueron utilizados para la realización de WB y las fracciones positivas, reconocidas por los sueros de los pacientes, fueron concentradas y diluidas en PBS. Las proteínas obtenidas del LH fueron concentradas de la misma forma. Se procedió a sembrar en placas de 96 wells de alta afinidad para proteínas 1 ug prot del LH, de los picos proteicos obtenidos por la columna y del homogenato total de células EGPE. El ELISA indirecto se realizó utilizando los 21 sueros de pacientes y sus 21 controles, anteriormente utilizados en los trabajos ya informados. El 2 anticuerpo fue un anti IgG anti Fc (Sigma) humano marcado con HRP. Los controles de técnica se realizaron sin el agregado

del suero y con el 2 anticuerpo, las muestras se leyeron a 450 nm. **Resultados:** los sueros de los pacientes dieron diferencias significativas $p < 0,05$ respecto a los controles, 8 muestras fueron falsos negativos (28,52 %) y 7 falsos positivos, con el extracto de LH. Del extracto de proteínas de EGPE se obtuvieron 2 fracciones por cromatografía: 69-75 (A); 85-92 (B) positivas para el WB. El ELISA en EGPE total dio diferencias significativas entre infectados y controles, $p < 0,05$, con 3 falsos negativos y un falso positivo. La fracción A también mostró resultados diferentes entre controles y pacientes, $p < 0,05$ con 1 falso negativo y 5 falsos positivos y la fracción B, que también mostró diferencias significativas no presentó falsos negativos y 3 falsos positivos. **Conclusión:** El homogenato proteico proveniente del LH es menos sensible que el proveniente de las células EGPE y las fracciones obtenidas por la columna de exclusión molecular muestran mayor sensibilidad de detección.

16 - De la brucelosis a la tripanosomiasis: la Omp19 como un inmunomodulador de la respuesta frente a *Trypanosoma cruzi*

Urbano K., Casasco A., Bruno L.2, Petray P.B., Cassataro J.2, Frank F.M.

1 IMPaM Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (UBA-CONICET)

2 IIB-INTECH, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas—“Dr. Rodolfo A. Ugalde” Instituto Tecnológico de Chascomús Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), CONICET.

La falta de una estrategia terapéutica efectiva y segura, así como de una vacuna preventiva o terapéutica que ayude a contrarrestar la patogenia causada por *T. cruzi* en los enfermos de Chagas, ha promovido que en los últimos años surja la idea de combinar inmuno y quimioterapias tomando ventajas de ambos. La Omp19 es una proteína de *Brucella* spp., capaz de activar células dendríticas, de promover la estabilidad y la presentación de antígenos (Ags) a través de su acción como inhibidor de proteasas (Coria, 2016). Nos propusimos evaluar el potencial inmunoterapéutico de Omp19 junto a antígenos parasitarios (Ags). Se infectaron ratones de la cepa C3H, hembras 8 semanas de edad con tripomastigotes de la cepa RA y se trataron con: Ag (50 µg) +Omp19 (100 µg), Ag (50 µg) o vehículo (PBS) al 1° y 7° dpi. Otro grupo de ratones, recibió 100 mg/kg/día de benznidazol (BNZ) durante 14 días consecutivos. Durante la fase aguda de la infección observamos una importante reducción de la carga parasitaria en los grupos tratados respecto al control (PBS). En la medida que las parasitemias fueron aumentando, los ratones control fueron perdiendo peso, llegando a perder más del 50 % de peso corporal, llevando a la muerte al 60 % de los animales tratados solo con el vehículo. A los 100 dpi, ya sin parásitos circulantes, analizamos la respuesta inmune celular *in vivo* mediante la inoculación de antígenos intradermoplantar y midiendo la reacción a las 48 hs. Pudimos comprobar que la respuesta obtenida en los animales tratados con OMP19+Ags fue significativamente mayor que en los demás grupos tratados. Obteniendo similares resultados en cuanto a títulos de anticuerpos específicos, con títulos 8 veces más altos, indicando que el tratamiento con OMP19+Ag durante la infección es capaz de potenciar la respuesta tanto celular como humoral. Los datos más llamativos los encontramos al analizar la inflamación tisular, el objetivo más importante a considerar en busca de la prevención de la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Encontramos que los animales tratados con Ags solos, Bnz o PBS presentaban grandes focos inflamatorios, y el caso de los PBS incluso pueden observarse células necrosadas. Sin embargo, los animales tratados con OMP19+Ags se encontraron perfectamente sanos, sin presencia de infiltrados, células adiposas, ni nidos de amastigotes. El grado de protección tisular que se logró en estos animales, es el mayor que hemos reportado hasta el momento.

18 - La subfamilia TcTASV-C de *Trypanosoma cruzi* junto con uOmp19 genera protección contra una infección letal del parásito

Caeiro L.D., Rizzi M., Rodriguez M.E., Pueblas Castro C., Coria L., Cassataro J., Tekiel V.

La subfamilia TcTASV-C de *Trypanosoma cruzi* está conservada en diferentes linajes y no posee ortólogos en otros organismos, está compuesta por aproximadamente 15 genes, se expresa en la superficie de tripomastigotes, se secreta al medio e interactúa con células de mamífero.

Estudios previos sugieren que TcTASV-C es un factor de virulencia durante la fase aguda de la infección y podría ser un buen blanco para el desarrollo de vacunas. Para evaluar la potencialidad de TcTASV-C como antígeno vacunal, previamente empleamos un esquema de vacunación de tipo dosis-refuerzo (2x[TcTASV-C ADN+ GM-CSF] + 2x[rTcTASV-C + hidróxido de aluminio]). Los ratones vacunados y desafiados con *T. cruzi* presentaron menor parasitemia y mayor sobrevida que los controles, con una respuesta de anticuerpos IgG1/IgG2a. Sin embargo, no pudimos detectar respuesta celular. Por ello, en este trabajo empleamos rTcTASV-C (GST como control) junto con distintos adyuvantes en distintos esquemas de inmunización, con el objetivo de mejorar la respuesta celular, estimular simultáneamente diversas vías del sistema inmune y mejorar la capacidad protectora anti *T. cruzi*. Utilizamos saponina -inductor de respuesta celular- hidróxido de aluminio -inductor de respuesta humoral- y uOmp19 -favorece la presentación cruzada y la respuesta celular. La mayoría de los esquemas de vacunación permitieron un control parcial de la parasitemia en etapas tempranas de infección (evidenciado por el retraso en la aparición de tripomastigotes circulantes), con alta respuesta humoral mixta, pero no mejoraron significativamente la sobrevida respecto de los controles. Sin embargo, con el esquema de inmunización rTcTASV-C+uOmp19 los animales presentaron mayor sobrevida (40 % vs 0 %) y una parasitemia significativamente menor ($p < 0,05$, Mann-Whitney), manteniéndose controlada por debajo de 10^6 tripomastigotes/ml la mayor parte de la etapa aguda en los animales vacunados pero no en los controles. Estos resultados muestran que la inmunización con TcTASV-C induce protección frente a *T. cruzi* y sugieren que sería posible obtener mejores parámetros de protección empleando combinaciones novedosas de antígenos y adyuvantes que mejoren la respuesta celular.

20 - Respuesta inmune celular y humoral tras la inmunización en mucosa oral o nasal: estrategias para el desarrollo de una vacuna anti-*T. cruzi*

Pacini M.F.1, González F.B.1, Villar S.R.1,2, Farré C.1,2, Cabral N.1, da Silva Oliveira Barbosa E.1, Derio M.1, Armando M.1, Chapo G.2, Espariz M.4, Blancato V.4, Bontempi I.3, Cabrera G.3, Prochetto E.3, Marcipar I.3, Magni C.4, Pérez A.R.1,2

1 IDICER CONICET-UNR

2 CIPREB, FCM-UNR

3 UNL

4 IBR CONICET-UNR

Actualmente no existen vacunas para controlar el parásito *T. cruzi*. Este parásito es capaz de infectar a través de mucosas. Por lo tanto, en este trabajo evaluamos la inmunogenicidad de una Transialidasa recombinante (TSr) de *T. cruzi* acompañada por distintos adyuvantes o sistemas de “*delivery*” y administrada en mucosas oral o nasal, como una potencial estrategia para el desarrollo de una vacuna profiláctica. La TSr fue expresada y purificada a partir de *L. Lactis*. La TSr (10 µg/dosis) se emulsionó en dos tipos de adyuvantes (di-c-AMP 5µg/dosis o ISPA, 20µg/dosis) y también se utilizó directamente a la bacteria *L.lactis* productora de TSr como sistema de “*delivery*” (1.10^6 bacterias=10 µg de TSr). A nivel nasal se administró: TSr sin adyuvante (G1); TSr+c-di-AMP (G2), TSr+ISPA (G3); inóculo de bacterias *L.lactis* que expresan TSr (G4). Por vía oral se administró: la bacteria *L.lactis* que expresa TSr (G4); partes iguales de *L. lactis* que expresan el antígeno o el adyuvante c-di-AMP (G5) y por último una *L. lactis* que porta un vector vacío (G6). En ambas estrategias, un grupo de animales fue administrado con igual volumen de PBS (G0). Se utilizaron ratones BALB/c hembras (5-6/grupo). Los mismos fueron inmunizaron con 3 dosis, una cada 15 días por vía nasal (20 µl/dosis) u oral (100 µl/dosis). Quince días luego de la última inmunización, se evaluó la inmunidad humoral específica contra TSr (ELISA) y la inmunidad celular específica (test de hipersensi-

bilidad retardada -DHT- en almohadilla plantar). Los datos se expresan como mediana/rango y los mismos se analizaron mediante tests no paramétricos. En el esquema de administración nasal, todos los grupos inmunizados generaron una DHT evidente tras 48 hs en comparación con el G0 (Variación del espesor de la almohadilla, expresado como Δ mm), ejemplo: G2*=0.5/0.1; G0= 0.0/0.1/) *vs. G0=p<0.05). Una respuesta de menor intensidad, se observó en el esquema de inmunización oral. En términos de producción de IgG2a plasmática, el grupo G2 presentó un aumento muy significativo en comparación con G1 y G0 (p<0.05). En el esquema oral, los niveles de IgG2a se vieron levemente aumentados, sin alcanzar significado estadístico en comparación con el grupo G0. Estos datos sugieren que la vía nasal sería más inmuno-reactogénica que la oral. Por otra parte, en términos de inmunogenicidad, las formulaciones administradas por vía nasal parecen ser buenos candidatos vacunales contra *T. cruzi*.

Diagnóstico y Tratamiento

2 - Adherencia a los controles médicos en la Enfermedad de Chagas (ECH) en un área urbana de Buenos Aires, Argentina

López S.M.1, Hernandez Vasquez Y.M.1, Prado N.G.1, Riarte A.R.1

1 INP-ANLIS Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

La escasa adherencia a los controles médicos de las enfermedades crónicas constituyen un problema para los profesionales de la salud. La adherencia en países desarrollados oscila en el 50 % y es más baja en países en desarrollo, así el control de la HTA en Gambia alcanza el 27 %. (WHO 2003)

Este trabajo explora la adherencia a los controles médicos de la población con ECH en un área urbana no endémica. Se seleccionó una muestra aleatoria de las historias clínicas (HCs) correspondientes a pacientes en control médico por tratamiento tripanocida y por control clínico de rutina, sin tratamiento. Se diseñó un estudio retrospectivo transversal con una selección y muestro aleatorio de las HCs del Dpto.de C,PyT del INP. Se incluyeron 200 HCs considerando variables socio-demográficas, motivo de consulta, estadio clínico, tratamiento tripanocida, número de controles médicos, etc. Los datos fueron analizados en el programa SPSS.

Resultados: De las HCs seleccionadas durante el periodo 1997-2016, 55 % (110) correspondieron a los años 2008 a 2014. El 59 % llegó a la consulta derivado por profesional médico. El sexo femenino fue predominante 62 % (124). El 43.5 % nació en zonas endémicas de Argentina (NOA 21.5 %, NEA 18.5 %, Cuyo 3.5 %). Bolivia 25 %, GBA/CABA 19.5 %, Otros 12 %. El 46.5 % (93) tenían obra social o algún tipo de cobertura en salud al momento de la consulta. El 54.5 % (108) realizaba algún tipo de actividad remunerada formal (empleados, operarios, etc.) o informal. El 45.5 % restante eran amas de casa 28 %; estudiantes 11 % y desocupados 6.5 %. En referencia al estadio clínico 81.5 % (163) correspondían al estadio 0; 13 % (26) al estadio 1 y 2 % (4) al estadio 2; desconocidos 3.5 % (7). Del total de las HCs surge que 52.5 % (105) realizaron durante el periodo de referencia un único control; 20.5 % (41) dos, 8 % (16) tres y 19 % (38) entre 4 y más controles. Aquellos que consultaron por única vez, 72 % (76/105) no realizaron tratamiento tripanocida. Los tratados (95/100) realizaron siempre más de un control. La edad de los que realizaron controles de rutina fue de 43.5 ± 14.1 vs los que recibieron tratamiento 32.1 ± 11.8 [(Media \pm DS) P<0.0001]. El 64 % (62/95) presentó algún tipo de intolerancia en general de leve a moderada y seria (una internación). El tratamiento fue completo en el 60 % (57/95) y fueron excluidos 37 % (35/95). La adherencia >3-4 controles fue mayor en los tratados (26 %) vs los no tratados (9 %) [P<0.0001]. **Conclusión:** En el abordaje médico de los procesos crónicos los datos sugieren que el tratamiento etiológico ha favorecido la adherencia a los controles médicos y que en ECH la población que solicita tratamiento es generalmente más joven que aquellos que sólo realizan controles de rutina.

4 - Control integral de la Enfermedad de Chagas en el departamento de Quitilipi de la Provincia del Chaco

Ruiz Cobo L.1, Maza Y.1,3, Weinberg D.2, Beltramone A.4, Calderón E.4; Acuña A.1, Torres Perez M.1, Abril M.2, Sartor P.1,3.*

1 Ministerio de Salud del Chaco, Argentina

2 Fundación Mundo Sano – Argentina

3 Universidad Nacional del Nordeste – Argentina

4 Ministerio de Salud de la Nación

El municipio de Quitilipi se ubica en la región del Gran Chaco reconocida como un “hotspot” para la enfermedad de Chagas y otras enfermedades tropicales olvidadas. Posee 2188 viviendas rurales habitadas por 17982 personas en su mayoría criollos, aunque existen parajes con residentes de la etnia Qom.

Hasta el 2014, el equipo de salud local diagnosticaba casos de Chagas por demanda espontánea o por abordaje familiar, estrategia que permitió en dicho año estudiar 105 individuos menores de 20 años de los cuales 26 resultaron seropositivos y 19 recibieron tratamiento.

En el año 2015, se iniciaron acciones de control entomológico con piretroides en 2099 viviendas (cobertura del 95.9 %) registrándose un índice de infestación global del 12.67 %, con un rango de variabilidad entre parajes del 2.7 % al 38.7 %. Posteriormente, se realizaron reuniones comunitarias y tamizajes serológicos en escuelas, puestos sanitarios rurales y urbanos. En sumatoria, con abordajes familiares y tamizajes poblacionales se estudiaron 1015 individuos en 2015, 894 en 2016 y 842 en 2017 registrándose cada año seroprevalencias de 22,8 %, 21,7 % y 19,4 % respectivamente. La seroprevalencia según la edad varió de un 4,5 % (niños de 1 año) a un 30,3 % (niños de 13 años). A partir del año 2015, los residentes con serología positiva fueron ingresados en programas de tratamiento conducidos por equipos médicos en la zona rural y en el hospital local accediendo al tratamiento 116 menores de 20 años en 2015, 68 en 2016 y 73 en 2017, un número ampliamente superior a los pacientes tratados en 2014 (n=19). La cobertura en el tratamiento es mayor al 80 % en niños de menores de 8 años, mientras que los de 8 a 19 años presentan coberturas menores al 80 %. Posteriormente, se realizaron entrevistas a referentes comunitarios y de los equipos de salud de dos parajes rurales, y se identificó que la articulación de las instituciones con la comunidad se acompaña con mayor interés de los pobladores, y que las discontinuidad en las acciones en terreno por parte de las instituciones responsables genera una decaída en el interés comunitario y aumenta el descreimiento en futuras acciones. Estos resultados demuestran que la realización acciones de control con abordajes integrado en las dimensiones entomológicas y epidemiológicas propenden a mejorar la cobertura de los diagnósticos y tratamientos y se sientan sobre la base de articulación institucional y comunitaria eficiente y sostenida en el tiempo.

6 - Desarrollo de una técnica de diagnóstico molecular para la detección simultanea de *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*

Gonzalez L.N.1, Díaz G.1, Prochetto E.1, Roldan C.1, Martino F.3, Allassia M.4, Marcipar I.1,2, Bontempi I.1,2

1 Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina

2 Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina

3 Estudio Veterinario A.V.I.S. Suardi, Argentina

4 Práctica Hospitalaria de Grandes Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina

La tripanosomiasis africana animal (TAA) es una enfermedad que afecta fuertemente al ganado, siendo *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*) y *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), de los principales causantes en América del Sur. Recientes estudios reportaron infecciones por *T. vivax* en el ganado bovino en el norte y centro de

Argentina, generando una alerta a los entes encargados del control sanitario. La detección y diagnóstico de trypanosomas en nuestro país, se realiza mediante observación directa en el microscopio, presentando una baja sensibilidad, sin la capacidad de determinar la especie de trypanosoma infectante. De los métodos de diagnósticos empleados, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite la detección de una infección activa, detectando niveles de parásitos muy por debajo del límite de detección de las técnicas convencionales. En el siguiente trabajo se desarrolló un método de diagnóstico molecular de infecciones con trypanosoma en bovinos, con la capacidad de discernir entre *T. vivax* y *T. evansi*. Se desarrolló una técnica de PCR multiplex empleando oligonucleótidos específicos para cada protozoo y empleando las cepas Y486 y Vaimaca de *T. vivax* y *T. evansi*, respectivamente, como controles positivos. La técnica permitió la amplificación específica de una banda de 177 pb para *T. vivax* y de 237 pb para *T. evansi*. Dicha técnica fue evaluada con 50 muestras de sangre de bovinos provenientes de 7 establecimientos de producción lechera del centro de la provincia de Santa Fe, donde se habían reportados casos de trypanosomiasis mediante la técnica de Woo. A las muestras se les purificó el ADN y se realizaron controles de amplificación de ADN bovino y de Trypanosomas. De las 50 muestras evaluadas, 18 resultaron positivas para *T. vivax* (36%), mientras que no se detectaron casos para *T. evansi*. La TAA avanza cada año más sobre el territorio argentino y son necesario tener disponibles diagnósticos certeros. En el presente trabajo hemos desarrollado una técnica que permite la detección simultánea de dos de los Trypanosomas pertenecientes a la TAA que infectan en nuestro país. Es de destacar que dos de los individuos infectados no presentaban signos de enfermedad en el momento de la toma de la muestra, lo que permitió un anticipado tratamiento.

8 - Ensayo de susceptibilidad a Metronidazol en aislamientos de *T. foetus* por citometría de flujo

Rivero M.B.1,2, Luque M.E.1,2,3, Abdala M.E.1,2,3, Di Iullo D.1, Luna B.E.1, Carranza P.G.1,2,3, Rivero F.D.1,2,3

1 IMSaTeD, Instituto Multidisciplinario de Salud, Tecnología y Desarrollo (UNSE-CONICET)

2 FCM – UNSE

3 FAyA – UNSE

La Tricomonosis Bovina, enfermedad parasitaria del tracto urogenital bovino, es causada por el protozoo flagelado *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*). Se disemina por transmisión sexual y representa un problema sanitario cuando se utiliza el servicio natural como método reproductivo. La patología ocasiona grandes pérdidas económicas debido a la disminución de la tasa de preñez por infertilidad transitoria o la presencia de abortos. La terapia con fármacos no siempre es aconsejable debido al reporte de fallas en el tratamiento y a la aparición de resistencias (aeróbicas *in vivo* y anaeróbicas *in vitro*), por lo que se opta por la faena del animal infectado. La droga más utilizada es el Metronidazol (Mz) y sus derivados. La susceptibilidad a Mz en este protozoo ha sido investigada mediante metodologías que se basan en la observación de la movilidad del parásito a través del microscopio óptico luego ser sometidos al efecto de la droga; siendo técnicas laboriosas, lentas y subjetivas. Hasta la fecha no se han reportado valores de IC₅₀ (mitad -50 %- de la concentración inhibidora mínima) a las 48 hs para Mz en *T. foetus*. La citometría de flujo es un método eficiente, rápido y sensible que permite la automatización de la técnica y aumenta la objetividad. El objetivo del trabajo fue obtener valores de IC₅₀ de Mz a las 48 hs *in vitro* bajo dos condiciones diferentes (anaerobiosis (ANC) y aerobiosis (AC)). Para ello se incubaron 6 aislamientos de *T. foetus* con concentraciones seriadas de Mz durante 48hs en aerobiosis y en bolsas para anaerobiosis por triplicado. Finalizado ese período se marcaron con FDA (di acetato de fluoresceína), para observar los parásitos vivos, y luego fueron contados utilizando un citómetro de flujo. Los resultados obtenidos fueron de 1,06 a 1,25 μ M en ANC y de 1,44 a 3,03 μ M en AC y representan los únicos valores de IC₅₀ reportados en este protozoo a las 48 hs. además, la citometría de flujo demostró ser una técnica eficaz, rápida y útil para realizar ensayos cuantitativos de susceptibilidad en estos protozoarios. Esta información resulta importante para la planificación de tratamientos, teniendo en cuenta la variabilidad biológica de los aislamientos de este parásito, y constituye una herramienta fundamental para el control de la enfermedad.

10 - Fine mapping of *Trypanosoma cruzi* epitopes using high-density peptide chips: alanine and length scans

Bracco L.1, Buscaglia C.A.1, Altchek J.2, Agüero F.1

1 Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBIO) – UNSAM – CONICET, San Martín, Buenos Aires, B1650HMP, Argentina

2 Servicio de Parasitología y Chagas, Hospital de Niños “Ricardo Gutierrez”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1425EFD, Argentina

Chagas Disease is a major health problem in America for which no vaccine for large-scale public health interventions are yet available. Accurate diagnosis is essential for the early identification, follow up and prevent non-vector transmission. Diagnosis is routinely performed using serological methods, which require well characterized antigens. Although available tests give satisfactory results, the production of reliable reagents remains laborious and expensive. We have conducted a large-scale screening of *T. cruzi* linear B-cell epitopes using high-density peptide chips, leading to the identification of 200 novel antigens. Based on these results we have developed a multiepitope diagnostic test that have excellent diagnostic performance (Mucci J, et al 2017). For each epitope, understanding which residues are important for antibody binding can lead to improved diagnostic reagents. For example, this may help identify if these key residues are conserved in other *T. cruzi* sequenced strains and isolates. To obtain improve the serological characterization of known antigens, we performed a number of epitope-mapping experiments using high-density peptide arrays. First, we performed Alanine scans for 276 different protein antigens (506 antibody-binding peaks/epitopes) that had been reactive in at least one of several peptide chip assays. This experiment is based on permuting an alanine in each position of the sequence to be studied, hence assessing the impact of replacing each original amino acid on the reactivity of each peptide sequence. Secondly, we performed a length scan on selected peptides, to analyze how the length of an epitope-containing peptide may affect the antibody-binding in these assays. For this, we have performed complete length scans of the C-terminal portion of 58 proteins belonging to the trans-sialidase super family of *T. cruzi* antigens. This length scan was performed by scanning these sequences with peptides of lengths 7 to 18. This work led to the identification of precise residue positions in epitopes that play a fundamental role in the seroreactivity of the corresponding antigens.

12 - Identificación de polifenoles con actividad trypanocida mediante el uso de herramientas computacionales

Valera-Vera E.A.1, Sayé M.1, Reigada C.1, Miranda M.R.1, Pereira C.A.1

1 Laboratorio de Parasitología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas IDIM UBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

La arginina quinasa (AK) es una proteína altamente conservada en vertebrados que también se encuentra en tripanosomatidos. Cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato entre el ATP y la arginina para mantener el balance energético celular, y en *Trypanosoma cruzi* figura como una enzima importante en la respuesta a estrés. Al ser *T. cruzi* el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, y la AK una enzima involucrada en la respuesta al estrés experimenta durante el establecimiento de la infección que además no tiene homólogos en humanos, se presenta como un blanco quimioterapéutico interesante. Distintos extractos de plantas han mostrado inhibir la actividad enzimática de la AK en una gran variedad de organismos, incluidos los tripanosomatidos; y más precisamente algunos polifenoles han sido exitosamente identificados como inhibidores de la enzima.

En este trabajo usamos modelos computacionales que describen la interacción molecular de distintos poli-

fenoles con el sitio activo de la AK de *T. cruzi* (*TcAK*), partiendo de una base de datos de 326 polifenoles encontrados en plantas y usando el programa AutoDock 4.5 para el modelado. Aquellos compuestos que tuvieron un modelo de interacción fuerte con el sitio activo de la *TcAK* se toman como los más promisorios a inhibir la enzima, por lo que se procedió a buscar cuáles estaban disponibles en el mercado para probar si eran capaces de inhibir la enzima y matar al parásito en distintos estadios del ciclo de vida. Finalmente se probó citotoxicidad en células Vero mediante tinción con cristal violeta para determinar índices de selectividad.

De los 5 polifenoles probados, la capsaicina y la delfinidina mostraron la mayor actividad tripanocida en el estadio celular relevante para la infección en humanos, teniendo IC₅₀ en escalas nanomolares y con altos índices de selectividad, pero solamente la delfinidina mostró ser un fuerte inhibidor de la actividad AK, con un IC₅₀ de 7 μ M. Futuros estudios metabólicos del parásito en presencia de polifenoles así como modelos computacionales serán realizados para determinar si en efecto la AK es el blanco molecular de los polifenoles en su actividad tripanocida; de cualquier manera, la alta actividad anti parasitaria y selectividad de los compuestos resultantes muestran el potencial de estos polifenoles como moléculas iniciales para el desarrollo de fármacos anti chagásicos.

14 - A 3D Printer based DNA extraction method for molecular diagnosis of Chagas disease

Wehrendt D.P.1, Liu B.2, Mehta A.2, Almeida I.C.3, Quarnstrom Y.4, Gascon J.5, Alonso-Padilla J.5, Schijman A.G.1, Wong S.2

1 INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 AI Biosciences, College Station, Texas, USA

3 University of Texas at El Paso, USA

4 Division of Parasitic Diseases and Malaria, Center for Global Health, CDC, USA

5 ISGlobal, Spain

Chagas disease affects around 7 Million people worldwide and it is estimated that only 1 % of infected people is treated, mainly due to a lack of proper diagnosis. A reason for this is the requirement of equipment and qualified personnel often unavailable in many disease endemic areas. It is therefore important to develop simpler diagnostic techniques that can be performed in minimally equipped laboratories. The recently developed loop-isothermal amplification (LAMP) kit for *Trypanosoma cruzi* (etiologiological agent of Chagas disease) detection is very promising, because it is very sensitive, easy to use (all reagents are dried in the cap of the tubes), no thermocycler is required for the reaction and the positive result can be visualized by the naked eye. However, for optimal LAMP results, DNA of high quality must be purified. Currently available kits for DNA purification are time consuming and require high cost equipment that is generally unavailable in laboratories at endemic regions. Therefore, our goal was to set up an automated extraction method with an adapted low cost 3D Printer “PrintrLab” to obtain DNA from whole EDTA/blood samples for further *T. cruzi* detection through LAMP reaction.

Using the reagents of the Nuclisens kit (Biomerieux, France), which is based on magnetic beads, optimal conditions for PrintrLab extraction, such as time of washing steps, release of magnetic beads in the washing and elution buffers and elution temperature, were established. To test the quality of eluted DNA we compared the PrintrLab extraction with a standardized manual extraction method (“High Pure PCR template preparation kit”, Roche) followed by LAMP (index test, Besuschio et al, 2017) and a validated qPCR technique for *T. cruzi* detection (comparator test, Duffy et al 2013), using EDTA/blood samples spiked with 1000 – 0.1 parasite equivalents/mL of cultured *T. cruzi* *Y stock* (*Tc II*) epimastigotes.

Analytical sensitivities of both LAMP and qPCR tests were 0.1 par.eq /mL for both PrintrLab and standardized manual extraction methods.

We conclude that the automated PrintrLab extraction method can be used to obtain high quality DNA for further *T. cruzi* detection through qPCR and LAMP. In the latter case, the PrintrLab device could be coupled to a thermoblock at 65°C for simultaneous DNA extraction and LAMP amplification, which could

16 - Nanotecnología aplicada al mejoramiento del perfil de disolución de benznidazol

Bedogni G.R.1, Okulik N.B.1,2, Salomón C.J.3, Seremeta K.P.1,2

1 Universidad Nacional del Chaco Austral, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina

3 IQUIR Instituto de Química Rosario - CONICET, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina

El mal de Chagas es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* que afecta a 6-7 millones de personas en el mundo, siendo endémica en nuestro país. Es considerada una enfermedad tropical “desatendida” ya que han pasado más de 100 años de su identificación y aún hoy disponemos solo de dos fármacos para su tratamiento, nifurtimox y benznidazol. Si bien benznidazol es el fármaco de elección, presenta algunas desventajas biofarmacéuticas como baja solubilidad acuosa (0,4 mg/ml) lo que resulta en un paso limitante para su absorción y biodisponibilidad oral. El objetivo de este trabajo es mejorar el perfil de disolución de benznidazol mediante su encapsulación en nanopartículas poliméricas logrando aumentar así su absorción y biodisponibilidad luego de la administración oral. El método utilizado para la obtención de las nanopartículas fue el método de desplazamiento del solvente o nanoprecipitación. Los polímeros empleados en la preparación de las mismas fueron Eudragit[®] RS y Eudragit[®] RL (proporción droga:polímero, 1:5). El surfactante no iónico Kolliphor[®] P188 fue utilizado para la estabilización de las nanopartículas en suspensión. Las nanopartículas obtenidas fueron recuperadas en forma de polvo mediante liofilización. Los lotes fueron realizados por triplicado y caracterizados mediante diferentes métodos. El rendimiento (%R) se determinó por diferencia de peso entre los polímeros y el fármaco utilizados para la preparación de las nanopartículas y las nanopartículas obtenidas luego del proceso. La capacidad de carga (%p/p) y la eficiencia de encapsulación (%EE) de las nanopartículas se analizó mediante espectrofotometría UV-visible a longitud de onda fija (324 nm). La eficiencia de disolución (ED) del fármaco se ensayó mediante el método de la membrana de diálisis utilizando ácido clorhídrico 0,1 N como medio de disolución a 37 ± 1 °C y 200 r.p.m. Los resultados evidenciaron valores de %R elevados (>76%), en ambos casos. La %EE fue cercana al 100% (95-97%) y la %p/p varió entre 9,70-9,92%. La ED de benznidazol encapsulado fue mayor a la de benznidazol libre (p <0,05). Estos resultados indican que la encapsulación del fármaco en nanopartículas poliméricas es un buen método para mejorar su perfil de disolución debido a una reducción del tamaño a escala nanométrica y un aumento del área superficial. Esto podría utilizarse como estrategia para optimizar la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas.

18 - Urticaria crónica y asma en un paciente con Toxocariosis

Medina M.G.1, López M. de los A.1, Bojanich M.V.2

1 IMR-UNNE Instituto de Medicina Regional-Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina

2 FACENA-UNNE Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

La urticaria son lesiones cutáneas edematosas y pruriginosas. El diagnóstico se establece cuando se excluyen todas las posibles causas de urticaria. El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, con obstrucción del flujo aéreo e hiperreactividad bronquial. Varios autores estudiaron el potencial efecto que podría tener *T. canis* sobre el asma, debido a su paso por pulmón durante el ciclo de infección. La

toxocariasis es una infección parasitaria inducida por un nematodo que afecta a perros y gatos. La infestación humana es causada por la ingestión accidental de huevos embrionados de *Toxocara*; las larvas no se desarrollan en gusanos adultos, pero pueden migrar a varios órganos, dando lugar a una serie de expresiones clínicas. Reporte del caso clínico

Paciente de sexo femenino, estudiante de diecisiete años de edad, procedente de La Verde, Chaco, con antecedentes patológicos de asma desde los 7 años de edad. Consulta por presentar lesiones cutáneas edematosas, de contornos delimitados y con un halo eritematoso, generalmente evanescentes y recurrentes, acompañadas por prurito. Es tratada por diferentes médicos con antihistamínicos y glucocorticoides en cada episodio. Se realiza epicrisis, refiere vivienda de material, calle de tierra y presencia de animales domésticos: 2 perros, que los tiene desde cachorros, sin referir tratamientos antiparasitarios. En el examen semiológico se observan las lesiones antes referidas. Se solicitan estudios complementarios y se comienza un tratamiento para urticaria con antihistamínicos. A los 7 días, concurre a control, observándose poca mejoría y con alteraciones en los resultados de su laboratorio: hemograma: leucocitos en rango normal (9800 células/ μ L), Moderada eosinofilia 13 %, Ig E 650 UI/ml. Coproparasitológico seriado: negativo. La sospecha de Toxocariosis se basó en: 1) antecedentes de asma, 2) un cuadro clínico inespecífico sin foco infeccioso, 3) la presencia de factores de riesgo para toxocariosis como la exposición a perros y a suelos probablemente contaminados. El diagnóstico se realizó por serología mediante el método de enzimoimmunoanálisis (ELISA). El cuadro clínico cutáneo y respiratorio remitió por completo luego de implementar el tratamiento con albendazol 15mg/kg/ día durante cinco días seguidos, no se registró ningún efecto adverso asociado con el tratamiento. Se repite el mismo tratamiento al mes. Se controla a la paciente a los 2 y 6 meses, sin presentar manifestaciones respiratorias ni cutáneas y laboratorios dentro de parámetros normales. Conclusión: La toxocariosis puede tener formas diversas de presentación clínica, se ha demostrado que puede ser un factor exacerbante del asma y ser causa de lesiones cutáneas. Investigar la presencia de esta parasitosis puede contribuir o esclarecer el diagnóstico.

20 - Efectos de nanoformulaciones de benznidazol sobre *Trypanosoma cruzi* y sobre la progresión de la patología cardíaca en la infección crónica murina

Rial M.S.1, Arrúa E.C.2,3, Esteva M.I.1, Prado N.G.1, Natale M.A.1,4, Laucella S.A.1,4, Búa J.1,4, Silber A.5, Salomón C.J.2,3,4, Fichera L.E.1,4.

1 Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben”, ANLIS/Malbrán, Ministerio de Salud, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 Instituto de Química de Rosario, CONICET, Rosario, Argentina

3 Área Técnica Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

4 CONICET, Buenos Aires, Argentina

5 Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de San Pablo, Brasil

En resultados preliminares mostramos el efecto de nanopartículas de benznidazol (BNZ-nps) en la infección crónica murina por *Trypanosoma cruzi* Nicaragua. Evaluamos dos esquemas de tratamientos: administración continua (c), 30 dosis diarias de 25 o 50 mg/kg/día e intermitente (it), 1 dosis cada 7 días por 13 veces de 50 o 75 mg/kg/día en ratones C57BL/6J. Con los tratamientos no se detectaron parásitos en sangre por qPCR, hubo una reducción significativa de los títulos de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, y cuando se compararon los esquemas de administración de la droga intermitente o continua, los resultados mostraron que ambos tratamientos fueron eficaces, si bien las dosis totales de BNZ-nps por ratón fueron 650 y 1500 mg/kg respectivamente. En este trabajo mostramos el efecto de las BNZ-nps sobre alteraciones de la conducción cardíaca mediante electrocardiogramas (ECG) y sobre la progresión de la miocarditis y la fibrosis, a través de histopatología con tinciones de Hematoxilina & Eosina y Tricrómico de Masson. Estudiamos también la respuesta celular T específica para *T. cruzi* mediante ensayos de ELISPOT para IFN- γ en esplenocitos aislados de los bazo de los distintos grupos de ratones. Por otro lado evaluamos en epimastigotes la apoptosis y la despolarización de membrana mitocondrial inducida por las drogas *in vitro*, mediante la tinción con Anexina-PI y Rhodamina 123 y analizados por citometría de flujo. Los resultados

de los ECGs mostraron normalización de la disminución de la frecuencia cardíaca, del intervalo PR, que la inflamación disminuyó en un 73 % con BNZ-nps c50 y en un 57 % con BNZ-nps it75, y que la progresión de la fibrosis se inhibió en un 68 % con BNZ-nps c y en un 85 % con BNZ-nps it. Se observó que la respuesta celular específica para *T. cruzi* disminuye significativamente luego de la administración it, tanto de BNZ como de BNZ-nps, si bien los tratamientos continuos también mostraron disminución ésta fue menor que con los tratamientos it. En ambos casos no se encontraron diferencias entre BNZ y BNZ-nps, pero la dosis total de BNZ administrada es menor con las nanopartículas. El índice de apoptosis y la despolarización de la membrana mitocondrial fueron mayores en los cultivos de epimastigotes tratados con BNZ-nps. En conclusión, el tratamiento con BNZ-nps podría ser eficaz para tratar con éxito la enfermedad de Chagas y la administración intermitente de la droga podría evitar efectos colaterales no deseados sin perder la eficacia.

22 - Diagnóstico molecular de estrogiloidosis en pacientes con eosinofilia

Quarroz Braghini J.1, Batalla E.I.1, Risso M.G.1, Ruybal P.1, González Cappa S.M.1, Sierra M.2, Fridman V.2, Stecher D.2, Alba Soto C.D.1, Repetto S.A.1,2

1 Instituto de Microbiología y Parasitología Médica-UBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina
2 Hospital de Clínicas José de San Martín. UBA, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Strongyloides stercoralis es un nematode intestinal. En Argentina las áreas endémicas corresponden al NEA y NOA. En Buenos Aires, a pesar de no ser una región endémica, consultan pacientes migrantes de estas áreas. La forma clínica más frecuente es la eosinofilia asintomática pero en los inmunocomprometidos produce formas severas. Las técnicas diagnósticas convencionales presentan baja sensibilidad y así se subestima la prevalencia de la infección. Para solucionarlo, hemos estandarizado una PCR en materia fecal que permitiría el diagnóstico precoz. El objetivo fue evaluar la PCR como herramienta diagnóstica en pacientes con eosinofilia en un hospital de CABA.

Se realizó un estudio transversal, analítico. Se incluyeron pacientes >18 años que concurren a la división de Infectología del HJSM durante 03/2013 – 08/2018 con eosinofilia >450 cél/mm³. Se recabaron datos clínico-epidemiológicos, hemograma completo y serología para HIV. Se realizó parasitológico fresco y seriado, PCR y cultivo de agar nutritivo (CAN).

Se estudiaron 106 pacientes, 85,8 % refieren haber visitado área endémica. Argentina (48,6 %), Paraguay (20 %), Bolivia y Perú (11,4 %) respectivamente fueron los países de origen más frecuentes. La media de edad fue 56 años (DE: 13; rango 18-86), 54,3 % fueron mujeres, 11,4 % pacientes presentaron infección por VIH. Las enfermedades autoinmunes y la enfermedad oncohematológica fueron las comorbilidades más frecuentes.

Se diagnosticó *S. stercoralis* en 35 pacientes (35,7 %), 17 fueron positivos por CAN, 8 por fresco y 5 por Ritchie. Todos tuvieron PCR positiva y 48,6 % fueron positivos solo por PCR (S 100 % IC 97,2-100; E 78,8 % IC 69,2 - 88,3; VPP+ 51,43 % IC 33,4 - 69,4; VPP- 100 % IC 99,2-100).

No hubo diferencias significativas entre los valores de eosinófilos de los no infectados (1026 eo/mm³ rango intercuartil (RI) 1942) e infectados (1254 eo/mm³ RI 990 ; p>0,05). No se encontró asociación entre el recuento de eosinófilos y la presencia de larvas en materia fecal (p>0,05). Doce pacientes presentaron sintomatología a los que se poseían PCR positiva 41,6 %, en comparación de 12/23 (52,2 %) asintomáticos.

CONCLUSIONES: La PCR incrementó en un 45,7 % el diagnóstico de estrogiloidosis en pacientes con eosinofilia. En estos pacientes, la prevalencia de *S. stercoralis* fue del 36 %, siendo comparable con la de las poblaciones hiperendémicas. Proponemos a la PCR como herramienta en el estudio de *S. stercoralis* en pacientes con eosinofilia fuera de área endémica.

24 - Evaluación biológica de nuevos compuestos anti-*T. cruzi* basados en paladio y platino

Mosquillo F.1, Bilbao L.1, Hernández F.1, Smircich P.1, Gambino D.2, Garat B.1, Pérez L.1

1 Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, UdelaR

2 Cátedra de Química Inorgánica, Facultad de Química, UdelaR

La enfermedad de Chagas es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, y constituye un importante problema de salud pública principalmente en América Latina, perteneciendo al grupo de las enfermedades desatendidas. En busca de potenciales agentes antichagásicos, se sintetizaron y caracterizaron nuevos compuestos basados en paladio y platino, derivados de piridina-2-tiolato-1-óxido, Pd-dppf-mpo y Pt-dppf-mpo, respectivamente. En este trabajo se evaluó la actividad de estos compuestos, los cuales muestran valores de IC₅₀ en el rango nano y micromolar sobre epimastigotas de *T. cruzi* con excelentes valores de índice de selectividad. Durante la evaluación del efecto biológico de estos compuestos se determinó, entre otros, que ejercen su efecto de forma tripanocida cuando se realiza el tratamiento de parásitos con una concentración equivalente a 10 veces el IC₅₀, que la morfología de los parásitos tratados se modifica al redondearse el cuerpo celular, que el tipo de muerte celular inducido es apoptosis tardía/necrosis, y que una vez incorporados, los compuestos presentan una asociación preferente por el ADN de los parásitos. Para extender estos resultados a las formas tripomastigota y amastigota, se realizaron ensayos de infección y persistencia, observándose una disminución del porcentaje de infección y del contenido de amastigotas por célula infectada luego del tratamiento. Para ampliar este análisis biológico, se analizaron los cambios globales en el transcriptoma y en el proteoma de parásitos incubados con dichos complejos para determinar sus posibles blancos de acción e identificar posibles vías afectadas para entender el modo de acción de los mismos. Dado que los compuestos comparten el mismo ligando, el estudio comparativo de los transcriptomas permite identificar genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta general al ligando, así como genes que codifican para proteínas que se modifican en respuesta específica al metal. La combinación de estos datos permitió determinar que un posible blanco de acción podría ser el proteasoma en el caso del compuesto Pd-dppf-mpo, y la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH, no presente en el hospedero mamífero, para el compuesto Pt-dppf-mpo. Actualmente se trabaja en la validación mediante genómica funcional de estos resultados, con el fin de avanzar en el entendimiento del mecanismo de acción de estos prometedores compuestos.

26 - Mecanismos de acción de derivados sintéticos del alcaloide indólico tetrahydro- β -carbolina con actividad tripanocida

Casasco A.1, Muscia G.C.1, Lopez-Arencia A.2, Lorenzo-Morales J.2, Petray P.B.1, Piñero J.2*, Frank F.M.1*

1 IMPaM, Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 IUETSPC, Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna, Tenerife, España

La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis son un importante problema de salud pública en nuestro país, principalmente en el norte, donde las áreas endémicas se solapan. La eficacia de los tratamientos es variable, dependiendo de la especie infectante y la etapa de infección, además de presentar efectos adversos y aumentar la resistencia parasitaria. Previamente, hemos demostrado la actividad de derivados de tetrahydro- β -carbolinas (β C), alcaloides de tipo indólico con un núcleo tricíclico común, frente a distintos estadios parasitarios de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.* El objetivo de este trabajo fue estudiar los posibles mecanismos de acción de estos compuestos, luego de la incubación de epimastigotes y promastigotes (1×10^6 /ml) con la concentración inhibitoria 90 (CI₉₀) de los mismos. Se emplearon diferentes metodologías para la búsqueda de los mecanismos de acción producidos por las β C: por tinción con naranja de acridina

y microscopia de fluorescencia se detectaron cambios morfológicos y fisiológicos en los parásitos, tales como aparición de vesículas acídicas en el citoplasma y daño nuclear; mediante ensayos con Anexina-V/ioduro de propidio se observó un aumento del porcentaje de parásitos que exponían fosfatidilserina en su membrana luego del tratamiento con algunas de las β C ensayadas; por tinción con H \ddot{o} chst 33342/ioduro de propidio se verificó que todas las β C produjeron condensación de la cromatina parasitaria; mediante la técnica del colorante fluorescente SITOX $\text{\textcircled{R}}$ Green se determinó que los compuestos no desestabilizaban la membrana celular en las condiciones ensayadas. Debido a la importancia del único mitocondrión presente en tripanosomatidos, se investigó si esta organela es un posible blanco de las β C empleando el indicador selectivo para mitocondrias JC-1. Se observó que la mayoría de los compuestos ensayados fueron capaces de disminuir el potencial de membrana mitocondrial. En un ensayo de viabilidad parasitaria con el reactivo CellTiter-Glo $\text{\textcircled{R}}$ Luminiscent, verificamos una alteración en el contenido de ATP intracelular. Mediante la sonda fluorescente CellRox $\text{\textcircled{R}}$ y estudio de microscopia confocal se detectó la acumulación de especies reactivas del O $_2$ en el citoplasma de los parásitos. Los resultados obtenidos demuestran que las β C ensayadas inducen alteraciones en múltiples dianas parasitarias, incluyendo translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática, disfunción mitocondrial y daño oxidativo, que conducirían a la muerte celular programada de los parásitos probablemente por mecanismos de tipo apoptótico y autofagia.

28 - Valoración de los datos clínicos en el diagnóstico de parásitos intestinales por métodos coproparasitológicos

Gené C.M.1,2, Rea M.J.F.1,2, Fleitas L.I.2, Borda C.E.1

1 CENPETROP Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina

2 Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina

Las enteroparasitosis constituyen un serio problema de salud pública por su alta prevalencia. Los profesionales de la salud suelen subestimarlas a pesar de la significativa morbilidad a ellas asociada.

Los signos y síntomas enunciados en el pedido de análisis de heces por parte de los médicos orientan en la elección de la metodología a aplicar.

Objetivo del trabajo: evaluar si los datos clínicos expresados en la solicitud de exámenes coproparasitológicos ejercen influencia positiva en el diagnóstico de parásitos intestinales en el CENPETROP.

Pacientes de los últimos cinco años fueron derivados de servicios de Clínica Médica, Hematología, Gastroenterología, Pediatría, Geriatria, Dermatología, Infectología, Reumatología y Medicina Familiar de centros de salud públicos y privados de la provincia. Las derivaciones fueron por: eosinofilia 39,0 %, anemia 17,1 %, dolor abdominal 16,1 %, diarrea 11,8 %, prurito anal y bruxismo 8,6 %, prurito generalizado y urticaria 5,9 %, inmunosupresión 1,5 %.

Se analizaron 856 heces con los métodos de Hoffmann, Pons & Janer, Baermann, Harada-Mori, Graham. Abarcaban todas las edades y sexos dos grupos: niños de 10 meses a 15 años de edad (4,8 %) y adultos de 16 a 90 años (95,2 %).

Se hallaron parásitos en 355 (41,5 %) pacientes. El 41,8 % del grupo de 16 a 90 años estaba parasitado y el 34,1 % en el de los niños.

El 72,7 % presentó protozoarios parásitos y el 47,9 % helmintos.

El protozoo y helminto predominantes fueron: *Blastocystis* sp 67,3 % y *Strongyloides stercoralis* 22,8 %, seguidos por *Enterobius vermicularis* 10,4 %; uncinarias 5,6 %; *Giardia lamblia* 5,1 %; *Taenia saginata* 3,7 %; *Ascaris lumbricoides* 2,0 %; *Trichostrongylus* sp 1,4 %; *Hymenolepis nana* 1,1 %. *Trichuris trichiura*, *Cystoisospora belli* y *Hæmonchus* sp 0,3 %.

Entre los comensales: *Entamoeba coli* 20,8 %, *Endolimax nana* 10,1 % y *Chilomastix mesnili* 0,6 %.

En 19,4 % hubo biparasitismo y en 2 % poliparasitismo.

El 94 % de pacientes con *Blastocystis* sp fueron derivados por diarrea, dolor abdominal, prurito generalizado y urticaria. Por eosinofilia, el 88 % y 86 % con *S. stercoralis* y *A. lumbricoides* respectivamente.

Con *E.vermicularis*, 49 % por eosinofilia y 51 % prurito anal y bruxismo. Con uncinarias, 50 % por eosinofilia y 50 % por anemia. El 72 % con *G. lamblia* por diarrea.

A partir de estos resultados se puede concluir que los motivos de las derivaciones son imprescindibles y ejercen gran influencia en el diagnóstico parasitológico, pudiendo mejorar la especificidad en la detección de las enteroparasitosis.

Sábado 3 de Noviembre

Conferencias

Extracellular vesicles: a new language in cellular communication during parasite host cell interaction

Ramírez M..

Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Dpto Bioquímica-UFPR, Rio de Janeiro, Brasil

El primer contacto de las formas tripomastigotes metacíclicas con hospedadores mamíferos es vital para el parásito sobrevivir e infectar células eucarióticas. El sistema del complemento es el principal mecanismo de defensa del sistema inmune innato y ya se ha demostrado que el parásito dispone de varias estrategias para burlarlo, como presentación de receptores de complemento en su superficie, liberación de sustancias inhibitoras de enzimas activadoras de complemento, invasión rápida a las células eucarióticas, entre otros. Recientemente hemos mostrado que las formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* de varias cepas cuando penetran en los hospedadores mamíferos y en contacto con células sanguíneas, inducen a liberación de vesículas extracelulares (VEs) que pueden ser exosomas (50-100 nm) procedentes de cuerpos multivesiculares o Microvesículas (MVs) derivadas de membrana plasmática de las células huésped, (100-1000 nm). Hemos mostrado experimentalmente que VEs disminuyen la lisis mediada por el complemento por un mecanismo de alteración del tiempo de decaimiento de la C3 convertase y también aumentan la invasión a las células eucarióticas. La otra forma infectiva, tripomastigotes derivados del cultivo de tejido, también son capaces de inducir la liberación de Ves, inhibir complemento y aumentar la invasión a células eucarióticas, sin embargo de manera peculiar tienen una gran capacidad de fusionarse con las vesículas del hospedador, mostrando que durante el curso de la infección las microvesículas podrían tener algún rol en la progresión de la infección, en la persistencia parasitaria o en la evasión al sistema inmune innato. En la inmunización de animales con EVs *T. cruzi* mostró un cambio en la curva de parasitemia de los animales infectados. En la mayoría de los casos, se observó que los efectos de inhibición de lisis por el complemento y el aumento de la invasión son cepa-dependientes y específicos para cada cepa, sugiriendo que los mecanismos de interacción de vesículas podrían estar más asociados a un cambio en la dinámica de membrana parasitaria más que la alteración de las células do hospedador. El efecto en la comunicación celular a través de las vesículas extracelulares podría ser esencial para evadir complemento, infectar células y modular células dendríticas y macrófagos, pasos fundamentales para progresar en el complejo escenario de la progresión de la infección y desarrollo de cronicidad en la enfermedad de Chagas.

Mesas Redondas

Bioquímica y Biología Molecular

- **Transmigración de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* a través de cultivos tridimensionales**

Tekiel V.1, Rizzi M.1, Caeiro L.1, Masip Y.1, Sánchez D.O.1, Rodríguez M.E.1

T. cruzi presenta una amplia diversidad que se ve reflejada en la actual clasificación filogenética de las cepas en unidades discretas de tipificación (DTU TcI-TcVI). Sin embargo, esta clasificación no refleja el comportamiento biológico de las cepas, incluyendo –por ejemplo– el tropismo tisular. El desarrollo de la infección crónica focalizada, dependerá en gran medida de capacidad de los tripomastigotes para alcanzar y diseminarse en distintos órganos y tejidos durante la infección aguda.

Los cultivos tridimensionales (3D) imitan adecuadamente la microarquitectura tisular y ofrecen *in vitro* un ambiente similar al encontrado por los patógenos en el huésped mamífero. En este trabajo empleamos esferoides 3D de células expresando RFP para analizar la interacción, infección y patrón de migración intratisular de tripomastigotes de cepas de *T. cruzi* con diferentes características biológicas, que no siempre se ven reflejadas en cultivos convencionales. Las cepas CL Brener y SylvioX10 presentan niveles similares de infección en células crecidas en monocapa (70%), aunque *in vivo* tienen distinta virulencia. En cultivos 3D, ambas presentan infección disminuida y distintiva (SylvioX10 <10%; CL Brener 40%). La capacidad de transmigración también es diferencial: CL Brener migra al menos 50 µm en profundidad, mientras que la mayor parte de los tripomastigotes de SylvioX10 permanecen en la capa externa de los esferoides y sólo una proporción menor se puede observar hasta 30 µm. La transmigración es un movimiento rápido ya que patrones similares se observan desde 1 hora p.i. Más aún, los tripomastigotes de SylvioX10 se agrupan en parches en la superficie del esferoide, mientras que los de CL Brener están uniformemente distribuidos. La transmigración es una característica intrínseca de cada cepa, ya que no es posible complementar el fenotipo migratorio con productos de secreción ni por co-incubación de cepas no-migrantes con cepas migrantes. Estudios realizados con espectro más amplio de cepas y aislamientos muestran que las más virulentas tienen mayor capacidad transmigratoria; ésto no se correlaciona con la DTU ni con la capacidad de nado de los tripomastigotes. En general, observamos que en un microambiente 3D cada cepa presenta una distribución y un patrón transmigratorio característico, que se podría asociar con su comportamiento *in vivo*, posicionando a los cultivos 3D de esferoides como una herramienta valiosa para el estudio de la interacción parásito-huésped.

■ **Control epigenético del proceso de transcripción en el parásito *Trichomonas vaginalis***

de Miguel N., Lizarraga A.

Instituto Tecnológico Chascomus (INTECH), Chascomus, Provincia de Buenos Aires, Argentina

La tricomoniasis, provocada por el parásito protozoario unicelular *Trichomonas vaginalis*, es la enfermedad de transmisión sexual no viral más frecuente en el mundo entero. Existen diferentes cepas aisladas de pacientes que poseen fenotipos variables en cuanto a su capacidad de adherencia, agregación y citotoxicidad. Estas diferencias fenotípicas sugieren que, aún cuando las cepas poseen secuencias de ADN prácticamente idénticas, la expresión de genes claves para estos procesos se encuentra regulada diferencialmente. Considerando que la epigenética comprende cambios en la estructura y organización del ADN que, sin alterar la secuencia de nucleótidos, modulan la expresión génica y el fenotipo celular; nosotros proponemos que mecanismos epigenéticos podrían ser los responsables de los diferentes fenotipos observados entre las cepas de *T. vaginalis*. En este sentido, un trabajo reciente publicado por nuestro grupo demostró que la acetilación de histonas tiene un rol clave en la regulación de la expresión de genes involucrados en el proceso de patogénesis de *T. vaginalis*.

Otra de las modificaciones epigenéticas más importantes y mejor estudiadas en organismos eucariotas multicelulares es la metilación del ADN. Dada la relevancia de 5-metilcitosina (5mC) y 6-metiladenina (6mA) en otros organismos, evaluamos la presencia de estas marcas en el ADN de *T. vaginalis* observando que el ADN de este parásito posee altas cantidades de 6mA y poco 5mC en su genoma.

Teniendo en cuenta que 6mA parecería ser la marca prevalente en el ADN genómico de *T. vaginalis*, nos propusimos determinar la localización de 6mA en el genoma de una cepa adherente utilizando un anticuerpo específico para 6mA seguido de secuenciado masivo (MedIP-seq). El análisis de la distribución de la marca en el genoma reveló una preferencia de 6mA por las regiones intergénicas, en especial por regiones repetitivas. En el caso de metilación dentro de genes, la marca muestra una preferencia por el sitio de fin de la transcripción (TTS). Finalmente, se comparó la presencia de 6mA con datos de RNA-seq en la misma cepa observando que el 93% de los genes que poseen metilación según el MeDIP-seq, posee una expresión baja o nula, indicando que 6mA es una marca represiva cuando se encuentra en genes en *T. vaginalis*.

Estos hallazgos demuestran por primera vez que la epigenética controla, al menos en parte, la transcripción de genes en este parásito.

■ Trypanosoma cruzi: un genoma en expansión

Berná L.1, Rodríguez M.2, Chiribao M.L.1,3, Parodi-Talice A.1,4, Pita S.1,4, Rijo G.1, Alvarez-Valin F.2, Robello C.1,3

1 Laboratory of Host Pathogen Interactions-UBM, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

2 Sección Biomatemática-Unidad de Genómica Evolutiva, Facultad de Ciencias-UDELAR, Montevideo, Uruguay

3 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina-UDELAR, Montevideo, Uruguay

4 Sección Genética, Facultad de Ciencias-UDELAR, Montevideo, Uruguay

Publicado por primera vez en el 2005, la secuenciación del genoma de *Trypanosoma cruzi* confirmó evidencias previas de que se trataba de un genoma con un alto contenido de secuencias repetidas, las cuales incluían regiones codificantes de proteínas, constituyendo lo que se dio en llamar familias multigénicas. Esta primera secuenciación por el método de Sanger, tuvo como limitante la imposibilidad de generar un ensamblaje que permitiera tener una visión panorámica de su arquitectura, debido a la fragmentación. Las nuevas técnicas de NGS no permiten solucionar el problema de la fragmentación, ya que las mismas se basan en lecturas cortas, siendo su principal fortaleza la profundidad. En los últimos años, las metodologías de secuenciado de lecturas largas abrieron una nueva perspectiva, y son particularmente adecuadas para abordar los desafíos asociados con el genoma de *T. cruzi*, ya que permiten la determinación directa de la secuencia completa de grandes grupos de secuencias repetitivas sin colapsarlas, y a su vez evita la fragmentación del ensamblado. Presentamos aquí el análisis del genoma de dos clones de *T. cruzi*: el híbrido TCC (TcVI) y el no-híbrido Dm28c (TcI), determinados por PacBio. La mejora sustancial en los ensamblajes nos permiten estimar con precisión el número de copias de cada gen, la abundancia y distribución de secuencias repetitivas -tanto satélites como retroelementos- así como la complejidad de las familias multigénicas. En particular, la re- anotación de estas familias permite ahora tener una visión sumamente mejorada de este grupo de genes, lo cual redundará en una mayor capacidad de análisis en futuros estudios de expresión de las mismas. Encontramos que el genoma de *T. cruzi* se compone de un compartimento central (core) y un “compartimento disruptivo” (compuesto por transalidasas, mucinas y MASPs), que difieren sustancialmente en contenido de GC y composición génica. Por otra parte, en el caso de la cepa híbrida TCC, los cromosomas homólogos se pudieron ensamblar por separado, lo que nos permite recuperar haplotipos en lugar de secuencias únicas formadas por mosaicos de ambos, así como determinar sitios de recombinación. La accesibilidad de estas metodologías y la prueba de concepto presentada en este trabajo, probablemente contribuya a que otros grupos también aborden el estudio de la arquitectura genómica de *T. cruzi*, lo cual redundará en una importante expansión del conocimiento genómico de estos protozoarios.

■ Estudio de la secreción de ARNs pequeños en parásitos cestodos

Ancarola M.E.1, Lichtenstein G.1, Marcilla A.2, Macchiaroli N.1, Pérez M.1, Herz M.3, Brehm K.3, Poncini C.1, Rosenzvit M.1, Kamenetzky L.1, Cucher M.1,3

1 IMPaM Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

2 Área de Parasitología, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología, Universitat de València, Burjassot, Valencia, Spain

3 Instituto de Higiene y Microbiología, Universidad de Würzburg, Würzburg, Alemania

La comunicación intercelular es crucial en múltiples procesos celulares y se produce por mecanismos que pueden involucrar, entre otros, la secreción de factores solubles o la transferencia de vesículas extracelulares (VE). Estos mecanismos también son relevantes en la comunicación parásito-hospedero, en donde la señalización entre organismos de distintas especies es fundamental para el establecimiento y persistencia de las diversas parasitosis. Entre las moléculas efectoras secretadas se encuentran los microRNAs (miRNAs), los cuales son ARNs pequeños que regulan la expresión de genes blanco y pueden detectarse tanto intra como extracelularmente. Este último caso se asocia a la secreción en VE o complejos ribonucleoprotéicos solubles (cRNP) lo que les permite regular la expresión génica en células receptoras.

En este trabajo analizamos la secreción de miRNAs en parásitos cestodos. Los cestodos son helmintos que pueden causar enfermedades crónicas debilitantes en el hombre, tales como la neurocisticercosis y la equinococosis, producidas por *Taenia solium* y *Echinococcus* spp., respectivamente.

Usando como modelo el estadio de metacestode de *Mesocostoides corti*, *Taenia crassiceps* y *Echinococcus multilocularis* demostramos que los cestodos producen VE, las cuales sólo alcanzan el medio extra-parasitario en los dos primeros casos dado que la capa laminar en *E. multilocularis* limita ampliamente este proceso. En *E. multilocularis* también detectamos VE en el líquido hidatídico. Teniendo en cuenta estos resultados, analizamos la presencia de ARN extracelular tanto en VE como en cRNP secretados por estos parásitos. De esta forma, observamos que las tres especies secretan principalmente ARNs pequeños (<200 nt) entre los cuales detectamos miRNAs. Mientras que en *M. corti* y *T. crassiceps* los miRNAs co-purifican principalmente con VE, en *E. multilocularis* se los detecta mayoritariamente en la fracción de cRNP secretados hacia el medio extra-parasitario, y en VE y cRNP del líquido hidatídico. En *E. multilocularis* caracterizamos el perfil completo de miRNAs secretados, algunos de los cuales regularían genes en el hospedero intermediario relacionados con el sitio de establecimiento del parásito.

Los resultados obtenidos en este trabajo presentan evidencia novedosa sobre la secreción de ARNs pequeños en parásitos cestodos. Además, aportan información para la búsqueda de nuevos biomarcadores de enfermedades causadas por cestodos mediante la detección de miRNAs extracelulares.

Búsqueda de Fármacos

■ Nuevas entidades químicas para el desarrollo de fármacos antiparasitarios

Labadie G.R.

Instituto de Química Rosario, IQUIR-CONICET

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

Suipacha 531, S2002LRK, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Las enfermedades parasitarias desatendidas afectan a millones de personas en los países en desarrollo. Parte de estas afecciones son causadas por parásitos protozoarios entre las que se encuentran la malaria, las leishmaniasis y las tripanosomiasis. El arsenal de fármacos existentes para el tratamiento de estas enfermedades es inadecuado en términos de eficiencia, toxicidad y desarrollo de resistencia, sin embargo, ha permanecido prácticamente inalterado hasta hace pocos años.

Nuestro laboratorio se ha abocado a establecer un programa para avanzar en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de estas enfermedades. Para ello hemos establecido una estrategia de búsqueda de nuevas entidades químicas (NEC), trabajando subsecuentemente en el desarrollo de nuevos compuestos líderes. La búsqueda de NEC ha comenzado alternativamente desde el diseño racional de inhibidores de dianas terapéuticas previamente validadas o del ensayo fenotípico de colecciones de compuestos sintéticos y de derivados de productos naturales. Los compuestos han sido ensayados contra los agentes etiológicos de la malaria, la leishmaniasis visceral, la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas, seleccionando *hits* específicos para cada patología o de amplio espectro. Nuestro programa de trabajo continúa con estudios del mecanismo de acción, validación de blancos biológicos y estudios de química computacional para evaluar el perfil ADME-Tox. Fruto de estos esfuerzos hemos logrado encontrar derivados de diaminas alifáticas, esteroides, aminoácidos y compuestos isoprenilados, entre otras, que se posicionan como excelentes candidatos para el desarrollo de fármacos.

En el curso de esta mesa redonda se discutirán distintos ejemplos de la estrategia abordada, las dificultades encontradas en su implementación y el estado actual de desarrollo de compuestos líderes a partir de las NEC encontradas.

- **Identificación de fármacos inhibidores del transporte de metabolitos de *Trypanosoma cruzi* con actividad tripanocida**

Pereira C.A., Sayé M., Reigada C., Valera-Vera E.A., Miranda M.R.

IDIM Instituto de Investigaciones Médicas, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

La familia de transportadores de aminoácidos y poliaminas de *T. cruzi* denominada TcAAAP (*Amino Acid/Auxin Permeases*) son interesantes como blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas drogas ya que: (I) no se han encontrado homólogos de estas permeasas en mamíferos; (II) son responsables de la disponibilidad intracelular de varios metabolitos esenciales, (III) regulan rutas metabólicas y mecanismos de respuesta del parásito y (IV) varios miembros de esta familia son indispensables para la supervivencia del parásito. Teniendo en cuenta estos datos, el trabajo se focalizó en la búsqueda, mediante simulaciones computacionales combinado con técnicas *in vitro*, de fármacos con actividad tripanocida que actúen inhibiendo los transportadores de prolina y poliaminas. Para ello se realizó en primer lugar una estrategia de rastreo virtual por similitud utilizando bases de datos de compuestos aprobados para su uso en otras patologías. Como moléculas de referencia para las búsquedas se establecieron, el cristal violeta (inhibidor del transporte de prolina) y la droga oncológica experimental, ANT-4 (inhibidor del transporte de poliaminas). De esta manera se encontraron cuatro posibles inhibidores para cada uno de los transportadores. De los posibles inhibidores del transportador de prolina, tres de ellos (loratadina, ciproheptadina y clofazimina) inhibieron efectivamente el transporte y presentaron actividad tripanocida en epimastigotes (IC_{50} entre 9 y 53 μM) y tripomastigotes (IC_{50} entre 3 y 13 μM). Respecto a los posibles inhibidores del transportador de poliaminas, tres de ellos fueron efectivos (promazina, clorpromazina y clomipramina), de los cuales sólo la clorpromazina y la clomipramina presentaron actividad tripanocida en epimastigotes (IC_{50} 51 y 49 μM) y tripomastigotes (IC_{50} 1.6 y 4.7 μM). Por último, las posibles interacciones entre los inhibidores identificados y los transportadores blanco fueron analizadas mediante técnicas de *molecular docking*.

Los resultados de este trabajo representan los primeros pasos del reposicionamiento de drogas para la enfermedad de Chagas. Esta estrategia disminuye el tiempo y el costo económico necesarios para la aplicación fármacos conocidos en el tratamiento de otras patologías y es aconsejada por organismos

internacionales para su aplicación en enfermedades desatendidas.

■ **Reposicionamiento de drogas para tratamiento contra la enfermedad de Chagas. Enzimas reparadoras de *Trypanosoma cruzi* como blancos terapéuticos**

Sasoni N.1,2, Davies C.3, Campos E.M.3, Garay A.S.2, Herrea F.2, Rodrigues D.2, Zago P.3, Iglesias A.A.1,2, Guerrero S.A.1,2, Arias D.G.1,2

1 Laboratorio de Enzimología Molecular, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET - UNL), Santa Fe - Argentina

2 Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe - Argentina

3 Instituto de Patología Experimental, Universidad Nacional de Salta - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Salta, Argentina

La metionina es un aminoácido susceptible de ser oxidado a metionina sulfóxido (MetSO). La reducción de MetSO a metionina es catalizada por las enzimas metionina sulfóxido reductasas (MSR), enzimas presentes en casi todos los organismos. Recientemente, hemos caracterizado proteínas pertenecientes a la familia MSR de *Trypanosoma cruzi*, que serían relevantes para la supervivencia de este patógeno en las diversas etapas de su ciclo de vida. La enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida causada por el parásito *T. cruzi*, que afecta principalmente a los países subdesarrollados. No obstante, en la actualidad se ven afectados también países desarrollados como Estados Unidos y países de Europa. Los medicamentos actuales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el nifurtimox y benznidazol. Ambos medicamentos poseen efectos adversos graves y son menos efectivos en las infecciones crónicas. Por lo tanto, la necesidad de descubrir nuevos medicamentos es esencial. El reposicionamiento de medicamentos es una opción interesante dentro de la comunidad internacional de desarrollo de medicamentos. Mediante técnicas de modelado molecular y cribado virtual, utilizando fármacos aprobados y disponibles en el mercado los cuales están publicados en la base de datos ZINC (2924), identificamos fármacos con potencial de capacidad de unión a proteínas MSR de *T. cruzi*. A partir de un análisis preliminar de *molecular docking*, se seleccionaron (con las mejores energías de interacción) y evaluaron un conjunto de 19 compuestos mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Se evaluaron los efectos tripanocida de los compuestos seleccionados sobre células de epimastigotes y de tripomastigotes metacíclicos. Entre estos fármacos, la flunarizina, la trifluoperazina, el estradiol-benzoato, la domperidona, la pimozida, la bromo-ergocriptina y el itraconazol mostraron mejor o similares efectos tripanocidas (rango de IC₅₀ de 1 a 50 uM) en comparación con nifurtimox o benznidazol (IC₅₀ de 6 y 25 uM, respectivamente). Los ensayos *in vitro* de *thermal shift* y de actividad enzimática apoyan los datos obtenidos *in silico*, mostrando efecto inhibitorios sobre la actividad metionina sulfóxido reductasa. Este trabajo sugiere que los fármacos conocidos que identificamos podrían usarse para diseñar nuevas estrategias terapéuticas contra la enfermedad de Chagas.

Proyecto financiado por ANPCyT (PICT2014-2103) y Fundación Bunge y Born (subsidio para investigación de la enfermedad de Chagas - 2016).

■ **Paulonas N5-sustituídas como inhibidores de la síntesis de tripanotión, el talón de Aquiles del metabolismo redox de los tripanosomátidos**

Comini M.A.

Lab. Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

A lo largo de su evolución, los tripanosomátidos desarrollaron diversas características estructurales, moleculares y metabólicas únicas. Una de ellas lo representa su metabolismo redox, el cual depende de un tiol de bajo peso molecular ausente en mamíferos, el tripanotión (bis glutationil-espermidina: T(SH)₂). El poder reductor del T(SH)₂ sostiene funciones celulares esenciales como la replicación del ADN y la defensa/reparación del daño oxidativo y contra xenobióticos (fármacos). Los tripanosomátidos carecen de sistemas complementarios para mantener el balance redox intracelular, por lo tanto las enzimas encargadas de la síntesis del T(SH)₂ (monoglutationil-espermidina sintetasa: GspS y tripanotión sintetasa: TryS) constituyen blancos atractivos para el diseño de compuestos selectivos contra estos patógenos.

En esta charla se resumirán los estudios biológicos y bioquímicos realizados para validar la indispensabilidad funcional de la TryS en *Trypanosoma sp.* y *Leishmania infantum*.

También se presentarán los resultados del diseño y optimización del *scaffold* paulona (7,12-dehidroindol[3,2-d][1]benzacepin-6(5H)-onas) como fuente de inhibidores específicos de la TryS de tripanosomátidos. El efecto *on-target* de los compuestos más activos y selectivos (EC₅₀ 0.4-10 μM, índice de selectividad >30) fue confirmado empleando estrategias complementarias (determinación de metabolitos y sondas redox). La inhibición de la TryS sensibilizó a los parásitos contra la acción citotóxica de fármacos reconocidos por interferir con el balance redox de tripanosomátidos (nifurtimox, benznidazol y sales de antimonio).

Estudios cinéticos revelaron un mecanismo complejo de inhibición de la TryS por parte de las paulonas, el cual fue confirmado por ensayos de calorimetría de titulación isotérmica y simulaciones moleculares. Estos resultados sientan las bases para el diseño racional de una tercera generación de compuestos con mayor potencia y selectividad contra TryS de distintos tripanosomátidos patógenos.

Vacunas-Inmunología

- **Vacunas y el brazo regulatorio del sistema inmune. Una mirada desde el modelo de infección por *Trypanosoma cruzi***

Cabrera G.1,2

1 Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe

2 Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un parásito protozoario que ha evolucionado diversas estrategias capaces de influir tanto sobre componentes efectores como regulatorios de la respuesta inmune del huésped. Si bien se han desarrollado numerosos candidatos vacunales capaces de estimular en modelos experimentales la respuesta efectora del sistema inmune, la influencia de estas formulaciones sobre el brazo regulador ha sido escasamente evaluada. Dicho enfoque podría revestir especial interés, debido a que pese a los grandes esfuerzos realizados no se ha obtenido aún protección esterilizante y el papel de la respuesta regulatoria podría estar relacionado con esta dificultad, tanto a nivel de la inducción por las vacunas, como a través de los mecanismos regulatorios manipulados por el *T. cruzi*. Resultados de nuestro laboratorio sugieren que una formulación basada en la una fracción de la proteína transsialidasa (TSf) formulada con un adyuvante de base liposomal (ISPA) influencia no solo parámetros de la respuesta efectora, (incluyendo niveles de anticuerpos anti-TSf, reacción de hipersensibilidad de tipo IV contra dicha proteína, producción de IFN-γ por células CD4 y CD8), sino también parámetros de la respuesta regulatoria, como células CD11b+GR-1+ con fenotipo de células supresoras de origen mielóide (MDSC) y células T CD4+Foxp3+ regulatorias (Treg), todo lo cual correlacionó con la obtención de capacidad protectora contra el parásito. El objetivo principal de esta presentación es resumir y discutir el papel de las células MDSC y Treg durante la etapa aguda de la infección por *T. cruzi*, y la posible utilidad de influir en dichas poblaciones como objetivos adicionales para el diseño

■ **Evaluación de bovinos de un nuevo candidato vacunal para *Babesia Bovis* basado en un esquema de virus MVA y proteínas recombinantes**

Jaramillo Ortiz J.M.1, Gravisaco M.J.1, Echaide I.2, Paoletta M.1, Montenegro V.1, de la Fournière S.1, López Arias L.1, Valenzano M.1, Guillemi E.1, Farber M.1, Wilkowsky S.1

1 Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina

2 EEA INTA Rafaela, Santa Fé, Argentina

La babesiosis bovina causada por *Babesia bovis* genera importante mortalidad en el ganado del norte argentino. La inmunización activa se logra a través de la vacunación con cepas atenuadas del parásito. Estas vacunas presentan algunas desventajas relacionadas con su estabilidad, producción y almacenamiento.

El virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) ha sido evaluado con éxito como candidato vacunal para la prevención de enfermedades en salud humana y veterinaria, administrándolo en esquemas de tipo “prime-boost” combinado con el mismo antígeno expresado en otro sistema.

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que un “prime” con un multiantígeno formado por fragmentos de 3 proteínas de *B. bovis* fusionadas en un único marco de lectura y expresado en *E. coli* seguido de un “boost” con un MVA recombinante (MVAr) que codifica para el mismo multiantígeno, despiertan en ratones una respuesta de tipo B y Th1 caracterizada por altos valores de IgG2 y de células T CD4+ productoras de IFN γ y TNF α .

El objetivo de este trabajo fue evaluar ambos candidatos vacunales en el único modelo de infección que es el bovino. Para ello se utilizaron 20 novillitos de 13-15 meses de edad divididos en 4 grupos. El grupo 1 (G1) recibió un “prime” de proteína y un boost al día 42 con virus MVAr. El G2 recibió solamente la vacuna viva. El G3 (control) recibió el mismo esquema con una proteína de *Neospora caninum* y el virus MVA wild type. El G4 (control) recibió solamente 2 dosis del vehículo en los mismos intervalos. Después de 11 semanas de la primera inmunización, todos los bovinos fueron desafiados con 10^7 eritrocitos infectados con una cepa virulenta de *B. bovis*. A las 48hs, todos los grupos fueron monitoreados a diario durante 10 días para determinar signos y síntomas de la enfermedad como parasitemia (frotis y Real Time PCR), temperatura y hematocrito.

Los resultados indicaron que tanto los animales del G1 como el G2 tuvieron elevados títulos de anticuerpos IgG2 y altos porcentajes de células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN γ y TNF α , mientras que estos indicadores tuvieron valores significativamente menores los grupos control. La magnitud de la respuesta B y T fue siempre mayor en el grupo de la vacuna recombinante. Sin embargo, todos los bovinos del G1 así como los del G3 y G4 mostraron signos clínicos de babesiosis. Los experimentos de seroneutralización demostraron que el G2 que recibió la vacuna viva fue el único que contenía anticuerpos neutralizantes de la invasión, indicando el rol pivotal de éstos en la generación de protección. En conclusión, estos resultados confirmaron que el esquema “prime-boost” utilizado fue eficaz en la inducción de una potente respuesta celular y humoral antígeno-específica en las condiciones evaluadas. Sin embargo, esta respuesta no resultó protectora, lo cual podría estar relacionado con la ausencia de respuesta de memoria, la elección de los antígenos o de la conformación de los epitopes en la quimera.

■ **Vacunación contra *Fasciola hepatica* basada en una proteína de tipo Kunitz: IL17 en la inducción de una respuesta inmune celular y anticuerpos**

Silvane L.1, Celias D.1, Maletto B.1, Orellano A.1, Motran C.1, Romagnoli P.2, Sanabria R.3, Pruzzo

- 1 Dpto. de Bioq. Clín. Fac. C. Qcas. Univ.Nac.Córdoba. CIBICI-CONICET. Córdoba, Argentina.
- 2 Instituto Universitario de Ciencias Biomédicas de Córdoba (IUCBC)
- 3 Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH), Chascomús, Argentina
- 4 Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
- 5 Dpto de Farmacia, Fac. C. Qcas. Univ. Nac.Córdoba, UNITEFA (CONICET), Córdoba, Argentina

La Fasciolosis es una enfermedad cosmopolita que produce enormes pérdidas económicas en la ganadería. El triclabendazol, es el fármaco de elección contra la infección. Sin embargo, la eficacia de esta droga, está en riesgo a medida que la resistencia está emergiendo. En nuestro laboratorio, estudiamos una vacuna basada en una molécula de tipo Kunitz (KTM), un inhibidor de serin-proteasas con un papel clave en la supervivencia del parásito, formulada con CpG-ODN/Coa-ASC16, un adyuvante capaz de inducir una respuesta Th1 y Th17. Se utilizó un protocolo de inmunización en ratones BALB/c, con 3 dosis de KTM en CpG-ODN/Coa-ASC16 por vía s.c. en los días 0-7-14. El día 21 los animales fueron desafiados con 6 metacercarias de *F. hepatica* por vía oral. Los porcentajes de protección en los animales vacunados fueron de un 80% (ensayo de supervivencia, $p > 0.05$ Mantel-Cox Test) comparado con aquellos grupos inmunizados con el adyuvante ó el control infectado. En correlación con la protección observada, los animales vacunados con KTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron una estructura preservada del hígado en relación con los del grupo infectado. También se vieron niveles elevados de IgG1 e IgG2a específicos en suero (ELISA, $p > 0.05$ ANOVA). Adicionalmente, al día 4 post-infección, se detectaron incrementados títulos de IgA en lavado intestinal, heces y suero ($p > 0.05$ ANOVA). Por otra parte, en los ratones inmunizados con KTM/CpG-ODN/Coa-ASC16 se detectaron altas concentraciones de IFN- γ e IL-17 en los sobrenadantes de cultivos de Placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos y esplenocitos (ELISA, $p > 0.05$ ANOVA). Dada la asociación observada entre la producción de IL-17 en mucosa, con incrementados niveles de IFN- γ e IgA en otros modelos de infección, utilizamos un anticuerpo neutralizante de esta citoquina en nuestro esquema experimental. El tratamiento con anti IL-17 en los animales vacunados, se correlaciono con una disminución en los niveles de anticuerpos IgG2a en suero como así también IgA en suero y heces. Asimismo, se pudo ver una reducción de los porcentajes de producción de IFN- γ específica en esplenocitos (FACS, $p > 0.05$ ANOVA). Estos datos indican que la inmunización de ratones con KTM/CpG-ODN /Coa-ASC16 resulta una estrategia adecuada para la inducción de una potente respuesta inmune de IL-17, la cual participaría en la producción exacerbada de anticuerpos específicos e IFN- γ . Este mecanismo podría estar involucrado en la inmuno-profilaxis contra el parásito.

-
- **La ausencia de IL-10 durante la infección con *T. cruzi* afecta la expansión y activación de linfocitos T CD8⁺ conduciéndolos a un fenotipo prematuramente exhausto**

Miranda C.G.1,2, Pino Martinez A.M.1,2, Batalla E.I.1,2, González Cappa S.M.1,2, Alba Soto C.D.1,2

- 1 Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología., Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina
- 2 Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)., Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

IL-10 es una citoquina pleiotrópica cuya señalización afecta diferentes tipos células. Previamente encontramos en un modelo de infección experimental con *T. cruzi* una mayor morbilidad y menor control parasitario en ratones deficientes en IL-10 (IL-10KO) en comparación con ratones de tipo salvaje (WT). A pesar de una incrementada activación de macrófagos y células dendríticas, los ratones IL-10KO fueron más susceptibles a la infección. La cinética de los linfocitos T de bazo y sangre periférica reveló que

los ratones IL-10KO infectados no lograban expandir los linfocitos T (LT) CD8⁺ circulantes totales y bazo, un fenómeno observado habitualmente en la segunda semana de infección en ratones WT.

Nos propusimos estudiar el perfil de activación funcional de los LT CD8⁺ en respuesta a la infección aguda por *T. cruzi* en ausencia de IL-10.

Los LT CD8⁺ totales de ratones IL-10KO exhibieron una reducción significativa en la proliferación, potencial citotóxico y producción de IFN- γ y mayores niveles de apoptosis que sus contrapartes de WT. La citotoxicidad *in vivo* de células diana por LT CD8⁺ específicos del parásito que reconocen un epítipo MHC-I de transalidasa de *T. cruzi*, fue menor en ratones IL-10KO que en ratones WT. La ausencia de IL-10 afecta la funcionalidad de LT CD8⁺ tanto del pool total como del *T. cruzi*-específico. Los LT CD8⁺ de ratones IL-10KO mostraron una significativamente mayor expresión en su superficie de la molécula inhibitoria PD-1 y una expresión de ARNm aumentada de los receptores CTLA-4 y LAG-3. El análisis funcional de estos linfocitos indica que los mismos tienen un perfil prematuramente agotado. Además, la ausencia de IL-10 afectó selectivamente a la expansión, supervivencia y expresión de PD-1 por LT CD8⁺ sin afectar estos mismos parámetros en L T CD4⁺.

Encontramos que la IL-10 participara de los fenómenos que conducen a la expansión primaria y activación funcional de las LT CD8 + durante la infección *in vivo*. El papel antiinflamatorio de la IL-10 ha sido ampliamente explorado, mientras que su papel inmunoestimulador ha recibido menos atención, aunque, desde su descubrimiento, se describió que esta citoquina promovía la proliferación y citotoxicidad de LT CD8⁺. Colectivamente, estos hallazgos revelan que, durante la infección aguda con *T. cruzi*, la IL-10 desempeña un papel estimulador sobre los LT CD8⁺, la población linfocitaria más relevante para el control de los estadios intracelulares de *T. cruzi*.

Herramientas de Biología Molecular

- **Interacciones proteína-proteína como blanco para la búsqueda de nuevas drogas tripanocidas**

Edreira M.

IQUIBICEN Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, FCEN, Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Las interacciones proteína-proteína (IPP) son de suma importancia en los organismos vivos ya que son la base de todos los procesos celulares. La asociación de proteínas en complejos funcionales, constituyen procesos dinámicos que se encuentran altamente regulados. Focalizando este concepto en organismos patógenos, la modulación de interacciones entre proteínas específicas de estos organismos podría perturbar una secuencia de reacciones bioquímicas que llevarían a la pérdida de viabilidad. La utilización de IPPs como blancos terapéuticos representa una nueva percepción de blanco molecular que presenta una serie de ventajas: a diferencia de los inhibidores enzimáticos, que se ve obstaculizado por fuertes homologías dentro de una familia de enzimas, la superficie de unión de los complejos binarios de proteínas facilita el desarrollo de moléculas con mayor especificidad; además, la interface de interacción de un complejo proteína-proteína proporciona múltiples sitios de unión, aumentando las probabilidades de identificar moléculas moduladoras.

Ante la necesidad de encontrar nuevos agentes antiparasitarios y considerando que la modulación de interacciones involucradas en procesos metabólicos esenciales podría afectar la viabilidad del parásito, nuestro objetivo principal consistió en la optimización de las condiciones para emplear un ensayo basado en la Transferencia de Energía de Resonancia de Bioluminiscencia (BRET) en la búsqueda de extractos de origen natural capaces de modular interacciones entre proteínas de *T. cruzi*. Específicamente, se consideraron como blanco interacciones entre proteínas P ribosomales y entre proteínas que intervienen en el procesamiento del ARNm en *T. cruzi*. Las interacciones empleadas cumplen con

dos requerimientos fundamentales: (1) son esenciales para el parásito y (2) presentan características exclusivas respecto de su contraparte en humanos.

Como resultado de nuestro rastreo, hemos encontrado un extracto del arbusto patagónico *Nardophyllum bryoides* con capacidad de modular la interacción entre los factores Sf3b155/p14.

- **Uso de tripanosomas no patógenos para la producción de proteínas recombinantes de *Trypanosoma cruzi***

Potenza M.1, Rodríguez Durán J.J.1, Gómez K.A.1, Tellez-Iñón M.T.1

1 INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

El estudio de la biología de *Trypanosoma cruzi* incluye a menudo la caracterización funcional de una proteína en particular o de procesos celulares que involucran múltiples componentes. Estos estudios pueden requerir de las proteínas de estudio en su forma recombinante, para la realización de experimentos específicos. Cuando la metodología de estudio implica determinaciones de actividad biológica, es deseable que las proteínas recombinantes se dispongan en alto grado de pureza y correctamente plegadas. La obtención de este material puede ser un cuello de botella importante cuando los sistemas de expresión más ampliamente utilizados, como *Escherichia coli*, no satisfacen estas necesidades. Las diferencias intrínsecas de expresión y procesamiento proteico de las bacterias respecto a los tripanosomas pueden resultar en bajos rendimientos de producción o de actividad biológica. Una estrategia válida para superar este problema es optar por sistemas de expresión que ofrezcan un abanico más amplio de modificaciones post-traduccionales. Estas alternativas son sistemas de expresión eucariota que utilizan plantas, levaduras, células de insecto o de mamífero como hospedador. Cuando se utilizan por primera vez en el laboratorio, estos sistemas (excluyendo a las levaduras) requieren de entrenamiento, puesta a punto y adquisición de infraestructura a distintos niveles. En algunos casos, los costos de producción resultan elevados, como ocurre con las células de insecto o mamífero, que requieren el uso de sueros fetales para su cultivo. En esta exposición presentaremos la experiencia adquirida en el uso de un sistema comercial para la expresión de proteínas recombinantes de *T. cruzi* en el parásito no patógeno *Leishmania tarentolae* (Sistema LEXSY®). *L. tarentolae* alcanza altas densidades de biomasa sin la adición de suero como suplemento de cultivo y su manejo es similar al de otros tripanosomatidos. Su maquinaria de expresión y procesamiento proteicos, similares a *T. cruzi* en relación a otros eucariotas, favorece la obtención de proteínas recombinantes activas. En nuestro laboratorio adaptamos el sistema de expresión LEXSY para su utilización en cualquier laboratorio que se encuentre familiarizado con el cultivo y manejo de *T. cruzi*, sin necesidad de adquirir nuevo equipamiento.

- **Desarrollo de herramientas bioinformáticas para estudios genómicos en tripanosomatidos**

Radío S.1, Garat B.2, Sotelo-Silveira J.1, Smircich P.1,2

1 Departamento de Genómica. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC. Montevideo, Uruguay

2 Laboratorio de Interacciones Moleculares. Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay

En los últimos años los estudios genómicos en tripanosomatidos han ido en aumento abriendo puertas para responder nuevas preguntas. Uno de los aspectos que han sido estudiados a este nivel tienen que ver con la caracterización de la peculiar regulación de la expresión génica de estos organismos. Estudios

previos de nuestro grupo han resaltado la necesidad de desarrollar herramientas bioinformáticas para resolver problemas específicos que se han presentado. En particular hemos desarrollado el software UTRme que posibilita la detección de UTRs a partir de datos transcriptómicos, dando un índice de confiabilidad a la predicción realizada. Utilizando esta herramienta nos encontramos caracterizando varios aspectos de la influencia regulatoria de las UTRs de *T. cruzi* en resultados obtenidos de experimentos de RNA-seq y Ribo-seq.

Por otra parte, estamos actualmente desarrollando el programa iDMiner. Esta herramienta de minería de texto toma una lista de identificadores y busca palabras sobrerrepresentadas en resúmenes de artículos en los que los genes (y sus ortólogos en otros organismos) son mencionados. La estrategia aprovecha la información biológica contenida en las publicaciones, la cual se pierde en las búsquedas clásicas de sobrerrepresentación de términos de ontología. Por lo tanto, iDMiner permite resumir información contenida en cientos de artículos, extrayendo términos que pueden dar pistas sobre funciones o procesos comunes de los genes de la lista original.

- **Plataforma de expresión de antígenos en cuerpos de oclusión de baculovirus para su empleo en ensayos de diagnóstico serológico**

López M.G.

Instituto de Biotecnología- Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA)- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Hurlingham Provincia de Buenos Aires, Argentina
IABiMo-CONICET

Los baculovirus son virus de insectos cuyas principales aplicaciones biotecnológicas son el control biológico de plagas y la expresión de proteínas recombinantes. La característica de estos virus de generar estructuras de resistencia llamadas cuerpos de oclusión (OBs o poliedros) conformados mayoritariamente por la proteína poliedrina (POLH), los hace especialmente atractivos desde el punto de vista biotecnológico. A partir de fusiones traduccionales entre POLH y proteínas de interés se pueden generar poliedros quiméricos fácilmente purificables a bajo costo.

En nuestro país la producción de antígenos para diagnóstico utiliza a menudo sistemas procariotas de expresión con costosas metodologías de purificación que dan lugar a la purificación simultánea de contaminantes bacterianos. Éstos producen una fuerte reacción de sueros bovinos y porcinos, disminuyendo la sensibilidad de inmunoensayos de diagnóstico. Si bien existen alternativas para atenuar estos interferentes, la producción de péptidos antigénicos en sistemas de expresión eucariotas como los baculovirus, que no son reconocidos por sueros de mamíferos dada su incapacidad natural para replicar en estos animales, surge como alternativa considerable que mejoraría en varios aspectos tanto la producción como el *downstream processing*.

Nuestro grupo se ha dedicado en estos últimos años al estudio de la incorporación de proteínas a los OBs. Hemos descrito por primera vez la posibilidad de expresar antígenos en poliedros sin que los mismos pierdan su capacidad antigénica. Además, mediante la utilización de una línea celular de insecto Sf9 que expresa una copia mutante de POLH (Sf9POLH_{E44G}) que genera poliedros de mayor tamaño, hemos logrado un aumento significativo del rendimiento de proteína recombinante respecto a su contraparte convencional, llegando a recuperarse 6 veces más cantidad de proteína de fusión (López *et al.*, 2018). Debido a su estructura que brinda un andamiaje para pequeños epitopes y la ausencia de reconocimiento por parte de sueros bovinos, la POLH resultó ventajosa como proteína de fusión en la incorporación de péptidos antigénicos del parásito *Babesia bovis* en OBs. Los poliedros recombinantes (rOBs) disueltos utilizados como antígenos en ensayos de ELISA reaccionaron frente a sueros de bovinos infectados. A su vez hemos obtenido resultados alentadores en la producción de rOBs que incorporan péptidos antigénicos no estructurales del virus de la fiebre aftosa que mantuvieron sus propiedades antigénicas, lo que alienta a su empleo en nuevas técnicas de diagnóstico DIVA

(diferenciación de animales vacunados de infectados).

En síntesis, esta nueva metodología de producción de proteínas de interés, extrapolable a proteínas de cualquier microorganismo, posee un enorme potencial y permitirá el desarrollo de una plataforma de expresión para abastecer de antígenos a nuevos métodos de diagnóstico serológico.

Pósters

Biología Parasitaria

3 - Diseminación de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivos tridimensionales

Rodriguez M.E., Masip Y., Tekiel V.

IIB-INTECH Instituto de Investigaciones Biotecnológicas

La capacidad de diseminación dentro de tejidos y órganos es una de las características de la infección por *T. cruzi* menos comprendidas en la actualidad. Estudios en modelos animales sugieren que la mayoría de los tejidos y órganos son infectados por el parásito durante la fase aguda de la enfermedad. La capacidad de diseminar e invadir tejidos podría estar directamente relacionada con la virulencia y/o tropismo tisular que se observa entre distintas cepas de *T. cruzi*. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares asociados a este proceso siguen siendo desconocidos. En un estudio previo, utilizamos un modelo de cultivo 3D para analizar la capacidad de diseminación de diferentes cepas de *T. cruzi*, y demostramos que existe una relación entre la capacidad de migrar y penetrar dentro de esferoides 3D y la virulencia de las cepas *in vivo*. Por otro lado, tripomastigotes con alta capacidad de diseminación parecen usar el espacio intercelular para moverse hacia el interior de los esferoides, en un proceso rápido que les permite llegar hasta 50 μ m en profundidad (atravesando 5-6 capas de células) durante la primera hora de infección. En este trabajo, nos propusimos analizar la capacidad de diseminación de tripomastigotes de la cepa CL Brener en diferentes microambientes, empleando distintos linajes celulares para generar cultivos en 3D. Observamos que durante las primeras 24 hs, *T. cruzi* disemina hacia el interior de esferoides exclusivamente generados con células epiteliales (HeLa, HEK, CaCo2), pero no con linajes no-epiteliales (Vero, HFF [fibroblastos]). Sin embargo, en esferoides generados con células epiteliales + fibroblasto (heterotípicos), la diseminación ocurre de igual modo que en esferoides de células epiteliales. Nuestros resultados sugieren que la capacidad de diseminación de *T. cruzi* no solo depende de la cepa de parásito sino también del microambiente tisular al cual se enfrenta.

5 - Efecto de daunorubicina y doxorubicina en el transporte de poliaminas y la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Ruiz M.D.*, Fraccaroli L.*, Balcazar D., De Pino V., Larocca L., Carrillo C.

ICT "Milstein" – CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

La enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica en América Latina causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Las terapias tripanocidas actuales presentan alta toxicidad por lo que existe la necesidad de identificar nuevos blancos más específicos para desarrollar nuevas terapias. Las antraciclinas son drogas antitumorales incorporadas en humanos a través del transportador de cationes orgánicos *hOCT1*, que presenta transporte de poliaminas con baja afinidad. Dado el rol esencial de las poliaminas en *T. cruzi*, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de las antraciclinas en la proliferación de epimastigotes y estudiar la interacción y/o incorporación de dichos compuestos a través de la permeasa de poliaminas *TcPAT12*.

Las cepas de *T. cruzi* utilizadas en este estudio fueron poblaciones clonales de Y-GFP (control) y de Y-*TcPAT12*-GFP (sobrexpresante del transportador *TcPAT12*). Las antraciclinas evaluadas fueron Daunorubicina (Dnr) y Doxorubicina (Dxr).

Se evaluó el efecto de Dnr y Dxr sobre la proliferación y viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* mediante curvas de crecimiento y ensayos de MTT bajo diferentes condiciones de cultivo. Dnr y Dxr afectaron significativamente la proliferación de epimastigotes tanto de la cepa control como de Y-*TcPAT12*-GFP. El efecto fue dosis dependiente, mostrando valores de IC50, en ambas cepas, en el rango de 0,3 uM para Dnr y 3,0 uM para Dxr. La depleción de putrescina en el medio (14 días) aumentó la sensibilidad de ambas cepas a las antraciclinas (rangos de IC50 de 0,1uM para Dnr y 2,0 uM para Dxr).

Por otro lado, evaluamos el transporte de putrescina (permeasa *TcPAT12*), en presencia de diferentes concentraciones de Dnr y Dxr. Para evaluar la especificidad del efecto, se estudió el transporte de arginina (*TcAAAP411*), lisina (*TcAAP7*) y riboflavina (*TcRibj*).

Las antraciclinas afectaron el transporte de putrescina en ambas cepas. Dnr (50uM) inhibió el transporte en un 55 % en la cepa Y-GFP y 20 % en Y-*TcPAT12*-GFP, mientras Dxr (50uM) presentó una inhibición menor. La incorporación de lisina, arginina y riboflavina no se vio afectada por las antraciclinas, confirmando la especificidad del efecto. Ensayos complementarios de competencia sugirieron que Dnr es un inhibidor incompetitivo del transporte de putrescina.

Concluimos que Dnr y Dxr afectan la viabilidad de los epimastigotes de *T. cruzi* y presentan una interacción inhibitoria con el transportador de poliaminas *TcPAT12*, que estaría relacionada con su capacidad tripanocida.

7 - Estudio comparativo del rol de la proteína *TcHTE* de *Trypanosoma cruzi* en el transporte de hemina y hemoglobina

Tevere E., Pagura L., Cricco J.A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, IBR (CONICET – UNR)

Trypanosoma cruzi es auxótrofo para hemo. Sin embargo, este cofactor es esencial para el parásito, ya que forma parte de diversas hemoproteínas y enzimas. En nuestro laboratorio estamos interesados en elucidar cómo el hemo es incorporado, distribuido y metabolizado para ser utilizado por el parásito. Dada la importancia de estos procesos, el transporte de hemo es considerado un blanco promisorio para la inhibición de la proliferación del parásito. En el laboratorio, identificamos y estudiamos una proteína de membrana de *T. cruzi* que denominamos *TcHTE* (*T. cruzi* Heme Transport Enhancer), cuya función es esencial para la incorporación de hemo desde el medio extracelular. *TcHTE* se localiza en el bolsillo flagelar, donde se postula que ocurre el transporte de metabolitos en tripanosomátidos y se expresa principalmente en los estadios replicativos del parásito (epimastigotes y amastigotes). Además, en epimastigotes, la expresión de *TcHTE* responde a la concentración intracelular de hemo, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Dado que la hemoglobina es la principal fuente de hemo para el parásito, analizamos el crecimiento de epimastigotes y la expresión y localización de *TcHTE* en parásitos *Wild Type* y en levaduras que expresan *TcHTE* recombinante en función de la fuente de hemo, hemina vs. hemoglobina (Hb), en cantidades equimolares de hemo.

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de levaduras deficientes en la síntesis de hemo (*hem1Delta*) que expresan r*TcHTE* utilizando hemina o Hb como suplemento. Sin embargo, el perfil de crecimiento de epimastigotes, su morfología y motilidad resultaron diferentes dependiendo de la fuente de hemo utilizada, donde la presencia de hemina afectó negativamente estas características en comparación con cantidades equivalentes de Hb. Esto muestra que la exposición a hemo libre causaría mayor toxicidad a los epimastigotes en cultivo axénico. El análisis por Western blot de *TcHTE* no mostró variaciones significativas en muestras provenientes de epimastigotes incubados con hemina o con Hb.

La expresión de *TcHTE* en levaduras permite su crecimiento en medios restrictivos de hemo independientemente de la fuente de hemo utilizada (hemina o Hb). En epimastigotes, la utilización de hemina como fuente de hemo causa mayor efecto tóxico en cultivo axénico que la utilización de Hb. *TcHTE* responde de la misma manera a la importación de hemo en epimastigotes independientemente de la fuente de hemo utilizada (hemina o Hb).

9 - Functional characterization of the Cest Motif (Chaperone for the *E. Coli* secretion of TIR) in Trypanosomatids

Centeno Camean C., Takada R., Durante I.M., Briones G., Buscaglia C.A., Cámara M. de los M.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina

Using a bioinformatic approach, we identified a small family of proteins restricted to trypanosomatids that present a 'CEST' domain, as it shows structural homology with CesT proteins (Chaperone for *E. coli* secretion of Tir). These proteins form a family of chaperones involved in the secretion of virulence factors through the type III secretion system (TIISS) in enteropathogenic bacteria. Since trypanosomatid CEST motif shown maximal structural homology to protein templates of the *Salmonella* Typhimurium SicP CesT-type chaperone, which is involved in the TIISS-mediated secretion of the cytoskeleton-perturbing SptP effector, we selected this organism and this chaperone-effector pair to generate a functional complementation model. We started by characterizing the CEST motifs present in *Trypanosoma cruzi* TCLP1 (Trypanosomatid CesT-like Protein 1, [1]) and in other 4 molecules from *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata* and *Leishmania mexicana*. Using biochemical, biological and immuno-cytochemical techniques, we verified that the evaluated CEST motifs were able to revert the phenotypic defects (lack of SptP secretion, impaired mammalian cell infection, etc.) of a *S. Typhimurium* Δ SicP strain. Interestingly, the most divergent of the evaluated CEST motifs, which belonged to *C. fasciculata*, was not able to do so. Homology modelling revealed a reasonable superimposition of the buried, hydrophobic β -sheets and the outer α -helix between the *S. Typhimurium* SicP chaperone and the CEST motifs from trypanosomatids except for the *C. fasciculata* CEST motif, which may provide the structural basis for its lack of functional complementation. As to further characterize the *C. fasciculata* CEST motif, we performed immunoprecipitation and native gel assays upon extracts of transformed bacteria. Analyzing the results we concluded that this motif, although able to dimerize in the cytoplasm of the bacteria (a pre-requisite for CesT chaperone function), it is not able to directly interact with the SptP effector *in vivo*. Given the socio-economic relevance of the diseases produced by trypanosomatids and the importance of the CesT chaperones in enterobacteria, we hope that the results obtained here may help to understand the basic biology of these parasites and to identify novel drug targets for intervention against these pathogens.

[1] Durante, I.M et al. 2015. *PLoS One*. 10:e0130099.

Financiamiento: ANPCyT, Fundación Bunge y Born, CONICET, CIN

11 - Molecular and Biochemical Characterization of Adenosine Deaminases acting on tRNA of *Trypanosoma cruzi*

Lobo M.M.1, Balouz V.1, Ducrey I.1, Bertotti S.1, Fleming I.M.C.2, Alfonzo J.D.2, Buscaglia C.A.1, Cámara M. de los M.1

1 IIB-INTECH Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

2 Department of Microbiology, The Ohio State University, USA.

Trypanosoma cruzi is the protozoan causative of Chagas Disease, a major health and economic issue in Latin America. This parasite has a complex population, which is composed of multiple strains displaying considerable genetic drift and phenotypic diversity. In order to analyse the impact of codon usage in *T. cruzi* variability in this work we begun the molecular characterization of the heterodimer of Adenosine Deaminases acting on tRNA which is composed by TcADAT2 and TcADAT3. As a first approach we analysed TcADAT2 and TcADAT3 expression in the main developmental stages of *T. cruzi* at an RNA and protein level by Real Time PCR and Western Blot, respectively, observing that both proteins are expressed along

the parasites life cycle. Secondly and as to start the biochemical characterization of the heterodimer we performed *in vitro* DNA deamination assays using an Ames test in bacteria, in which we evaluated the capacity of the ADATs of deaminating DNA. These assays evidenced that the heterodimer has the capacity to deaminate DNA, which was not observed when either proteins were expressed individually. What is more, *in vitro* interaction assays using recombinant proteins also allowed us to confirm heterodimer formation. As to evaluate the heterodimers capacity to edit tRNAs we performed *in vitro* tRNA editing assays followed by TLC analysis evidencing that the heterodimer has tRNA editing activity. Finally using a transgenic line approach in the CL Brener Strain we expressed ectopically FLAG tagged TcADAT2 and TcADAT3 allowing us to observe that TcADAT2 subcellular localization is nuclear and cytoplasmic while TcADAT3 is localized in the cytoplasm. Localization was confirmed by digitonin extraction assays followed by Western Blot analysis against the FLAG epitope. Moreover, *in vivo* manipulation of tRNA editing deaminase expression leads to increase in the levels of tRNA adenosine-to-inosine. These findings open a novel perspective on gene expression regulation, tRNA abundance and codon usage in *Trypanosoma cruzi* (and trypanosomatids in general).

13 - Perfil proteico de vesículas extracelulares y proteínas solubles secretadas por *Echinococcus granulosus* s. l. y *Echinococcus multilocularis*

Ancarola M.E.1,2, Miles S.2, Maldonado L.1, Brehm K.3, Rosenzvit M.1, Mourglia-Ettlin G.2, Cucher M.1,3

1 Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPam, UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina

2 Instituto de Higiene, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

3 University of Würzburg, Institute of Hygiene and Microbiology, Würzburg, Alemania

Los cestodes son platelmintos con complejos ciclos de vida que pueden causar enfermedades zoonóticas severas como la equinococosis, que es producida por parásitos del género *Echinococcus*. Las especies de este género con mayor importancia sanitaria son *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) y *Echinococcus multilocularis*. En ambos casos, la fase inicial de la infección en el hospedero intermediario es asintomática y puede prolongarse por años. El parásito se establece en diferentes órganos, principalmente en hígado, donde se desarrolla el estadio larval de metacestode. El metacestode está conformado por una capa exterior acelular llamada capa laminar, una capa interna celular llamada capa germinal y está relleno de fluido (líquido hidatídico).

El diagnóstico de la equinococosis se realiza principalmente a través del análisis de imágenes que detectan el parásito ya desarrollado, mientras que los ensayos serológicos son complementarios ya que tienen baja sensibilidad. Recientemente, demostramos que los metacestodes de *E. multilocularis* producen vesículas extracelulares (VE) pero las mismas son retenidas por la capa laminar impidiendo que alcancen el exterior del parásito. Las VE son estructuras redondeadas con bicapa lipídica que transportan moléculas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos.

En este trabajo, analizamos el perfil de secreción proteico del estadio de metacestode de *E. granulosus* s.l. y *E. multilocularis* teniendo en cuenta el mecanismo de secreción (proteínas secretadas de forma soluble o asociadas a VE) así como también la dirección en la cual son secretadas (medio extra-parasitario o líquido hidatídico).

Para ello, muestras de líquido hidatídico y medio condicionado por metacestodes de ambas especies se sometieron a un protocolo de centrifugación diferencial y ultracentrifugación, obteniendo fracciones enriquecidas en VE o proteínas solubles que se analizaron por LC-MS/MS.

Este trabajo constituye el primer reporte sobre el perfil de expresión proteico secretado activamente por los metacestodes de *Echinococcus* spp. hacia el medio extra-parasitario (i.e., el hospedero) aportando información relevante para la búsqueda racional de marcadores diagnósticos.

15 - Puesta a punto y establecimiento de cultivo *in vitro* de amastigotas axénicos de *Trypanosoma cruzi* como posible modelo de estudio de amastigotas celulares

Bilbao L.1,2, Garat B.1, Smircich P.1,2, Pérez-Díaz L.1

1 Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay

2 IIBCE Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Departamento de Genómica, Uruguay

Trypanosoma cruzi es el protozoario causante de la enfermedad de Chagas, patología endémica del centro y sur de América que afecta además a millones de personas alrededor del mundo, constituyendo de esta manera un serio problema sanitario y económico a nivel mundial. El parásito atraviesa un ciclo de vida complejo alternando entre dos hospederos: un insecto triatomino hematófago que funciona como vector, y un hospedero vertebrado. Presenta al menos cuatro estadios principales bien diferenciados relacionados a los distintos entornos a los que se enfrenta. La forma amastigota se encuentra en las células del hospedero mamífero, siendo la única forma intracelular, así como replicativa en este organismo. La misma se encuentra en estrecho contacto con el hospedero vertebrado siendo esencial para la proliferación y persistencia del parásito dentro del mismo. Sin embargo, a pesar de su relevancia biológica, estas formas han sido poco exploradas, dirigiendo la mayor parte de las investigaciones hacia una aproximación *in vitro* de las formas epimastigotas del parásito. No obstante, muchas veces el uso de este último como modelo de estudio no alcanza para contestar determinadas preguntas biológicas. Por otro lado, dado que aún se conoce poco de los factores que desencadenan la amastigogénesis primaria, existe cierta controversia en cuanto a la validez del uso de amastigotas axénicos (obtenidos en cultivo *in vitro* fuera de células de mamífero) como un modelo representativo de amastigotas intracelulares. En este trabajo se estableció una infección de *T. cruzi* en células de mamífero, se extrajeron amastigotas intracelulares, y se compararon con amastigotas axénicos obtenidos a partir de un cultivo *in vitro*. Además de realizar la puesta a punto en la obtención de ambas poblaciones de amastigotas, se evaluó la expresión diferencial de proteínas de superficie para distintos genes marcadores específicos de diferentes estadios mediante qPCR. Se encontró que la expresión de proteínas de superficie marcadoras seleccionadas era similar en amastigotas axénicos respecto a amastigotas celulares y diferente de epimastigotas y tripomastigotas. Asimismo, se observó por Microscopia Electrónica de Barrido que ambos modelos son morfológicamente similares, siendo los amastigotas axénicos de menor tamaño que los celulares. Con estos resultados se intentó aportar datos relevantes hacia un tema que genera polémica dentro de la comunidad.

17 - TcAMPK: Identification and characterization of a cellular energy homeostasis hub regulator in *Trypanosoma cruzi*

Sternlieb T.1, Schoijet A.C.1,2, Genta P.D.1, Alonso G.D.1,2

1 Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” – CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

2 Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

The AMP-activated protein kinase (AMPK) is a heterotrimeric enzyme involved in maintaining energy homeostasis in response to different stresses in many organisms. *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, which affects between 6 and 7 million people. During the transition between the mammal host and the insect vector, *T. cruzi* faces nutritional, oxidative, osmotic and other types of stress, all of which can prompt the parasite to remodel its metabolism and force it to re-establish energy homeostasis. The ability to respond to stress, allows the parasite to differentiate and survive. Recently, it was shown that *Trypanosoma brucei* AMPK is involved in the differentiation from the slender to stumpy stages and in surface protein expression changes in response to nutritional stress. This underscores the relevance of AMPK in critical responses for parasite life cycle progression. We identified four candidate genes for the AMPK

subunits of *T. cruzi* ($\alpha 1$ and $\alpha 2$ catalytic subunits, β and γ regulatory subunits). The alpha subunits show significant sequence and structure differences from the human orthologs. The presence of these subunits in *T. cruzi* epimastigotes was confirmed by RT-PCR, Western blot with a phospho-AMPK α specific antibody, mass spectrometry and by incorporation of ^{32}P to the specific AMPK substrate SAMS in a kinase activity assay. This last assay also allowed us to observe the upregulation of AMPK activity under epimastigote starvation, and the inhibition of this activity with dorsomorphin, a specific inhibitor. Also, each of these subunits was capable of reverting the 'glucose dependent' phenotype of *S. cerevisiae* conditional mutants alternatively lacking one subunit of the AMPK ortholog SNF1. Dansylcadaverine incorporation assays show that the over-expression of the $\alpha 1$ subunit could increase autophagy between 20 % and 40 % in starvation assays. Our results show, for the first time, the presence of a functional AMPK ortholog in *Trypanosoma cruzi*, and its involvement in one relevant metabolic pathway. In the future, we aim to dig deeper in its role through the life cycle and stress responses of this parasite.

19 - Tripanosomátido en canino de paraje Ensenada, departamento de San Cosme, Corrientes, Argentina

Lucero R.H.1, Brusés B.L.1, Formichelli L.B.1, Fernández G.J.1, Wehrendt D.P.2, Schijman A.G.2

1 Area Biología Molecular. Instituto de Medicina Regional. UNNE. Resistencia, Chaco. Argentina.

2 Grupo Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular. (INGEBI-CONICET). Ciudad de Buenos Aires. Argentina.

Se presenta el caso de un canino hembra, de aproximadamente 4 años, utilizado como animal de compañía del propietario que reside en la Ciudad de Corrientes y realiza actividades como productor rural.

El dueño refiere que la misma lo acompaña en actividades rurales y actividades de caza internándose en zonas silvestres.

La perra comienza con episodios de fiebre y se la estudia para descartar Leishmaniasis mediante métodos parasitológicos directos e indirectos. Además se realizan exámenes de laboratorio de rutina como hepatograma y perfil renal, encontrándose los mismos dentro de los valores esperados. En el estudio de hemograma se visualizan formas parasitarias compatibles con tripanosomátidos.

Se remite una muestra de sangre periférica al Laboratorio de Parasitología y de Biología Molecular del Instituto de Medicina Regional, para realizar examen microscópico de extendidos sanguíneos y estudios moleculares. En el examen microscópico directo se observaron y documentaron formas similares a tripomastigotes.

Los estudios de PCR en tiempo real para *T. cruzi* con primers kinetoplastídicos (32F y 148R) y satélites (*cruzi* 1c y *cruzi* 2c) con sondas TaqMan fueron no detectables.

Posteriormente se realizó una PCR convencional con primers D75 y D76, dirigidos al 24S α rDNA, en la que se observó un amplicón de 250pb, que corresponde a las regiones conservadas de los tripanosomátidos. Dado que el tamaño del amplicón es similar al de *Leishmania braziliensis*, se realizó PCR específica para esta especie con primers LB1 y LB2, resultando No detectable.

En base a los resultados obtenidos y al tamaño del amplicón detectado con los primers D75 y D76, se sugiere la posibilidad de que se trate de un *T. caninum*, descrito por Madeira y col (2009). Para confirmar el resultado, el amplicón purificado se envió a secuenciar a Macrogen, Corea, y la secuencia de nucleótidos obtenida se contrastará con cepas de referencia del GenBank.

Durante el transcurso de la investigación epidemiológica del caso, notificado a autoridades del Programa Provincial de Chagas del MSP Corrientes, que incluyó la visita al establecimiento para la búsqueda de vectores, se produjo el óbito del canino, que ocurrió 25 días después de reportado el caso. La investigación intra y peridomiciliaria, no arrojó hallazgos de Triatomíneos.

21 - Análogos estructurales del cristal violeta inhiben el transportador de prolina TcAAAP069 de *Trypanosoma cruzi* y presentan actividad tripanocida

Sayé M., Valera-Vera E.A., Gauna L., Reigada C., Miranda M.R., Pereira C.A.

Laboratorio de Parasitología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM), UBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es una zoonosis que afecta alrededor de 7 millones de personas en América Latina. El cristal violeta (CV) se utilizó durante muchos años como aditivo en bancos de sangre para prevenir la transmisión de la enfermedad por transfusiones sanguíneas. Uno de los mecanismos de acción reportado para el CV en *T. cruzi* involucra la inhibición de la captación de prolina. Además de ser un aminoácido relevante dado que constituye una fuente de carbono y energía alternativa a la glucosa, en *T. cruzi*, la prolina también es importante no sólo para el crecimiento sino también para la diferenciación entre estadios y la patogénesis. La permeasa de prolina TcAAAP069 pertenece a la familia de transportadores de aminoácidos y derivados TcAAAP, y constituye no sólo un interesante blanco terapéutico sino también una posible vía de ingreso de fármacos tripanocidas. En este trabajo se utilizó el CV como molécula de referencia en un *virtual screening* para identificar fármacos aprobados para uso clínico estructuralmente parecidos al CV con efecto biológico similar y menor toxicidad. Primero se validó el CV como inhibidor del transportador TcAAAP069 utilizando parásitos salvajes y parásitos que sobre-expresan la permeasa TcAAAP069 tanto en ensayos de transporte como de crecimiento. Luego se aplicó una estrategia *in silico* de *virtual screening* usando como referencia el CV y se identificaron la olanzapina (OLZ, antipsicótico), la clofazimina (CFZ, antibiótico), la loratadina y la ciproheptadina (LTD y CPH, ambos antihistamínicos). Las cuatro drogas inhibieron el transporte de prolina y presentaron IC₅₀s con valores entre 9 y 120 μ M para los epimastigotes y entre 2 y 55 μ M para los tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*. Además, CFZ, LTD y CPH tuvieron acción tripanocida en epimastigotes de las cepas CL Brener y en DM28c con IC₅₀s en rangos similares a la cepa Y. Por último, se observó un efecto sinérgico entre el benznidazol y una mezcla de estos tres análogos del CV, evidenciado por los índices de combinación y de reducción de dosis. En conclusión, estos resultados sugieren que los análogos del CV LTD, CPH y CFZ son interesantes puntos de partida para el desarrollo de tratamientos alternativos contra la enfermedad de Chagas.

23 - Polimorfismo de genes asociados en la generación de resistencia a fármacos nitroheterocíclicos en *Trypanosoma cruzi*

Muñoz-Calderón A., Curto M.Á., Apodaca S., Schijman A.G.

Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

Introducción: El grado de susceptibilidad a los fármacos con los cuales se trata la Enfermedad de Chagas (ECh) ha sido relacionado con el polimorfismo genético de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi*. La heterogeneidad genética encontrada en *T. cruzi* se considera uno de los principales factores implicados en la respuesta farmacológica de la ECh, sin embargo, hasta la fecha, el rol que tienen los polimorfismos en genes de resistencia sobre escenarios clínicos de la infección por *T. cruzi* y los estudios de genética poblacional que permitan asociar marcadores moleculares del parásito con falla terapéutica son escasos.

Objetivos: Este trabajo tuvo como finalidad caracterizar el polimorfismo genético del locus que codifica la enzima nitroreductasa de tipo I en *T. cruzi* (TcNTR1) y de un locus para una enzima oxidoreductasa putativa (TcOXR) no descrito hasta ahora en *T. cruzi*. Se utilizó ADN_g obtenido de cepas de *T. cruzi* y muestras clínicas de pacientes refractarios al tratamiento etiológico con los fármacos disponibles, Benznidazol y Nifurtimox.

Métodos: A partir de secuencias genéticas de referencia, se realizaron alineamientos mediante CLUSTAL para el diseño de oligonucleótidos que amplifican fragmentos de 943pb y 880pb correspondientes a loci

TcNTR1 y TcOXR, respectivamente. Las asociaciones genéticas se evaluaron mediante secuenciación tipo Sanger. Los alineamientos entre las secuencias obtenidas fueron realizados con Megalign (DNASTAR) y los análisis bioinformáticos mediante diversas herramientas estadísticas.

Resultados: Ambos genes mostraron una identidad de secuencia que promedió el 96 % entre las cepas de referencia y un índice de diversidad media poblacional de 0,027. Se identificaron numerosas mutaciones puntuales, siendo más frecuentes las transiciones de nucleótidos C-T. Por primera vez, se logró caracterizar ambos genes directamente en muestras de sangre periférica de cinco (5) pacientes con ECh refractarios a tratamiento.

Conclusiones: El presente estudio, al mostrar por primera vez la diversidad nucleotídica de genes implicados en fenómenos de resistencia a fármacos nitroheterocíclicos, genera un abordaje metodológico con potencial para el diseño de marcadores de detección temprana de cepas resistentes, lo que contribuiría a un mejor manejo terapéutico del paciente, disminución en el riesgo de selección de cepas multi-resistentes a fármacos y suministraría información epidemiológica valiosa para la ejecución de los programas de control de la ECh.

Epidemiología y Vectores

1 - Aplicación de fumígenos en triatominos resistentes a piretroides: Una alternativa de control

Maza Y.1, Fronza G.2, Wasilewski S.3, Lobbia P.4, Weinberg D.5, Fabiani M.1, Abril M.5, Mougabure-Cueto G.4, Sartor P.1

1 Ministerio de Salud Pública- Prov. Del Chaco

2 Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas

3 Secretaría de Salud de la Nación

4 Centro de Referencia de Control de Vectores, Secretaría de Salud de la Nación - CONICET.

5 Fundación Mundo Sano

La utilización de insecticidas piretroides propició la aparición de focos de poblaciones resistentes a los mismos en la provincia del Chaco. Un alto nivel de resistencia emergió en el paraje Pampa Argentina situado en el Departamento General Güemes. Frente a la necesidad de encontrar alternativas de tratamiento químico eficientes para la eliminación de los insectos resistentes se exploraron numerosas opciones teniendo en cuenta que debían ofrecer la capacidad de no ser tóxicos para las personas y los animales, no ser organodepositaria o con posibilidad de desarrollo cancerígeno ante la exposición repetida.

Mediante consenso con expertos se definió como mejor opción la utilización de Potes fumígenos en 3 ciclos de aplicación cada 30 días. La justificación de su uso estuvo dada por su capacidad de generar humos que arrastran los ingredientes activos (Diclorvos 7,0 %, Permetrina 2,0 %, Beta-Cipermetrina 1,3 %) distribuyéndolos rápida y homogéneamente en el ambiente a tratar, con mínima residualidad y con una elevada capacidad de volteo y muerte de los insectos dado su componente de DDVP, imprescindible para eliminar los ejemplares resistentes.

Para la tarea en terreno se delimitaron las viviendas a intervenir mediante georeferenciamiento y la confección de mapas cartográficos. Se dividió el paraje en "Cuadrantes" sectorizando las áreas de trabajo teniendo en cuenta la dispersión de la positividad, la infestación y la proximidad de viviendas negativas a las positivas. El primer ciclo se llevó a cabo en el mes de Agosto, durante el lapso de dos semanas, con una totalidad de 17 técnicos de campo. Como resultado de la intervención se reevaluaron entomológicamente 43 viviendas y se trataron mediante aplicación de portes fumígenos otras 72, 68 de las cuales fueron detectadas inicialmente como casas positivas y 4 que resultaron positivas a la reevaluación actual del paraje. Se utilizaron alrededor de 260 unidades de fumígenos, con un promedio de utilización de 3 dosis por vivienda. En cada una de las unidades domiciliarias tratadas se registró la muerte de los triatominos lo que es un resultado alentador respecto a la eficacia esperada. Para evaluar la efectividad real de esta intervención, se realizará una reevaluación del paraje a los 6 meses, con lo cual se espera haber eliminado las poblaciones de vinchucas

resistentes a piretroides.

3 - Correlación entre la prevalencia de uncinarias y *strongyloides stercoralis* – ¿una nueva herramienta diagnóstica en salud pública?

Fleitas P.1,2, Socias E.3, Travacio M.4, Cimino R.O.1,2, Krolewiecki A.J.1

1 IIET Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales, Sede Regional Orán, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

2 Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

3 Department of Medicine (Division of AIDS), University of British Columbia, Vancouver, Canadá

4 Consultor independiente

Strongyloides stercoralis y uncinarias, cuyas principales especies son *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*, presentan coincidencias en sus características biológicas y epidemiológicas; la infección ocurre cuando las larvas que se encuentran en suelos contaminados con materia fecal penetran la piel intacta, presentan superposición geográfica y el rango de edad de los infectados es similar. Sin embargo, el diagnóstico de *S. stercoralis* es más desafiante que el de uncinarias, lo que contribuye a que la prevalencia de *S. stercoralis* sea desconocida y mayormente subestimada. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que la prevalencia de uncinarias (P_{Un}), cuyo diagnóstico es más simple en el laboratorio, podría resultar predictiva de la prevalencia de *S. stercoralis* (P_{St}). El objetivo de este trabajo fue investigar la correlación de P_{Un} con P_{St} . Se realizó una revisión sistemática de trabajos científicos publicados entre los años 2014 y 2018. Se efectuó una búsqueda en Pubmed, Embase, CAB, LILACS y sciELO con las palabras clave “Hookworm” “Ancylostoma” “Necator” “Strongyloides” “Uncinarias” y “Estrongyloides”. Dicha búsqueda brindó 400 citas. Estas fueron revisadas por dos revisores mediante un análisis de título y resumen. Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: trabajos en humanos asintomáticos, diagnóstico parasitológico de referencia y PCR, edad, sexo y raza indistinta pero residentes del lugar, estudios epidemiológicos transversales con prevalencia basales de uncinarias y *S. stercoralis*. Se seleccionaron 147 trabajos que fueron analizados teniendo en cuenta el texto completo. Finalmente se confirmó la validez y disponibilidad de datos para 41 trabajos que reportaron 42 poblaciones distintas. Los datos se analizaron usando regresión lineal y la correlación de Pearson. Se consideró P_{Un} como la variable independiente y P_{St} como variable dependiente. Se encontró una correlación significativa entre ambas prevalencias (Pearson = 0.73, $P < 0.0001$), siendo ambas directamente proporcionales ($r^2 = 0.53$ $P < 0.0001$). De esta manera, nuestros resultados sugieren que se podría estimar P_{St} con la función lineal $P_{St} = 0.49x P_{Un} + 0.49$. De confirmarse estos hallazgos con datos experimentales, esta ecuación podría sumarse como una herramienta de gran utilidad para determinar la P_{St} , y de este modo diseñar estrategias diagnósticas y terapéuticas que incluyan a *S. stercoralis*.

5 - Development of duplex TaqMan PCR assays for detection and quantification of *Trypanosoma cruzi* infection in wild and domestic reservoirs

Wehrendt D.P.1, Gómez-Bravo A.2, Pech-May A.4, Ramsey J.M.4, Cura C.1, Curto M.Á.1, Abril M.2, Guhl F.3, Schijman A.G.1

1 INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Buenos Aires, Argentina.

2 Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, Argentina.

3 Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

A major question of epidemiological relevance in Chagas disease studies is to understand the dynamics of *T. cruzi* infection in sylvatic and domestic transmission cycles and to trace the origins of (re)emerging cases in areas under vector or disease surveillance. Conventional parasitological methods lack sensitivity and molecular approaches, such as the polymerase chain reaction may fill in this gap, provided that a standardized method can be developed and validated.

We have developed two duplex Real Time PCR assays for sensitive detection of *T. cruzi* satellite or minicircle repetitive sequences in blood samples from mammal reservoirs, incorporating an internal amplification standard that allows distinction of false negative PCR findings due to inadequate conditions of storage and transport of samples, DNA degradation during nucleic acid purification and/or inhibition of PCR by interfering substances present in the sample. The housekeeping gene that encodes the interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) has been selected as internal standard, because it is highly conserved among all mammal species and its usefulness as a DNA integrity control was previously reported in a conventional PCR protocol. Based on the alignment of the IRBP sequence available for several domestic and wild reservoir species, we designed primers and a TaqMan probe to a highly conserved region. The analytical sensitivity was 0.01 par. eq/mL and 0.1 par.eq/mL for satDNA/IRBP duplex and kDNA/IRBP duplex, respectively, as tested with two series of canine blood spiked with known concentrations of Silvio X10 (Tc I) and CL-Brener (Tc VI) cultured epimastigotes. The assays were evaluated in DNA extracts from blood samples of 87 wild and 147 domestic animals. Our DNA integrity control worked well for wild reservoir species including small rodents (*Akodon toba*, *Galea leucoblephara*, *Rattus rattus*), opossums (*Didelphis virginiana*, *D. marsupialis*), bats (*Tadarida brasiliensis*, *Promops nasutus*, *Desmodus rotundus*) and other mammals such as the skunk, viscacha, wildcat, brown brocket deer, hare and Pampas fox. Mean Ct values for IRBP amplification varied among species between 24 and 33. For domestic reservoirs, IRBP amplified in dog, cat, cow, sheep, goat, horse and mule specimens with mean Ct values between 23 and 25. In *T. cruzi* infected cases the assays allowed quantification of parasitic loads.

Our results promote the use of these methods for rapid and accurate screening of *T. cruzi* infection in different species of reservoirs.

7 - Estructura genética y detección de migrantes de *Triatoma infestans* (Reduviidae: Hemiptera) en el Chaco argentino

Piccinali R.V.1,2, Gaspe M.S.1,2, Gürtler R.E.1,2

1 Laboratorio de Eco-Epidemiología. Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

2 IEGEBA Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires, CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Comprender la estructura genética de *Triatoma infestans* permite delimitar poblaciones y procesos de migración. Esta información es muy valiosa para estudiar la reinfestación de las casas tras los rociados con insecticidas e implementar estrategias de control vectorial. La problemática toma especial relevancia en la ecorregión del Gran Chaco, donde el control de la especie resulta muy difícil. Un estudio de morfometría geométrica de alas de *T. infestans* mostró la presencia de dos grupos fenotípicos (Este y Oeste) en un área rural bien definida del municipio de Pampa del Indio, Chaco, Argentina, sin rociados masivos con insecticidas durante 12 años. Estos grupos presentaron, a su vez, patrones diferentes de reinfestación. El objetivo de este trabajo es investigar la estructura genética utilizando los mismos insectos que para la morfometría geométrica. Se genotiparon 10 loci microsatélites en 303 insectos provenientes de 11 sitios domésticos o peridomésticos de 8 parajes rurales. Se caracterizó la estructura genética mediante los estadísticos F_{ST} y un análisis bayesiano. Se realizó una prueba de Mantel para ver si las distancias genéticas y geográficas se encontraban correlacionadas y un análisis de migrantes. Todos los F_{ST} de a pares de sitios resultaron significativos y muy variables (0,035 – 0,263). La prueba de Mantel fue no significativa. El análisis bayesiano

mostró 3 grupos genéticos, uno formado por un sitio, otro por dos, y el tercero por el resto. Dos sitios mostraron altos niveles de mezcla entre dos grupos genéticos. El grupo genético 1 se encontró exclusivamente en el grupo fenotípico Este; el 2 en el Oeste, aunque en proporciones variables en cada sitio, y el 3 en el Este y Oeste. El análisis anidado del grupo 3 mostró una subdivisión en un grupo mayoritario en el Oeste y otro en el Este. Se detectaron siete migrantes, 4 machos y 3 hembras, colectados tanto en sitios domésticos como peridomésticos. Las posibles fuentes fueron parajes aledaños o el mismo paraje, salvo en un caso. Los resultados muestran una fuerte estructura genética en parajes rurales sin rociados durante 12 años. Esta estructura no se ajusta a un patrón de aislamiento por distancia y coincide con los resultados de morfometría, dándoles una mayor resolución. Los eventos de migración ocurrirían, en general, dentro de un paraje o entre parajes vecinos, en sitios domésticos y peridomésticos y en ambos sexos. Estos resultados son relevantes para las estrategias de control vectorial.

9 - Geolocalización de los genotipos de *Trypanosoma cruzi* detectados en infectados crónicos del noreste argentino. Asociación con variables bioclimáticas

Bizai M.A.1, Peralta R.2, Olivera L.V.1, Vallejos Y.2, Manattini S.3, Dalla Costa J.3, Arias E.1, Sione W.4, Fabbro D.1, Diez C.2.

1 CIEN Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina

2 Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología Aplicadas, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina

3 Hospital Central de Reconquista “Olga Stucky de Rizzi”, Reconquista, Santa Fe, Argentina

4 CEREGEO Centro Regional de Geomática, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de Entre Ríos, Diamante, Entre Ríos

Las variaciones climáticas y otras condiciones ambientales suelen ejercer un efecto importante en las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores. En la enfermedad de Chagas, éstas podrían influir en la relación parásito-hospedador al alterar el comportamiento del hospedador, la biología del vector y/o la tasa de desarrollo del parásito dentro del vector. Por lo tanto, los factores climáticos podrían determinar dónde puede persistir una especie de vector y muchas especies hospedadoras, haciéndose extensivo a las variantes genéticas de los patógenos que los infectan. Hasta hace unos años, la principal vía de transmisión de la enfermedad de Chagas en Argentina ha sido la vectorial, a través del *Triatoma infestans*, distribuido en múltiples regiones endémicas. Genotípicamente, las principales unidades discretas de tipificación (UDT) de *Trypanosoma cruzi* halladas en humanos y vectores en Argentina son las UDT TcV y TcVI.

Este trabajo tuvo como objetivo analizar la asociación entre la geolocalización de las UDT TcV y TcVI de *T. cruzi* detectadas en infectados crónicos del noreste argentino y variables bioclimáticas relacionadas con temperatura y precipitaciones.

Se realizó la genotipificación de *T. cruzi* (MLS-PCR) en muestras de sangre de 98 individuos con infección crónica procedentes de 56 localidades ubicadas dentro de las regiones Chaqueña y Espinal. Se detectaron 21,4 % de infecciones mixtas, mayoritariamente TcV+TcVI. En el resto de las muestras se detectó 45,9 % de TcVI, 28,6 % de TcV, 3,1 % de TcI y 1 % de TcII. Con los datos de las localidades de procedencia de los individuos estudiados, se realizó la geolocalización de las UDT detectadas utilizando el programa Qgis. En base al análisis de la distribución espacial de los datos, TcV se detectó con mayor frecuencia en latitudes más bajas. Respecto a la relación con las 19 variables bioclimáticas estudiadas (WordClim versión 2), se encontró asociación entre los genotipos TcV y TcVI y variables como temperatura media anual, estacionalidad de la temperatura y rango anual de temperatura. También se encontró asociación con algunos factores climáticos limitantes para el desarrollo, como temperaturas mínimas del mes más frío y medias de los cuatrimestres más secos, más cálidos y más fríos. En todos los casos, TcV se asoció de manera significativa a localidades con mayor temperatura media. Esto podría indicar una adaptación diferente de estas variantes genéticas de *T. cruzi* a las variaciones ambientales.

11 - Oportunidades de prevención de la leishmaniasis tegumentaria en el norte de Argentina

Gil J.F.1,3, Quipildor M.1,2, Copa G.N.1, Cajal S.P.1, Juarez M.1, Cimino R.O.1, Krolewiecki A.J.1

1 IIET Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicale, Ciudad de Oran, Salta, Argentina

2 Hospital San Vicente de Paul, Ciudad de Oran, Salta, Argentina

3 INENCO-CONICET Instituto de Investigaciones en Energía no Convencional, Sector Salud y Ambiente, Ciudad de Salta, Salta, Argentina

La conjunción de factores ecológicos, socioeconómicos y demográficos que confluyen en las zonas endémicas de la leishmaniasis tegumentaria (LT) en América Latina, hacen que su prevención y control sean un problema de difícil resolución. El objetivo de este trabajo fue analizar la variación mensual de los casos de LT, su correlación con la temperatura y precipitaciones y el desfase entre la fecha de aparición de la lesión (FAL) y la fecha de diagnóstico (FD), todo esto con fin de explorar posibles medidas preventivas. Se analizaron 1666 casos del norte de Salta diagnosticados mediante frotis y la reacción de Montenegro en el IIET de Oran, en el periodo 1990-2009. Se compararon las medias de casos incidentes mensuales usando modelos lineales mixtos generalizados; las fechas de estos casos fueron obtenidas restando la FD a la FAL. Se realizó también una correlación cruzada entre los casos mensuales prevalentes frente a las temperaturas (máx y mín) y las precipitaciones medias. El desfase entre la FAL y la FD fue de 1 mes en el 60 %, 2 meses en el 19 % y de 3 meses en el 8 % de los casos de LT. El mes con la mayor media de casos fue julio con 9,40 ($p < 0,05$). Se encontró una correlación significativa con un retraso temporal de 5-7 meses para la $T^{\circ}\text{min}$ y 6-8 meses para la $T^{\circ}\text{max}$ ($p < 0,05$). El desfase temporal encontrado entre los casos y la T° es mayor que la observada por otros autores entre la abundancia de flebotomos y la T° . Esto nos lleva a deducir que, si le descontáramos a la FAL, la FD y el tiempo de incubación (entre 2 semanas y varios meses), la mayor cantidad de casos se deberían haber expuesto al parásito en el pico de abundancia que se observa en otoño. Esto nos muestra que cuando se observan varios casos agrupados a modo de brote, el riesgo de transmisión puede ya no existir. Consideramos que no podemos descartar que aun circulen flebotomos infectados en el lugar por lo cual recomendamos que ante una situación de varios casos agrupados, se debe monitorear los vectores (y el parásito en el vector) y si son encontrados hay que considerar una fumigación preventiva. Además, dado que en el norte de Salta existen barrios colindantes a vegetación primaria, se debería realizar una estratificación de riesgo y realizar un rociado con poder residual justo antes del incremento esperado de la abundancia de flebotomos y renovar los rociados semestralmente, todo esto inserto dentro de un plan integrado de prevención, control y monitoreo.

13 - Toxocariosis humana en el NEA: Relevamiento epidemiológico 1998-2018

López M. de los A.1, Bojanich M.V.2

1 IMR-UNNE Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina

2 FACENA-UNNE Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

La Toxocariosis humana es una infección accidental del hombre por nematodos del género *Toxocara*, *T. canis* y *T. cati*, parásitos del perro y el gato. El hombre se infecta al ingerir huevos infectantes a partir del suelo contaminado. El objetivo de este trabajo fue comparar seroprevalencias halladas en estudios previos de este equipo de investigación en distintas poblaciones del NEA y vincularlas con condiciones climáticas y socioambientales.

Se recabaron datos de estudios realizados entre 1998 y 2018, en diversas poblaciones de las provincias de Chaco, Corrientes y Santa Fe. Se analizaron las variables edad, área de residencia, condiciones climáticas,

nivel socioeconómico, características de la vivienda, acceso al agua potable y contacto con animales en el hogar. Se investigó la presencia de anticuerpos anti-*T. canis* por ELISA en fase sólida utilizando antígeno de excreción/secreción y anti IgG humana marcada con peroxidasa.

Se estudiaron en total 1707 individuos. Las seroprevalencias globales en cada población fueron: Niños de áreas urbanas de Resistencia (37,9 %; N=206); Población adulta sana de Resistencia (38,9 %; N=355); Niños de áreas urbanas carenciadas de Corrientes (61,5 %; N=273); Comunidades aborígenes rurales y periurbanas de Chaco y Santa Fe (67,3 %; N=245); Comunidad rural de Río Muerto (Chaco) (12,9 %; N=155); Poblaciones rurales de la Provincia de Corrientes (48,8 %; N=473). En niños, el mayor factor de riesgo fue el contacto con perros, seguido del hábito de geofagia. En poblaciones urbanas el principal factor de riesgo fue la vivienda sobre calle de tierra, y la prevalencia fue mayor en niños. En poblaciones rurales, un factor determinante fue el clima, encontrándose los valores más bajos en zonas áridas con escasez de agua. Las comunidades aborígenes mostraron altos valores de seropositividad, mayor en los asentamientos periurbanos. A lo largo de 20 años se estudió la situación epidemiológica de la Toxocariosis humana, infección que se asocia a dos factores fundamentales: las condiciones climáticas favorables para el desarrollo del huevo infectante (calor y humedad), y a las pobres condiciones sociosanitarias de vida. Así, las poblaciones más expuestas son los asentamientos urbanos carenciados siendo los niños los más vulnerables, y en menor medida las poblaciones rurales, favorecidas por una mayor extensión del terreno. Este estado de situación hace necesaria la implementación de estrategias de intervención y medidas sanitarias de control.

15 - Chagas Congénito: Relevamiento del diagnóstico y situación clínico epidemiológica del binomio madre infectada - hijo en centros de salud de Santa Fe

Suasnábar S.1, Olivera L.V.1, Arias E.1, Bizai M.L.1, Nepote M.2, Fabbro D.1

1 Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales (C.I.E.N). Facultad de Bioq. y Cs. Biológicas-UNL
2 Programa Provincial de Chagas-Gobierno de Santa Fe.

Actualmente la forma más frecuente de adquirir la infección por *T. cruzi* es la transplacentaria. Existe retraso en el diagnóstico de los hijos de madres infectadas a pesar de las normas para su seguimiento, sencillas y aplicables.

Se trabajó con los Centros de Atención Primaria de la Salud (CAPS) de Santa Fe y alrededores con el objetivo de: evaluar el estado clínico epidemiológico del binomio madre seropositiva-hijo biológico; completar diagnóstico y administrar tratamiento en niños infectados.

Se revisaron los registros de madres seropositivas para Chagas a través del Sistema de Vigilancia de Laboratorios. En 9 CAPS se citó a las mujeres con sus hijos para control clínico-electrocardiográfico y serológico. Además se recabaron datos de relevancia epidemiológica para la infección chagásica mediante encuesta semiestructurada.

Se estudiaron 23 madres y 60 hijos. La edad de las madres fue 34 años \pm 8,8. Residieron en área endémica 48 %; refirieron madre infectada 48 %, madre negativa 13 % y 39 % desconocían. El 65 % de las madres se enteró de su infección durante el embarazo.

Ninguna de las madres analizadas presentó alteraciones compatibles con cardiopatía chagásica.

Tuvieron control previo 58 % (35/60) de los hijos: 91 % (32/35) fueron negativos, edad de diagnóstico 8,5 \pm 5,7 años; 2 gemelas seropositivas a los 22 meses y 1 niña de 6 meses con infección no confirmada, ELISA (+) y HAI (-), recibieron tratamiento con benznidazol.

Se realizó diagnóstico serológico en 42 % (25/60) de los hijos mayores de 1 año no controlados: 92 % (23/25) fueron negativos, edad de diagnóstico 8,4 \pm 6,8 años y 2 niñas positivas (3 y 8 años) recibieron tratamiento con Nifurtimox.

Incidencia de transmisión transplacentaria: 6,8 % (4/59).

Las 4 niñas infectadas no presentaron signos clínicos de infección. Sus madres tenían como único antecedente la serología materna positiva.

43 % de las madres (10/23) no migraron ni recibieron transfusiones pero sus madres estaban infectadas.

Estos resultados revelan: diagnóstico tardío en las madres (65 % durante el embarazo) y en los hijos (8,5 y

8,4 años de edad); desconocimiento en profesionales de la Salud del algoritmo para el diagnóstico de Chagas congénito en menores de un año. Se destaca la persistencia de la transmisión congénita en grupos familiares. Se requieren estrategias sanitarias para favorecer la detección de mujeres infectadas antes del embarazo y promover el seguimiento de todos sus hijos para lograr diagnóstico temprano y tratamiento oportuno.

17 - Identificación de criaderos y presencia de *Schistosoma mansoni* en el género *Biomphalaria* en colecciones hídricas en la Provincia de Corrientes

Rea M.J.F.1,2, Borda C.E.2

1 Cátedra de Parasitología, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina

2 CENPETROP Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina

La esquistosomiasis mansoni es una enfermedad parasitaria grave, cuyo agente etiológico es el *Schistosoma mansoni*. Sus hospederos intermediarios son caracoles del género *Biomphalaria*, encontrados en colecciones hídricas.

En la Argentina no hay casos autóctonos de la enfermedad, pero son encontradas diversas fuentes hídricas que sirven de hábitat para varias especies. Estas condiciones representan un ambiente favorable para la transmisión de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia e infección con *S. mansoni* de caracoles *Biomphalaria* en colecciones hídricas en el este de la provincia de Corrientes.

La captura de moluscos se realizó en 2016 y 2017, en aguas superficiales naturales y artificiales, con un cucharón, raspando la vegetación sumergida localizada en las márgenes y en el fondo de los criaderos.

En el CENPETROP fueron examinados por exposición a la luz para identificar la presencia de *S. mansoni*. Los moluscos fueron identificados con claves específicas.

Se examinaron 21 colecciones hídricas, en tres Departamentos de Corrientes: Sauce, Monte Caseros y Santo Tomé.

En ocho hábitats se capturaron 269 caracoles. El 81,7 % fue identificado como *B. tenagophila* y 18,2 % eran *B. straminea*.

Cinco eran artificiales: un embalse, tres canales y un bebedero de cemento del ganado. Los tres criaderos naturales: dos arroyos y una laguna.

B. tenagophila se colectó en un canal, un embalse y un arroyo de Sauce y en dos canales y un bebedero de Monte Caseros. El mayor número, 85 caracoles, se colectó en el bebedero artificial.

Se colectaron *B. straminea* en una laguna y un arroyo de Santo Tomé.

Estas colecciones hídricas son utilizadas por familias que viven en el entorno para el uso doméstico en general y en la agricultura.

Todos los moluscos fueron negativos para *S. mansoni*.

Estas especies, *B. tenagophila* y *B. straminea*, son susceptibles para el desarrollo de *S. mansoni* y responsables por muchos focos en el sudeste y el nordeste del Brasil, respectivamente.

Las investigaciones realizadas probaron que la zona estudiada es positiva para el trasmisor de la esquistosomiasis. Aunque la presencia de caracoles naturalmente susceptibles es uno de los factores determinantes en la transmisión, actualmente, no existen notificaciones de enfermedad humana autóctona en Argentina.

La identificación de lugares con presencia de esos moluscos revela el riesgo de la introducción de la esquistosomiasis en esas localidades.

19 - Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en la Ciudad de Chascomús

Rivera E.M.1, Sanchez P.2, Gomez E.3, Lavayén S.N.4, Silva A.P.4, Clemente M.2, Angel S.O.1

- 1 Laboratorio de Parasitología Molecular, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) CONICET-Universidad Nacional de General San Martín
2 Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) CONICET-Universidad Nacional de General San Martín
3 Hospital Municipal San Vicente de Paul, Chascomús- Provincia de Buenos Aires.
4 Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan H. Jara, Mar del Plata- Argentina

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que infecta a una amplia variedad de animales de sangre caliente, incluidos el hombre. La infección con el parásito *T. gondii*, el agente causal de la toxoplasmosis, es muy común en humanos en todo el mundo, siendo la ingesta de carne cruda o mal cocida, frutas, vegetales y agua contaminadas con quistes las principales vías de ingreso. Se considera que la seroprevalencia a nivel mundial se encuentra entre el 30-50 % pero estos valores varían de acuerdo con la región, diferencias climáticas, dieta e higiene. En Argentina, se han encontrado valores de prevalencia de 39,7 % en la ciudad de Jujuy, 28,5 % en Resistencia, 23,8 % en la provincia del Chaco y 42,2 % en la provincia de Santa Fe. Más recientemente, en un estudio realizado por el Hospital Alemán de la ciudad de Buenos Aires se pudo observar como disminuyó la prevalencia de un 67 % en 1967 hasta 21,1 % en 2017. El objetivo general del presente trabajo fue determinar la prevalencia de anticuerpos anti- *T. gondii* en mujeres embarazadas en la ciudad de Chascomús y su asociación con hábitos de la población. Se obtuvieron datos de serología de 983 pacientes que realizaron sus controles de embarazo en el Hospital Municipal San Vicente de Paul. La prevalencia observada fue del 34,28 % (IC 95: 31,38 – 37,25), mediante la técnica de hemaglutinación indirecta (HAI). Se analizaron factores de riesgos asociados a la infección por *T. gondii*. Los mismos son: Residencia, urbana vs urbana/rural y urbana vs rural, *O.D*: 1.05 (0.56-1.96) y 0.45 (0.11-1.83) respectivamente. Fuente de agua en el hogar, red vs pozo, *OD*: 0.70 (0.41-1.20). Cría de animales, *OD*: 1.29 (0.75-2.24). Presencia de gato, *O.D*: 0.78 (0.45-1.38). Realización de trabajo de jardinería, *O.D*: 1.03 (0.48-2.20). Consumo de carne de cerdo, de oveja y embutidos con su frecuencia. Carne de cerdo *O.D*: 1.32 (0.78-2.22), una vez por semana 0.93 (0.40-2.17), más de una vez 1.96 (0.85-4.52) y menos de una vez 1.31 (0.75-2.30). Carne de oveja *O.D*: 1.05 (0.65-1.71), una vez por semana 0.99 (0.36-2.78), más de una vez 1.29 (0.55-3.04) y menos de una vez 1.01 (0.60-1.71). Embutidos *O.D*: 0.68 (0.37-1.24), una vez por semana 0.73 (0.34-1.58), más de una vez 1.11 (0.52-2.39) y menos de una vez 0.52 (0.27-1.02). En conclusión, la prevalencia del 34,28 % fue mayor a la observada en la ciudad de Buenos Aires (21,1 %) y no se encontró una asociación entre los factores de riesgo analizados y la infección por *T. gondii*.

Inmunología

1 - *Trypanosoma cruzi* infection in human placentas *in vitro ex vivo* induces the production of pro-inflammatory cytokines

Benizio E.1,2,3, Triquell M.F.1,3, Moreira-Espinoza M.J.1,2, Mezzano L.1, Piegari M.1, Díaz-Luján C.1,3, Fretes R.1,2,3

1 Cátedra e Instituto de Biología Celular, Histología y Embriología, FCM-UNC

2 INICSA (CONICET- UNC)

3 Medicina, Univ. Nac. Villa María

Congenital Chagas has become a global health problem due to the migration of chagasic mothers from endemic to non-endemic countries. Pregnancy is a special situation because the mother has a change in its immune system, with a predominance of Th2 cytokines. But, chagasic mothers with low incidence of transmission to the fetus have a predominance of pro-inflammatory Th1 cytokines. It has been shown that the placenta participates in the immune response and exert a deleterious effect on the parasite cell. Our laboratory has shown that, during placental tissue infection, there are changes in the expression of immunoregulatory cytokines and matrix metalloproteinase-9.

Therefore, we propose that during the phase of invasion by trypomastigotes and differentiation towards

amastigotes, the chorionic villi modify the expression of cytokines that could be related to infection or placental functionality.

Placental villi explants were co-cultured for 4 and 24 hours with 1×10^5 trypomastigotes (Tulahuen strains) or without parasites (control). *T. cruzi* invasion was quantified by qPCR. Immunohistochemical analysis of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ and IL-10 expression were performed. In culture supernatant: quantification of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ and IL-10 by ELISA were done.

T. cruzi invasion at 4 and 24 hours post-infection was verified. Production of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ and $\text{IL-1}\beta$ in syncytiotrophoblast and stromal cells of infected explants was higher than noninfected ($p < 0.05$). The same pattern was seen in the culture supernatants except for $\text{IFN}\gamma$ that did not have significant differences with the control. Both in culture supernatant and tissue, the presence of the parasite produced a significant decrease in IL-10 ($p < 0.05$).

These results show that during the first 24hs of interaction placental barrier-*T. cruzi*, there was an increased production of pro-inflammatory Th1 cytokines and in turn, decrease the production of anti-inflammatory cytokines, but that could represent functional adaptations of the placental tissue because infection was verified. These results coincide with what was seen in peripheral blood studies of chagasic mothers, suggesting that the placental barrier contributes to that cytokine profile.

3 - Avances en el estudio de células con fenotipo inmunoregulatorio afectadas por el candidato vacunal TSf-ISPA contra el *Trypanosoma cruzi*

Roldán C.1, Abaca D.1, Prochetto E.1, Lupi G.1, Bontempi I.1,2, González L.N.1, Marcipar I.1,2, Cabrera G.1.2.

1 Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

2 Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral.

Introducción: Previamente mostramos que la vacunación con una fracción de la proteína trans-sialidasa (TSf) formulada con el adyuvante liposomal ISPA confiere protección ante un desafío con *T. cruzi*. Dicho tratamiento disminuyó células CD11b+GR-1+ , (fenotipo de células supresoras de origen mielóide, MDSC) a la vez que aumentó el número de células CD4+Foxp3+ regulatorias (Treg) en el bazo de los animales vacunados e infectados.

Objetivo: Estudiar la posible influencia de las células MDSC sobre las células Treg, la parasitemia y la sobrevida en ratones inmunizados con TSf-ISPA e infectados con *T. cruzi*.

Materiales y métodos: Se inmunizaron ratones BALB/c con 3 dosis subcutáneas de TSf-ISPA cada 15 días, (PBS grupo control). Quince días luego de la última dosis, los ratones se desafiaron con 900 tripomastigotes de la cepa Tulahuen. Las MDSC se depletaron con una dosis única de 50mg/kg de 5 fluorouracilo (5FU) al día 15 post-infección (p.i). La parasitemia se midió hasta los 20 días p.i y la sobrevida hasta los 21 días p.i, cuando se analizó por citometría de flujo (FACS) la depleción de las MDSC y alteraciones de las Treg.

Resultados: Se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a parasitemia y sobrevida entre los grupos en estudio. Por ejemplo: a los 20 días p.i los ratones vacunados, infectados y tratados con 5FU (TSf-ISPA-Tc \pm 5FU) presentaron una menor parasitemia en comparación con los ratones control no vacunados, infectados y tratados con 5FU (PBS-Tc \pm 5FU) ($p < 0,05$, Mann-Whitney). Además, el grupo TSf-ISPA-Tc \pm 5FU mantuvo la protección contra el *T. cruzi* en comparación con el grupo control (PBS-Tc \pm 5FU), que al día 21 p.i presentó una mortalidad del 100 % ($p < 0,05$, Logrank test)

De interés, entre los grupos vacunados, a los 21 días p.i. se corroboró una disminución del porcentaje y número de MDSC en el grupo TSf-ISPA-Tc \pm 5FU vs TSf-ISPA-Tc \pm sin 5FU ($p < 0,05$). Paralelamente, se observó un aumento en la expresión de Foxp3+ en células CD4+ y del porcentaje y número de las células CD4+Foxp3+ en el bazo de los ratones TSf-ISPA-Tc \pm 5FU vs los ratones TSf-ISPA-Tc \pm sin 5FU ($p < 0,05$, Mann-Whitney).

Conclusión: Estos resultados muestran que, si bien la depleción de MDSC aumenta la mortalidad de los

ratones control (no vacunados) ante un desafío con *T. cruzi*, los ratones vacunados con TSf-ISPA tolerarían esta reducción sin aumentar la parasitemia ni perder capacidad protectora, correlacionando con un aumento posiblemente compensatorio de las células Treg Foxp3+.

5 - Caracterización de poblaciones de linfocitos T con especificidad por epítopes de *Trypanosoma cruzi* identificados mediante predicción bioinformática

Acevedo G.R.1, Pérez Perri L.A.1, Juiz N.A.1, Girard M.C.1, Fernández M.2, Hernández Y.2, Chadi R.3, Nielsen M.4, Gómez K.A.1

1 Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET), Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 Instituto Nacional de Parasitología “Dr Mario Fatała Chaben” (INP-ANLIS), Ciudad de Buenos Aires, Argentina

3 Hospital General de Agudos “Dr. Ignacio Pirovano”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

4 Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-UNSAM), San Martín, Buenos Aires, Argentina

En un trabajo previo identificamos, mediante predicción bioinformática y validación *in vitro*, 7 secuencias peptídicas de *T. cruzi* que contienen epítopes activadores de secreción de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Esta respuesta mostró indicios de restricción por haplotipo de HLA expresado por los pacientes. Los alelos de HLA utilizados en la predicción fueron seleccionados en función de su prevalencia en latinoamérica (HLA-A y -B) y mundial (HLA-DRB1).

En esta nueva etapa de nuestra investigación, caracterizamos por secuenciación el locus de HLA en los 50 pacientes de la cohorte (26 asintomáticos, 25 con cardiopatía chagásica) y comparamos los resultados con la lista de variantes utilizada para la predicción original. Los resultados pusieron de manifiesto discordancias entre las variantes de prevalencia regional y las encontradas en la muestra poblacional, resaltando la necesidad de implementar este tipo de caracterización en la población endémica para este mal. No obstante, solo 1/51 pacientes no expresa ningún alelo de la lista.

La información de la secuenciación, combinada con los resultados de ELISPOT para IFN- γ obtenidos en la etapa anterior de este proyecto, se utilizó para sintetizar multímeros de HLA-A*31:01 cargados con el epítome mínimo predicho para el péptido #47 (cruzipaina) y de HLA-DRB1*07:01 con el péptido #38 (transialidasa putativa). Estas moléculas fueron utilizadas para caracterizar por citometría de flujo la frecuencia y fenotipo de las células epítome-específicas en las muestras de pacientes. Los resultados preliminares arrojaron frecuencias de células específicas entre 0.09 y 0.46% de los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺. Además, el análisis de marcadores fenotípicos mostró un fenotipo de células de memoria central y efectora en las células T CD4⁺ específicas para el péptido #38. Por su parte, los linfocitos T CD8⁺, específicos para el epítome mínimo del péptido #47 mostraron predominantemente diferenciación terminal en el análisis *ex vivo*. No obstante, la estimulación *in vitro* por 1 semana de CMN del paciente con el péptido en cuestión reveló un enriquecimiento en células específicas con fenotipo de memoria efectora.

En conclusión, a pesar de las falencias en la selección de alelos expuestas por la tipificación de HLA en la muestra poblacional, nuestro enfoque predictivo fue exitoso en identificar epítopes capaces de activar una respuesta linfocitaria T de memoria funcional.

7 - Estudio de los marcadores CD24 y CD38 en células B totales y células B10 en sangre periférica de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica

Girard M.C.1, Acevedo G.R.1, Ossowski M.S.1, Fernández M.2, Hernández-Vazquez Y.2, Chadi R.3, Gómez K.A.1

1 Laboratorio de Inmunología de las Infecciones por Tripanosomátidos. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET), Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

2 Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

3 Hospital Nacional de Agudos “Dr. Ignacio Pirovano”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

En sangre periférica humana, todas las células del linaje B (CD19⁺) co-expresan los marcadores de superficie CD24 y CD38, los cuales permiten diferenciar tres poblaciones fenotípicas: CD19⁺CD24^{high}CD38^{low} (memoria), CD19⁺CD24^{int}CD38^{int} (vírgenes), CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} (transicionales). Además, dentro de la población de células B, se puede identificar una subpoblación con capacidad de regular negativamente la respuesta inmune a través de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10. A pesar que estas células, denominadas en general como células B regulatorias (Bregs) constituyen menos del 10 % de las células B, han sido muy estudiadas en la última década por su contribución en diversas patologías autoinmunes e infecciosas. La dificultad para encontrar marcadores fenotípicos que identifiquen de forma inequívoca a esta población, condujo a que la producción de IL-10 sea la característica funcional empleada para diferenciarlas, denominándolas células B10. Dado que el perfil fenotípico de las células B y de las células B10 en los pacientes con Enfermedad de Chagas se encuentra muy poco estudiado, nuestro objetivo fue evaluar la frecuencia y fenotipo de estas poblaciones *ex vivo* de acuerdo a la expresión de los marcadores CD24 y CD38 en sangre periférica de pacientes con Chagas crónico (asintomáticos o con cardiopatía) e individuos no infectados. Para ello, se incubaron células mononucleares de sangre periférica con PMA/Ionomicina + Brefeldina A durante 5 h y se marcaron para citometría de flujo. Los resultados mostraron una disminución en la frecuencia de células B de memoria y un aumento de las poblaciones vírgenes y transicionales en los pacientes con cardiopatía. Por otra parte, se observó un aumento de las células B10 en los pacientes asintomáticos y una disminución en aquellos con cardiopatía con respecto a los individuos no infectados. Adicionalmente, las células B10 presentan mayormente fenotipo de memoria tanto en los pacientes asintomáticos como en los individuos no infectados, mientras que en los pacientes con cardiopatía se distribuyen equitativamente entre las tres poblaciones fenotípicas. Estos resultados sugieren que la expresión de CD24, CD38 e IL-10 en las células B tiene relevancia en el contexto de la infección crónica con *T. cruzi*, lo que se evidencia por una respuesta diferencial en las distintas formas clínicas de la Enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas crónica, células B, Interleuquina-10.

9 - Inducción de mediadores inflamatorios cardiopatogénicos por efecto del antígeno GIPL de *Trypanosoma cruzi* y la citoquina MIF sobre endotelio vascular

Rigazio C.S.1, Penas F.N.2, Goren N.B.2, Corral R.S.1

1 Servicio de Parasitología y Enfermedad de Chagas, Hospital Gutiérrez, IIMIPP Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas, CONICET-GCBA, Buenos Aires, Argentina.

2 INBIRS Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

La miocardiopatía por enfermedad de Chagas (MECh) cursa con una fisiopatología explicada por múltiples factores derivados del agente etiológico y del hospedador infectado. Si bien aún no se conocen plenamente, se ha comprobado el rol protagónico de la inflamación en los mecanismos cardiopatogénicos de la enfermedad. Entre los tipos celulares afectados se hallan las células del endotelio vascular y microvascular, dando origen a trastornos como vasculitis y tromboembolismos. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la acción del antígeno soluble glicosilinositolfosfolípido (GIPL) de *Trypanosoma cruzi* y la citoquina proinflamatoria MIF sobre células de endotelio microvascular humano (HMEC-1). En este contexto, células HMEC-1 fueron estimuladas conjuntamente con GIPL purificado (50 µg/ml) y MIF recombinante (50 ng/ml) durante 24 h. Se verificó por Western Blot (WB) un aumento en la expresión de sintasa inducible de NO (iNOS) y en la producción de NO en el sobrenadante medida por Griess ($p < 0,05$). Así mismo, registramos por ELISA un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de IL-1 β , sin observar inducción de TNF- α . Por otra parte,

analizamos señales intracelulares (vías de MAPK y NF κ B) implicadas en respuesta inflamatoria. Hallamos por WB fosforilación temprana de p38 ($p < 0,05$), no así JNK, a los 7 min post estímulo. Con respecto a la señal mediada por NF κ B, al cabo de 15 min se observó la translocación citoplasma-núcleo del factor de transcripción p65 y la degradación concomitante del inhibidor I κ B α citosólico ($p < 0,05$). Analizamos también la regulación de la vía del ácido araquidónico por GIPL+MIF. Mediante WB se comprobó sobreexpresión de ciclooxigenasa COX-2, acompañada por una producción exacerbada (4 veces mayor que el control) de tromboxano B2 determinada por ELISA en el sobrenadante a 48 h post estímulo. No se observaron diferencias en los niveles de prostaglandina E2. Para verificar la participación de la vía NF κ B en la inducción de COX-2, estudiamos en nuestro sistema el efecto de Fenofibrato (Fen, 150 μ M), conocido inhibidor de dicha señal regulatoria. El tratamiento con Fen por 24 h inhibió significativamente ($p < 0,05$) la expresión de COX-2 dependiente de NF κ B en respuesta a GIPL+MIF. Nuestros resultados sugieren que en endotelio vascular la acción conjunta de GIPL y MIF es capaz de activar mecanismos de respuesta inflamatoria con potencial de amplificación del daño causado en las células invadidas por *T. cruzi*.

11 - La infección experimental causada por *Trypanosoma cruzi* altera la homeostasis del tejido adiposo

González F.B.1, Pacini M.F.1, Villar S.R.1, Toneatto J.2, D'Attilio L.1, Bottasso O.A.1, Piwien-Pilipuk G.2, Pérez A.R.

1 IDICER-CONICET-UNR - Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario

2 IBYME- CONICET - Instituto de Biología y Medicina Experimental

El tejido adiposo (TA) es un tejido complejo, constituido no sólo por adipocitos, sino también por células de la fracción estromal vascular (CFEV), como linfocitos TCD4 y TCD8, macrófagos (Mf) y células dendríticas (CD). El metabolismo del TA es finamente regulado por los factores de transcripción nuclear PPARs, los que también están involucrados en la regulación de la inflamación. El TA es un órgano blanco de la infección por *T. cruzi* y se lo considera un reservorio del parásito durante la fase crónica, si bien la infección aguda experimental suele cursar con una notable pérdida del mismo. Por lo tanto decidimos evaluar cómo la infección afecta el patrón immuno-endócrino del TA epididimal (principal depósito en ratones machos) y las vías anabólicas y catabólicas. Para ello ratones C57BL/6 fueron infectados con 1000 parásitos de la cepa Tulahuén. Al día 17 pi (fase aguda) se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de enzimas lipolíticas y lipogénicas, adipocitocinas y PPARs, y se la comparó con lo observado en animales no infectados (Co) ($n=6$ /grupo). Asimismo se realizaron estudios *in vitro* utilizando adipocitos 3T3-L1. La proporción de linfocitos TCD4, TCD8, Mf y CDs está incrementada al día 17 pi en el TA (por citometría, $p < 0,05$ vs Co). A su vez, la expresión de TNF- α e IL-6 se incrementa en el tejido infectado, mientras que la de adiponectina y leptina disminuye ($p < 0,05$ vs Co en todos los casos). Además, tanto las vías lipolíticas como lipogénicas están afectadas, ya que la expresión de sus principales enzimas se encontró muy disminuida ($p < 0,05$ vs Co). Un patrón similar se observó en adipocitos aislados de TA infectado, como también en las células 3T3-L1 infectadas *in vitro* con *T. cruzi* o expuestas a plasmas derivados de animales infectados. Las CFEV (aisladas mediante tratamiento con colagenasa) presentan también un patrón inflamatorio (por ej. incremento de TNF- α). Asimismo, la expresión de PPAR- γ y PPAR- α se encontró fuertemente disminuida en el TA, en adipocitos aislados o en las CFEV procedentes de animales infectados ($p < 0,05$ vs Co, en todos los casos). Por otra parte, la administración *in vivo* de agonistas PPAR- γ (15DPGJ, Rosiglitazona) no revirtió la inhibición de este factor de transcripción. En conjunto, estos resultados demuestran que la infección aguda experimental por *T. cruzi* altera la homeostasis del TA, inclinándolo hacia un estado adverso, compatible con la atrofia de este tejido y la adquisición de un fenotipo inflamatorio.

13 - Lípidos de promastigotes de *Leishmania amazoniensis* y su efecto en la polarización de la respuesta macrófaga

Bott E.1, Penas F.N.2, Fernández Vásquez R.1, Carfagna I.1, Lammel E.M.1, Goren N.B.2, Belaunzarán M.L.1, Gimenez G.1.

1 IMPaM Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, Universidad de Buenos Aires-Conicet, Buenos Aires, Argentina.

2 INBIRS Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida, Universidad de Buenos Aires-Conicet, Buenos Aires, Argentina.

La Leishmaniosis es una parasitosis causada por varias especies del género *Leishmania* y que, junto con los mecanismos inmunes del hospedero, resulta en un amplio espectro de manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunopatológicas. En Argentina coexisten *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. guyanensis*, responsables de la Leishmaniosis humana cutánea. La infección es iniciada por los promastigotes metacíclicos, los cuales son inoculados en el huésped mamífero durante la alimentación del insecto vector. Este protozoario puede infectar diversos tipos celulares, siendo los macrófagos selectivamente invadidos para la replicación del parásito y el establecimiento de la infección. Los macrófagos constituyen un grupo muy heterogéneo con múltiples funciones, dando lugar a su clasificación en fenotipos M1 y M2 (activación clásica y alternativa respectivamente), los cuales representan dos extremos en el espectro de activación macrófaga. El control de la infección por este patógeno requiere la generación de una respuesta con perfil Th1, con activación clásica de macrófagos dependiente de IFN γ , aunque este microorganismo ha desarrollado diversas estrategias para evadir la respuesta inmune tales como la inducción de macrófagos M2, entre otros.

En el presente trabajo analizamos la composición de los lípidos de promastigotes de *L. amazoniensis* (PROa) por cromatografía en capa delgada y determinamos el efecto de los mismos sobre la activación macrófaga. Demostramos que PROa induce significativamente la formación de cuerpos lipídicos, marcadores de activación leucocitaria, así como la expresión de la enzima inflamatoria ciclooxigenasa-2. En relación a óxido nítrico, PROa indujo la liberación de este metabolito el cual es generado por la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS, marcador M1). Por otra parte, PROa indujo la expresión y actividad del marcador M2 Arginasa, enzima que compite por el mismo sustrato que iNOS. Evaluamos además por PCR en tiempo real otros marcadores a las 24hs post-estimulación con PROa, determinando niveles significativos de expresión de ARNm de FIZZ1 y YM1 (M2) y de TNF α (M1) con respecto al control; en relación a IL-10 (M2) no se observaron diferencias en los niveles de ARNm respecto al control. Estos resultados en conjunto sugieren que los lípidos totales de promastigotes de *L. amazoniensis* contribuyen a la modulación de la respuesta macrófaga. Financiado por UBA/CONICET

15 - Uso terapéutico del prototipo vacunal TSf-ISPA para prevenir lesiones cardíacas durante la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*

Prochetto E.1, Bontempi I.1,2, Rodeles L.2, Cabrera G.1,2, Pérez Ganeselli M.3, Gonzalez L.1, Lupi G.1, Vicco M.2, Marcipar I.1,2

1 Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.

2 Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.

3 Cátedra de Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes.

En más del 30 % de los pacientes infectados por el parásito *Trypanosoma cruzi*, luego de años o décadas de cursar una infección crónica, se presentan graves afecciones que pueden llevar a la muerte. Actualmente no existe un tratamiento efectivo para el Chagas crónico por lo que nuevos enfoques terapéuticos se necesitan en forma urgente. En particular, la inmunoterapia fue escasamente evaluada para este fin. Previamente nuestro

grupo describió una vacuna para uso profiláctico altamente protectora en un modelo murino, basada en un fragmento de la Trans-sialidasa formulada con adyuvante ISPA (TSf-ISPA). El objetivo de este trabajo es evaluar la utilidad terapéutica de dicha formulación y compararla con el desempeño obtenido con el parasiticida convencional Benznidazol (Bz). Para ello, ratones Balb/C fueron infectados con 10^6 parásitos *T. cruzi* de la cepa Sylvio y fueron divididos en los siguientes grupos: grupo Bz (tratados con Benznidazol), grupo TSf-ISPA (tratados con TSf-ISPA), grupo PBS (sin tratar) y grupo NI (grupo sin infectar, sin tratar). La vacuna terapéutica se aplicó en tres dosis subcutáneas a los días 120, 130 y 140 post infección (pi). El Bz fue administrado diariamente por vía oral a partir del día 130 pi, en una dosis de 100 mg/kg, durante un período de 30 días. A los días 98, 188 y 273 pi la parasitemia fue evaluada por PCR cualitativa y se midieron los niveles de anticuerpos específicos. Al día 273 pi se realizaron electrocardiogramas (ECG) de los distintos grupos, se midió la carga parasitaria en corazón por qPCR y se realizó un análisis histológico de dicho órgano. En todos los grupos infectados la presencia de *T. cruzi* fue hallada antes y después del tratamiento. La carga parasitaria en corazón al día 273 pi fue muy baja y no hubo diferencias entre los distintos grupos. El grupo PBS presentó un 100% de alteraciones en los ECG siendo este valor del 33,3% en el grupo TSf-ISPA. El grupo Bz en cambio, no logró revertir estas alteraciones (mostró un porcentaje del 75%). Esto se correlaciona con el análisis histológico, en donde el grupo TSf-ISPA presentó una tendencia a disminuir las lesiones cardíacas ($p=0,059$, Mann Whitney test) mientras que el grupo BZ exhibió niveles de daño similares al grupo PBS. Estos resultados promisorios muestran la factibilidad de utilizar vacunas terapéuticas durante la infección crónica por *T. cruzi* e indican la necesidad de estudiar los mecanismos inmunológicos que están involucrados en la protección obtenida.

17 - Enfermedad de chagas en inmunosuprimidos: evaluación de riesgo de infección activa y desarrollo de daño de órgano blanco.

Goncalves Valente C.M.1, Sierra M.2, Paravano L.2, Toledano A.3, Gallo Vaulet L.4, Agüero R.N.5, Bogdanovich E.2, Ruybal P.1, Risso M.G.1, Repetto S.A.1,2, Alba Soto C.D.1

1 Facultad de Medicina. IMPAM (UBA-CONICET).

2 División de Infectología, Hospital de Clínicas José de San Martín.

3 Departamento de Hemoterapia e Inmunohematología, Hospital de Clínicas José de San Martín.

4 Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas José de San Martín.

5 División de Cardiología, Hospital de Clínicas José de San Martín.

La infección activa (IA) en inmunocomprometidos se produce por primoinfección o reactivación de infección crónica por *T. cruzi* cuando se altera la inmunidad conduciendo a formas graves. Sin embargo la infección presenta una evolución crónica con un 30% de daño de órgano blanco. La patogenia de la miocardiopatía es compleja porque la persistencia parasitaria produce respuesta inflamatoria constante y desbalance de factores inmunológicos relevantes para el desarrollo de enfermedad. No existen reportes que asocien enfermedades autoinmunes o inmunosupresión con desarrollo de daño de órgano blanco, excepto en la reactivación.

Objetivo: Describir las características clínicas de una población de pacientes inmunocomprometidos en riesgo de infección activa por *T. cruzi* y la asociación de inmunosupresión con desarrollo de daño de órgano blanco.

Materiales y métodos:

Estudio transversal 01/2011-07/2018. Se analizaron datos demográficos, enfermedad base y drogas inmunosupresoras. Se definió pacientes (P) con infección crónica a aquellos seropositivos en dos técnicas diferentes e IA a la detección de *T. cruzi* mediante su visualización por método de Strout o presencia de ADN parasitario en sangre periférica por qPCR. Se realizó electrocardiograma, radiografía de tórax y ecocardiograma. Los P seropositivos se clasificaron como asintomáticos o con cardiopatía.

Resultados: Se incluyeron 41 P, media de edad 55 años (SD±11,6, rango 17-74), sexo femenino 58,5%. La procedencia fue Argentina 78%, Bolivia 17,1% y Paraguay 4,9%. El 39% presentaba patología autoinmune, enfermedad hematológica 24,4%, VIH 9,8%, trasplante autólogo de médula ósea 7,3%, trasplante renal (Txr) 19,5%. Veintinueve P (70,7%) recibían algún fármaco inmunosupresor. El 92,7% presentaban infección crónica. De ellos 15,8% con cardiopatía chagásica. Once P presentaron IA. Se diagnosticaron 8

reactivaciones y 3 primoinfecciones. El Strout fue positivo en 66,7% de las primoinfecciones y en 50% de reactivaciones, y la qPCR en el 100% de las IA. Durante la IA 8 P no presentaron síntomas, 2 encefalitis y 1 miocarditis. El micofenolato en Txr incrementó el riesgo de IA (Odds Ratio (OR) 1,67; $p < 0,05$); otras drogas no se asociaron a incremento ($p > 0,05$). La artritis reumatoidea (AR) se asoció con cardiopatía ($p < 0,05$, OR 6,7).

Conclusiones: El micofenolato favorece la IA por *T. cruzi*. Se observó una asociación entre presencia de AR y desarrollo de miocardiopatía.

21 - Anticuerpos específicos contra la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* en pacientes con infección crónica

Valera-Vera E.A.1, Gómez K.A.2, Concepción J.L.3, Cáceres A.J.3, Reigada C.1, Sayé M.1, Pereira C.1, Miranda M.1

1 Laboratorio de Parasitología Molecular, IDIM UBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 Laboratorio de Inmunología de las Infecciones por Tripanosomátidos, INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

3 Laboratorio de Enzimología de Prásitos, Departamento de Biología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Trypanosoma cruzi es el protozooario flagelado causante de la enfermedad de Chagas, un problema de salud de alta gravedad en nuestro continente. Para poder establecer una infección efectiva, el parásito posee distintos mecanismos para secretar sustancias que le permiten comunicarse con otras células, tanto de *T. cruzi* como del hospedador, y mucha de esa comunicación le permite modular y evadir la respuesta inmune.

La arginina quinasa (AK) de distintos invertebrados desencadena una respuesta inmune anafiláctica en mamíferos; al ser una enzima altamente conservada sería esperable que su homóloga en *T. cruzi* (TAK) tenga la misma capacidad, haciendo que la respuesta inmune se oriente hacia un perfil humoral que no es efectivo para controlar la infección con el parásito.

En este trabajo, hicimos ensayos de inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA) para buscar anticuerpos IgE e IgG específicos contra la TcAK en sueros de 50 pacientes de Venezuela con Chagas crónico, y 40 de Argentina (20 en fase asintomática y 20 que presentaban alteraciones cardíacas) usando como control sueros de personas no infectadas. En los sueros de ambos países, se encontraron diferencias significativas en las IgE específicas contra la TcAK entre los individuos no infectados y los pacientes, específicamente en aquellos con alteraciones cardíacas.

Para el caso de las IgG las diferencias se observaron solo en los sueros de individuos de Venezuela, lo cual puede deberse a las diferencias entre cepas regionales, de haplotipo de los pacientes o a la exposición diferencial a antígenos locales. Las IgG e IgE totales no específicas en los sueros argentinos no mostraron diferencias entre los distintos grupos, ni correlación con la señal específica anti-TcAK.

Estos resultados señalan que la TcAK induce linfocitos B a producir anticuerpos IgE que son ineficientes en el control de la infección, y podría incluso jugar un rol en el progreso de la enfermedad.

Diagnóstico y Tratamiento

1 - LAMP y Enfermedad de Chagas: detección de ADN de *T. cruzi* y monitoreo de tratamiento en brote por transmisión oral y reactivación por inmunocompromiso

Besuschio S.A.1, Muñoz-Calderón A.1, Fernández M.2,3, Alarcón de Noya B.4, Schijman A.G.1

1 INGEBI Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

2 Hospital de enfermedades infecciosas “Dr. Francisco J. Muñiz”, Argentina

3 Departamento de clínica, patología y tratamiento, Instituto Nacional de Parasitología Dr. M. Fatała Chabén. ANLIS Dr. C. G. Malbrán, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

4 Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

La amplificación isotérmica de ADN mediada por asas o LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) es una técnica molecular de alta sensibilidad, especificidad y sencilla implementación. Su uso para detectar ADN del *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la Enfermedad de Chagas (ECh), está bien documentado en la literatura científica, con parámetros analíticos comparables a la qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real) pero con requerimientos técnicos más simples. Se trabajó con casos que recibieron tratamiento tripanocida para los que la técnica LAMP no fue ensayada previamente: brote de ECh por transmisión oral del parásito (grupo A) y reactivación de la parasitosis por inmunocompromiso en pacientes con ECh crónica, coinfectados con HIV (grupo B). Con la técnica de qPCR como referencia (marcador de falla terapéutica en ensayos clínicos) se estudiaron muestras seriadas de seguimiento. El grupo A comprende 24 muestras de 10 pacientes pediátricos de Chichiriviche, Venezuela, por transmisión oral. Son muestras de sangre entera con EDTA como anticoagulante. El grupo B consta de 15 muestras con sangre entera/EDTA, sangre con buffer guanidina/EDTA y líquido cefalorraquídeo, de 4 pacientes adultos internados en el Hospital Dr. F Muñoz, CABA, Argentina. Se extrajo ADN de todas las muestras con el kit High Pure PCR Preparation Template (Roche) y la reacción de qPCR es la descrita por Duffy et al. 2013. La amplificación para el grupo A se realizó en un equipo ABI7500 (Applied Biosystems) y el grupo B se amplificó en un RotorGene (Qiagen). La reacción LAMP se detectó visualmente y con el fluorómetro Genie III (Optigene) usando los kits Loopamp™ *Trypanosoma cruzi* Detection Kit (Eiken Chemical Co.) Con las muestras de ambos grupos previas al inicio del tratamiento se calculó sensibilidad y especificidad clínica, tomando 24 muestras de individuos no infectados como grupo control. Los resultados fueron: sensibilidad 76%, intervalo de confianza IC 95%: 0,552-0,769 y especificidad 100% con IC 95%: 0,88-1,00. En el grupo A, sobre un total de 24 muestras, en 7 hubo resultados discordantes -qPCR positivo, LAMP negativo - coincidentes con cargas en el límite de detección para qPCR. En el grupo B, de un total de 15 muestras, 2 resultados fueron discordantes: qPCR positivo/LAMP negativo y viceversa. Estos valores ameritan profundizar el seguimiento cualitativo del tratamiento tripanocida por LAMP, un recurso accesible a la atención primaria de la salud.

3 - Compuestos híbridos de alcaloides con ácidos biliares con propiedades tripanocidas

Musikant D.1, Bernal D.1, Leverrier A.2, Palermo J.2, Edreira M.M.1,3

1 Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA

2 UMYMFOR - Departamento de Química Orgánica, FCEN - UBA

3 IQUIBICEN, Departamento de Química Biológica (CONICET-FCEN, UBA)

La Enfermedad de Chagas continúa siendo un problema global de salud. El Benznidazol y el Nifurtimox, las únicas drogas que tradicionalmente se utilizan para su tratamiento, poseen una mala performance en cuanto a su eficacia en la etapa crónica. Con el objetivo de encontrar nuevas moléculas con efecto terapéutico para la Enfermedad de Chagas, previamente describimos el efecto de compuestos híbridos de alcaloides con ácidos biliares sobre *T. brucei*, *L. mexicana mexicana* y *P. falciparum* (Leverrier, 2013) y más recientemente sobre tripomastigotes y amastigotes intracelulares. En el presente trabajo desarrollamos un modelo de infección *in vitro* para analizar los efectos en la liberación de tripomastigotes a los 6 días post infección luego del tratamiento con los compuestos puros o combinados con Benznidazol. Observamos que dos de los compuestos híbridos (Cinchonina + Ácido quenodeoxicólico libre o peracetilado) fueron capaces de disminuir significativamente la liberación de tripomastigotes a los 6 dpi ($p < 0,0001$) con un índice de selectividad menor o igual a 10. Sumado a esto, los compuestos disminuyen la liberación de tripomastigotes con concentraciones entre 5 y 8 veces menor que la de Benznidazol. Se estudio el efecto combinado de los compuestos con el Benznidazol aunque no se observó un efecto sinérgico para ninguna de las concentraciones ensayadas. La actividad antiparasitaria *in vitro* sobre las formas amastigote y tripomastigote de *T. cruzi* por parte de estos

dos compuestos abre nuevas posibilidades en la búsqueda de drogas alternativas a las usadas tradicionalmente en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

5 - Desarrollo de un test de inmunocaptura de IgM para el diagnóstico de Chagas congénito

Peverengo L.1, Rodeles L.2, Ballering G.3, Dámico I.3, Moscatelli G.3, Moroni S.3, Gonzalez N.3, Vicco M.2, Altchek J.3, Marcipar I.1,2

1 Laboratorio de Tecnología Inmunológica (Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas, Universidad Nacional del Litoral)– Santa Fe – Argentina.

2 Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas (Facultad de Ciencias Médicas –Universidad Nacional del Litoral)–Santa Fe– Argentina.

3 Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, IMIPP (Instituto multidisciplinario de Investigación en Patologías Pediátricas) CONICET-GCBA, Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCION: Dado que los anticuerpos IgM no atraviesan la membrana fetoplacentaria, la detección de IgM específica anti *T. cruzi* en el suero de los neonatos, podría utilizarse para diagnosticar infección vertical. Esta herramienta permitiría incrementar la detección de recién nacidos infectados evitando pérdidas de seguimiento. Hasta el momento, en los escasos trabajos en los que se ha evaluado esta determinación, los resultados fueron poco favorables pero en ninguno de ellos se había utilizado técnica de captura. En el presente estudio se optimizó un ELISA de captura de IgM para el diagnóstico de Chagas congénito y se evaluó con muestras problema.

METODOLOGÍA: Los anticuerpos IgM se capturaron en placas de ELISA con anticuerpos anti-IgM, detectándose los anticuerpos específicos mediante las proteínas recombinantes CP3+CP1+B13+P2 β . Para cada muestra se calculó el índice de densidad óptica (IDO), cociente entre el valor de DO obtenido y el punto de corte resultante de la media de las DO de controles negativos +2 DE. Se consideraron positivos los valores de IDO \geq 1, estimándose una zona gris (ZG) de \pm 10%. Se analizaron 46 muestras de suero de neonatos y niños pequeños (<1 año), hijos de mujeres infectadas con *T. cruzi* que concurrieron al Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez”. Fueron definidos como Infectados (Ch+, n=33) los niños que presentaban microtécnica parasitológica (+) en el primer control y/o PCR(+) con ELISA y HAI(+) a los 10 meses de edad. Ante negatividad de dichas pruebas, los niños se consideraron no infectados (Ch-, n=13). El desempeño diagnóstico se evaluó utilizando curva ROC, calculándose sensibilidad (S), especificidad (E) y área bajo la curva (AUC).

RESULTADOS: La técnica presentó una S de 69.2% y E de 93.9% con un AUC de 0.913 (0.805-1.02; $p \leq 0.001$). Fueron identificados 2 pacientes como falsos positivos (FP) aunque incluidos dentro de la ZG, mientras que 4 pacientes resultaron falsos negativos (FN), 2 de ellos en ZG. Considerando sólo los pacientes cuya muestra fue obtenida dentro de los primeros 15 días de vida (11 Ch- y 6 Ch+), la S fue de 83.3% y la E 91%, AUC de 0.894 (0.694-1.09; $p = 0.009$).

CONCLUSION: La técnica de ELISA de captura de IgM específica evaluada presentó un desempeño muy satisfactorio para el diagnóstico de Chagas congénito, especialmente en muestras provenientes de recién nacidos, principal objetivo de aplicación clínica. En virtud de validar estos resultados, se proyecta aumentar el tamaño muestral de este grupo.

7 - Validación de dos métodos automatizados para la detección de molecular de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre

Benatar A., Besuschio S.A., Schijman A.G.

INGEBI - Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Las técnicas moleculares, y particularmente la PCR han demostrado una enorme utilidad para la detección de *T. cruzi*. En diversos trabajos hemos venido utilizando una técnica validada para el seguimiento de pacientes transplantados, para la detección en pacientes congénitos, y para la validación de ensayos clínicos para el desarrollo de nuevos tratamientos. Con el objetivo de mejorar los parámetros de sensibilidad, especificidad, y el tiempo de procesamiento de muestras, decidimos validar dos métodos automatizados de extracción de ADN con partículas magnéticas, utilizando un robot comercial de la marca Thermo King Fisher duo. Los métodos 1 y 2 se realizaron utilizando los kits Thermo Magjet Whole Blood, y Allmag Blood Genomic DNA, respectivamente. El método manual de referencia (Ref) se realizó con Roche High Pure PCR preparation Kit.

Trabajamos con tres tipos de muestras: 1) paneles de sangre-EDTA contaminada artificialmente con concentraciones conocidas de epimastigotes de *T. cruzi*, congeladas a -20°C; 2) paneles de sangre + buffer Guanidina-EDTA (GEB) contaminada artificialmente con concentraciones conocidas de epimastigotes de *T. cruzi* conservadas a 4°C; 3) Muestras de sangre-EDTA de pacientes a ciego, congeladas a -20°C. Los ADN obtenidos por los métodos 1, 2 y Ref, fueron testeados por medio de PCR multiplex en tiempo real. La técnica mostró una utilidad limitada para paneles de sangre con EDTA, debido a la mayor dispersión del método 1 (R^2 de 0,853) respecto del método Ref (0,988), y a la presencia de interferentes que hacen imposible procesar algunas muestras. Las interferencias fueron mayores para el método 2, por lo que descartamos su utilización con EDTA como anticoagulante. Similares resultados se obtuvieron con muestras de pacientes a ciego encontrándose concordancia en 58 muestras sobre 66 totales, con una menor sensibilidad para el método 1 que para el de referencia.

En cuanto a los paneles con GEB, el método 1 no demostró utilidad, debido a la presencia de interferentes de la PCR. El método 2, en cambio demostró una performance similar al método Ref para dichos paneles, con similar dispersión de los datos (R^2 de 0,997 vs 0,994), y permitió detectar muestras a concentraciones tan bajas como 0,125 equivalentes parasitarios/ml. A esto se suma una mayor velocidad de procesamiento, lo que sugiere una utilidad para su utilización en ensayos clínicos. En el futuro evaluaremos variaciones de ambos métodos para intentar mejorar sus parámetros.

9 - Evaluación de un nuevo inmunoblot comercial para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Bisio M.1,2, Brossas J.Y.3,4, Ballering G.1, Gonzalez N.1, Moscatelli G.1,2, Moroni S.1, Paris L.3,4, Altchek J.1,2

1 Servicio de Parasitología y Enfermedad de Chagas, Hospital Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina.

2 IMIPP Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas, CONICET-GCBA, Buenos Aires, Argentina.

3 Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière/Charles Foix, Paris, Francia.

4 Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, CIMI-Paris, Francia.

La enfermedad de Chagas, afecta aproximadamente 8 millones de personas y 25 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección. El diagnóstico en la etapa crónica está basado en la detección de anticuerpos. Sin embargo se requieren tres técnicas serológicas para definir el diagnóstico. Las técnicas confirmatorias están disponibles sólo en centros de referencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar un kit comercial inmunoblot para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Se estudio una cohorte retrospectiva de 278 pacientes: 100 pacientes con infección por *Trypanosoma cruzi* (edad media: 34 años, rango: 1-78) y 178 no infectados con *T. cruzi* (edad media: 37 años, rango 1-77). De los 178 pacientes no infetados, 98 tenían otras infecciones parasitarias (toxoplasmosis (n=28), leishmaniasis (n=44), amibiasis visceral (n=7) y malaria (n=19)). Criterio diagnóstico y seguimiento: a) menores de 6 meses: parasitemia positiva (microhematocrito) b) mayores de 6 meses: serología reactiva por 2 técnicas (ELISA, HAI, IFI). Kit inmunoblot comercial "Western Chagas IgG" (LDBio Dagnositics, Francia): antígenos de lisado total de trypomastigotes y amastigotes de la cepa CL Brener. Se analizó la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del kit comercial. Al

analizar repetidamente sueros de pacientes infectados (n=5) se observó alta reproducibilidad en el resultado y perfil de bandas positivas. La presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en los sueros analizados fue considerada positiva cuando se observaron al menos 2 bandas con peso molecular (PM) 15, 27, 28, 42, 45 y/o 47 kDa (presentes en más del 90 % de los sueros de pacientes infectados). Se observaron bandas con PM mayor a 50 kD, sin embargo fue difícil de analizar su PM y por lo tanto no fueron consideradas para el análisis de los resultados. No se observó la presencia de bandas de interés en los pacientes no infectados con *T. cruzi*. El kit comercial rindió una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 100 % (Sensibilidad IC95: 95,3-100; Especificidad IC95: 97,4-100; VPP IC95: 95,4-100; VPN IC95: 97,4-100). La técnica comercial inmunoblot "Western Chagas IgG" de LDBio es un ensayo fácil de realizar y permitió obtener resultados cualitativos en 4 horas. Por su alta sensibilidad y especificidad podría ser útil como técnica confirmatoria para la detección de la enfermedad de Chagas.

11 - Identificación de geohelmintos y biohelmintos en pacientes de la Provincia de Corrientes

Gené C.M.1,2, Rea M.J.F.1,2, Fleitas L.I.2, Borda C.E.1

1 CENPETROP Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste

2 Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste

Las regiones que se comportan como reservorios naturales de agua se caracterizan frecuentemente por la concentración de la población, con efectos sobre la incidencia de enfermedades.

Las áreas tropicales son óptimas para el mantenimiento de geohelmintiasis y biohelmintiasis pues ofrecen las condiciones ambientales necesarias para la reproducción de los parásitos.

Los geohelmintos son nematodos que poseen parte de su ciclo vinculado a las condiciones del ambiente y no están incluidos en la lista de enfermedades de notificación obligatoria, configurándose como un grupo de agentes parasitarios que causan serios problemas de salud. Entre los biohelmintos, el *Schistosoma mansoni* plantea preocupación en salud pública por su potencial transmisión, debido a la presencia en esta región de caracoles de agua dulce que participan en el ciclo del parásito. En investigaciones del CENPETROP, algunas poblaciones de estos moluscos fueron infectadas experimentalmente con cepas del *S. mansoni*.

El objetivo de este trabajo fue diagnosticar, por medio de exámenes coproparasitológicos, geohelmintos y biohelmintos en niños y adultos examinados en el CENPETROP desde 2013 a 2017.

Se examinaron 856 pacientes, 30,6 % eran varones y 69,4 % mujeres.

El 41,5 % presentaban positividad para algún parásito intestinal. Se verificó que la infección parasitaria fue mayor para geohelmintos (*Strongyloides stercoralis* 22,8 %, *Necator americanus* 5,6 %, *Ascaris lumbricoides* 2,0 %, *Trichuris trichiura* 0,3 %), que la frecuencia de biohelmintos (*Taenia saginata* 3,7 % e *Hymenolepis nana* 1,1 %). No se observaron huevos de *S. mansoni* en estas muestras.

El 62,8 % de los parasitados eran mujeres. El grupo etario de 20 a 90 años presentó las mayores tasas: 89,6 %. En 76 (21,4 %) personas hubo bi o poliparasitismo.

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian que las tasas de geohelmintos son elevadas.

Las parasitosis detectadas están comunmente asociadas a las precarias condiciones de vida, falta de saneamiento básico y cuestiones sociales y culturales, como el uso de los cuerpos de agua para actividades domésticas.

Al existir especies de moluscos susceptibles al *S. mansoni* y ante la posibilidad de la introducción del parásito, es fundamental realizar controles epidemiológicos en la región.

13 - Importancia de la detección molecular en el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea

Lucero R.H.1, Brusés B.L.1, Formichelli L.B.1, Scappini F.2

1 Área Biología Molecular. Instituto de Medicina Regional. UNNE. Resistencia, Chaco.

2 Hospital Pediátrico "Juan Pablo II". Corrientes.

Se presenta un paciente de 7 años de edad, sexo masculino, oriundo de la ciudad de Corrientes y derivado al Hospital Pediátrico Juan Pablo II de la misma, que consulta por lesiones ulcerosas en cara interna de brazo derecho y zona periumbilical, de 4 meses de evolución. La lesión ulcerosa en cara interna del brazo derecho fue de 3,5 cm de diámetro, de bordes netos, con costras melicéricas y fondo granulante, dolorosa a la presión y se constata lesión similar, de 2 cm de diámetro, en zona periumbilical izquierda. Presenta además adenopatía axilar derecha y desnutrición de primer grado. Primeramente fue tratado con cefalexina, no observando mejoría. Los diagnósticos presuntivos fueron leishmaniasis cutánea, pioderma gangrenoso, loxocelismo, ectima estreptocócico.

Se realizaron exámenes complementarios como impronta de la lesión teñida con Giemsa que fue negativo para *Leishmania*. Se realizó además una biopsia de piel que demostró un infiltrado inflamatorio crónico linfocitocitario en la cual no se constataron Amastigotes en la tinción con Giemsa. La histopatología fue incharacterística para las entidades en estudio.

Se repitió la biopsia con igual resultado anterior. Finalmente se derivó una muestra del reborde de úlcera al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Medicina Regional para la realización de una PCR para *Leishmania braziliensis*, resultando detectable el amplicón de 126pb con primers LB1 y LB2 que derivan de la secuencia de ADN de un gen espaciador no transcrito (Nº de acceso a GenBank M75133) según la técnica descrita por Lucero y col (2008).

Posteriormente se internó al paciente y se indicó anfotericina complejo lipídico durante 9 días a dosis habituales, debido a que presentaba desnutrición de primer grado, con escasa masa muscular; lo que sumado a la corta edad del paciente, hacía poco recomendable tratarlo con antimoniales. A los 30 días de iniciado el tratamiento se constató una notable mejoría de las lesiones que comenzaron a cicatrizar. La cicatrización completa se evidenció hacia los 5 meses post tratamiento.

Se destaca en este caso, que sólo el método molecular permitió establecer el origen de la infección y en base a este diagnóstico se logró un tratamiento adecuado que revirtió las serias lesiones cutáneas del paciente.

15 - Leishmaniasis cutánea y cromomycosis. Coinfección de dos patologías endémicas de clima subtropical

Cattana M.2, Mijalec N.L.A.1, Katavich E.1, Melo V.1, Russel M.1, Paniagua B.1, Fiad M.E.1, Sacramone C.2, Tracogna F.2, Fernández M.2, Brusés B.L.3, Formichelli L.B.3, Lucero R.H.3

1 Centro Dermatológico "Dr. M. M. Giménez". Resistencia, Chaco.

2 Servicio de Microbiología Clínica – Hospital "Dr. Julio C. Perrando". Resistencia, Chaco.

3 Área Biología Molecular. Instituto de Medicina Regional, UNNE. Resistencia, Chaco.

El Chaco se encuentra en una región subtropical donde coexisten múltiples infecciones endémicas.

Se presenta el caso de un hombre de 41 años oriundo de Resistencia, Chaco, de oficio panadero. Consultó por lesión tumoral en el 3er dedo de la mano izquierda, secundario a un traumatismo previo con elemento cortopunzante, de 4 meses de evolución. Sin antecedentes patológicos de relevancia. Al examen dermatológico presenta una placa úlcerovegetante de bordes eritematovioláceos con áreas erosivocostrosas de 2 x 1,5 cm de diámetro, edema y dolor ocasional.

Los diagnósticos diferenciales planteados fueron leishmaniasis, cromomycosis y tuberculosis cutánea. Se realiza el escarificado de la lesión y una biopsia incisional para estudios histopatológicos y de biología molecular para la detección de *Leishmania braziliensis*.

En el frotis de la lesión con coloración de Giemsa se observaron amastigotes compatibles con *Leishmania*

sp.; mientras que en el examen en fresco con KOH de la biopsia de piel y partes blandas, se observaron cuerpos escleróticos compatibles con cromomycosis. En el cultivo micológico desarrolló *Fonsecaea pedrosoi*. El estudio histopatológico informó: Dermatitis granulomatosa con hiperplasia pseudoepiteliomatosa.

Para los estudios moleculares, se analizaron secciones de tejido obtenidas de rebordes de úlceras conservadas en PBS. La extracción de ADN se realizó mediante el método de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio). En la reacción de PCR específica para *Leishmania braziliensis* se emplearon los primers LB y LB2, oligonucleótidos que derivan de la secuencia de un gen espaciador no transcrito (Nº de acceso a GenBank M75133): LB1 y LB2 según lo reportado por Lucero RH y col (2008). Se consideró positiva toda muestra que presentara la banda específica de 126 pb.

Mediante esta PCR se detectó *Leishmania braziliensis* en la muestra remitida. Con el diagnóstico de leishmaniasis y cromomycosis asociadas se decidió iniciar tratamiento con antimoniato de meglumina, e itraconazol con excelentes respuestas post tratamiento.

Se presenta el caso, por la rareza de la presencia de ambas patologías endémicas en una misma lesión, enfatizando en la búsqueda y descarte de otras patologías, y la necesidad de tener disponibles técnicas sensibles y específicas como las moleculares para el diagnóstico.

17 - Pacientes con Leishmaniosis Tegumentaria Americana (LTA) y factores de riesgo para leishmaniosis mucosa en pacientes de la provincia de Corrientes

Rea M.J.F.1,2, Borda C.E.2, Fleitas A.I.

1 Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste.

2 Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales (CENPETROP), Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste.

La leishmaniosis tegumentaria americana (LTA), clínicamente puede manifestarse principalmente bajo las formas de Leishmaniosis Cutánea (LC) y Leishmaniosis Mucosa (LM), considerada la forma clínica más grave.

La LC puede evolucionar para LM, y dentro de los factores de riesgo están, las lesiones por encima de la cintura pélvica, grandes lesiones ulceradas, historia de LTA anterior inadecuadamente tratadas y tiempo de evolución de estas lesiones.

El objetivo de este estudio fue analizar los pacientes con LTA del CENPETROP, en el período de 2005 a 2017 y los factores asociados que podrían desarrollar la forma mucosa.

Previamente, estos pacientes tuvieron diagnósticos negativos para LTA en otros servicios.

Los pacientes tuvieron una evaluación clínica completa. Para confirmar el diagnóstico clínico se usaron: Intradermoreacción de Montenegro (IDM) en todos los pacientes y frotis por aposición coloreado con Giemsa solo de las úlceras.

Fueron diagnosticados 41 personas con edades entre ocho meses y 89 años.

Todos fueron reactivos para IDM.

El 50 % de los casos correspondió a individuos entre 40 y 64 años. Predominaron los varones, con el 67,5 %, en todas las fajas etarias. Hubo tres niñas y dos varones de 3 a 11 años.

Se observó que 30 (75 %) de las formas clínicas fueron cutáneas y 10 (25 %) mucosas.

Fueron observados algunos factores como: lesiones arriba de la cintura pélvica, 18 (45 %); de éstos 13 (32,5 %) tenían lesiones en la cabeza, seis (14,6 %) tiempo prolongado de evolución de las lesiones cutáneas (dos a cinco años). En 14 (34,1 %) se observaron úlceras cutáneas de gran tamaño de tres a 11cm y cuatro (22,2 %) habían referido lesiones cutáneas anteriormente y se pudo observar estas cicatrices.

Las lesiones mucosas fueron cuatro nasales, cuatro orofaríngeas y dos en ambas.

Todos recibieron tratamiento con Glucantime®.

Aunque los descubrimientos pueden ser indicativos de los factores de riesgo para el desarrollo de LM en el futuro. Lo que ha sido más observado es que la media de tiempo entre la ocurrencia entre LC y LM es alta. Es importante rastrear en pacientes, los factores que puedan ser indicativos de la evolución hacia el com-

promiso mucoso y en estas situaciones orientar a las personas involucradas.

Esta región es endémica para LTA lo que estimula la formación de los promotores de salud para detectar la enfermedad precozmente. Esa preparación de los equipos favorece el tratamiento en las fases iniciales de la enfermedad.

19 - Utilización de tarjetas FTA para el diagnóstico de Chagas Congénito

Rivero R.1, Ballering G.2, Gulin E.2,3, Esteva M.I.1, Altchek J.2,3, Ruiz A.1, Bisio M.

1 Instituto Nacional de Parasitología. “Dr. Mario Fatała Chaben”

2 Servicio de Parasitología y Enfermedad de Chagas, Hospital Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina

3 IMIPP Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas, CONICET-GCBA, Buenos Aires, Argentina.

4 CONICET

Las tarjetas (FTA) poseen varias ventajas (en relación al volumen y conservación de las muestras) que permitirían, junto con los ensayos de Amplificación Isotérmica del ADN (LAMP), un diagnóstico rápido, ideal para los laboratorios de baja infraestructura. Permitiría además incluir la detección de Chagas congénito (ChC) en la pesquisa neonatal. El objetivo de este trabajo fue evaluar el rendimiento de FTA para conservar muestras de sangre en el contexto del diagnóstico molecular de ChC.

Para evaluar la calidad del ADN obtenido se prepararon curvas de sangre de pacientes no infectados con dos conservantes (EDTA y GEB) con cantidades conocidas de tripomastigotes de cultivo. De cada punto de la curva se aplicaron 100 µl en FTA y 200 o 300 µl (EDTA y GEB respectivamente) para extraer el ADN utilizando columnas (Roche). Para evaluar la aplicación en el contexto de ChC se aplicaron en FTA 100 µl de muestras de sangre (EDTA) de: a) 4 ratones con infección aguda y crónica; b) 5 neonatos de madres con enfermedad de Chagas. Para obtener el ADN de las FTA se utilizaron dos círculos por muestra según indicaciones del fabricante. Se midió cantidad y calidad (relación 260/280) del ADN con nanodrop^(R) y se calculó el valor de P (Mann-Whitney U). El ADN obtenido fue analizado por PCRq (Ramírez y col., 2013) y LAMP (Rivero y col. 2017).

La calidad del ADN obtenido fue similar al utilizar columnas y FTA. La cantidad de ADN, obtenida a partir de las curvas artificiales, fue de 8,1- 31,4 mg/ml con FTA y de 6,5-30,6 mg/ml con columnas. No hubo diferencia significativa entre las cantidades obtenidas ($p=0.31$). La extracción por columna mostró un límite de detección por PCRq de 2 órdenes menores que por FTA tanto al aplicar muestras con EDTA como con GEB. Todos los ratones dieron positivos para las técnicas de amplificación molecular. Se observaron resultados 100 % concordantes al analizar las muestras de pacientes por LAMP, parasitemia y PCRq, siendo un niño positivo y cuatro negativos.

La obtención de muestras de sangre en FTA, con ambos anticoagulantes, permitió obtener ADN en cantidad y calidad suficiente para realizar ensayos moleculares. Si bien la extracción del ADN por columna fue más sensible que al utilizar FTA, la conservación en tarjeta permitió detectar infecciones agudas de *T. cruzi* en ratones y humanos. Se deben realizar ensayos clínicos de muestras para determinar su posible utilidad y performance en el diagnóstico de ChC en el contexto de la pesquisa neonatal.

21 - Caracterización del N-glicoma serico como potencial fuente de biomarcadores para pronóstico de pacientes con Enfermedad de Chagas crónico

Ossowski M.S.1, Cagnoni A.J.2, Acevedo G.R.1, Girard M.C.1, Fernández M.3, Hernández Y.3, Chadi R.4, Alcaráz P.B.1, Pérez Perri L.A.1, Gómez K.A.1, Mariño K.V.2

1 Laboratorio de Inmunología de las Infecciones por Tripanosomatidos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI - CONICET), CABA, Argentina.

2 Laboratorio de Glicómica Funcional y Molecular. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME - CONICET), CABA, Argentina.

3 Instituto Nacional de Parasitología “Dr Mario Fatala Chaben“, CABA, Argentina. ;br/;4 Hospital general de agudos “Dr. Ignacio Pirovano”

La Enfermedad de Chagas, conocida también como tripanosomiasis americana, es una enfermedad causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* y actualmente, se estima que entre 6 y 7 millones de personas en todo el mundo están infectadas. La infección crónica de Chagas puede manifestarse como asintomática, constituyendo el 70 % de los casos, o desarrollar sintomatología cardíaca, digestiva o mixta en el 30 % de los pacientes que padecen esta enfermedad. Tanto la persistencia del parásito en reservorios tisulares como la respuesta inmune generada, han sido asociadas al desarrollo de las manifestaciones crónicas. En este contexto, la ausencia de biomarcadores de prognosis adecuados dificulta, por parte del personal médico, la toma de decisiones clínicas adecuadas para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

La alteración específica del N-glicoma sérico se ha asociado a varias patologías, lo cual derivó en la proposición de estructuras glicosídicas o glicoproteínas como biomarcadores tanto para enfermedades inflamatorias crónicas (ej, enfermedades inflamatorias intestinales) como para infecciosas (ej, HIV y Leishmaniasis). Tomando en cuenta estos antecedentes, y considerando: a) el alto grado de inflamación observado durante el desarrollo de la cardiopatía chagásica y b) el importante papel de la glicobiología en la supervivencia de *T. cruzi*, decidimos estudiar si las proteínas N-glicosiladas del suero podrían ser utilizadas como marcador de prognosis en pacientes chagásicos. Para ello, se realizó la eliminación enzimática de N-glicanos a partir de muestras de sueros de pacientes asintomáticos, con cardiopatía e individuos no infectados (n=8 por grupo). Los N-glicanos así tratados fueron analizados por cromatografía líquida incluyendo intercambio aniónico (WAX-HPLC), que permite establecer el porcentaje de glicanos cargados negativamente, y de interacción hidrofílica (HILIC-UPLC), que permite la caracterización detallada de las estructuras N-glicosídicas. Los experimentos realizados demostraron diferencias entre las tres cohortes: mientras los individuos con cardiopatía muestran un aumento en trisialilados tanto por WAX como por HILIC (estructuras A3G3S3, FA3G3S3 y finalmente, A4G4S3), los individuos no infectados difieren respecto de los sujetos infectados a nivel del perfil de tetrasialilados. Estos resultados muestran cambios en el N-glicoma sérico que podrían presentar potencial como marcadores de prognosis en la Enfermedad de Chagas.

23 - Enhidrina y Fluctuanina: Lactonas sesquiterpénicas con actividad antiparasitaria

Urbano K., Casasco A., Ulloa J.2, Redko F.2, Lopez-Arencibia A.3, Lorenzo-Morales J.3, Piñero J.E.3, Petray P.B.1, Muschietti L.2, Frank F.M.1

1 IMPaM Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (UBA-CONICET)

2 IQUIMEFA Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (UBA-CONICET)

3 IUETSPC Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

Se estima que la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis afecta a millones de personas en el mundo. Previamente reportamos la actividad tripanocida de productos naturales provenientes de la especie vegetal *Smilax sonchifolius*, entre ellos la lactona sesquiterpénica (STL) enhidrina. Recientemente aislamos de esta planta otra STL que identificamos como fluctuanina. Como objetivo de este trabajo nos planteamos estudiar la actividad de esta última sobre los agentes etiológicos de estas enfermedades y sus mecanismos de acción. Se incubaron promastigotes de *Leishmania* spp y epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de fluctuanina (0-100 µg/mL), y amastigotes de *T. cruzi* en presencia de 0,1-11 µg/mL del compuesto y se calculó la Concentración Inhibitoria 50 y 90 (CI₅₀, CI₉₀). La citotoxicidad fue analizada en células de la línea RAW (0-100 µg/mL) mediante el ensayo de MTT. Con la finalidad de evaluar los posibles mecanismos de acción de ambos compuestos, se incubaron los parásitos con la CI₅₀ y se tiñeron con naranja de acridina (NA). Se evaluaron cambios en el potencial de la membrana mitocondrial mediante el uso del indicador fluorescente JC-1 y la variación de los niveles de ATP con el uso del Celltiter-glo Luminiscent en presencia de la CI₉₀

de cada droga. Los valores de CI_{50} para epimastigotes y promastigotes fueron 1,21 $\mu\text{g/ml}$ y 4,52 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que para amastigotes de *T. cruzi* fue 0,77 $\mu\text{g/ml}$. La CC_{50} para la fluctuanina fue de 364,68 $\mu\text{g/ml}$, obteniéndose un índice de selectividad de 473. Con la tinción con NA, se observó que tanto la fluctuanina como la enhidrina indujeron un patrón “de fenotipo apoptótico” caracterizado por la presencia de cuerpos ácidos y núcleos picnóticos. También, se observó una disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial tanto para epimastigotes como para promastigotes. Se verificó la depleción significativa de los niveles de ATP en epimastigotes y promastigotes con ambos compuestos. En este sentido, los eventos observados de disminución del potencial de la membrana mitocondrial y depleción en los niveles de ATP, además de la presencia de cuerpos ácidos y núcleos picnóticos, sugerirían que ambas STL inducirían muerte celular programada en los parásitos.

25 - Evaluación de extractos y metabolitos de origen vegetal utilizados en medicina tradicional frente a epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Bernal D.1, Fernandez L.R.2, Sanchez M.2, Musikant D.1, Schenone N.3, Palermo J.2, Edreira M.M.1

1 IQUIBICEN-DQB, CONICET-UBA, 1428, CABA.

2 UMYMFOR-DQO, CONICET-UBA, 1428, CABA.

3 Fundación Bosques Nativos Argentinos para la Biodiversidad, 1640, Bs As.

Las plantas han constituido la base de la medicina tradicional con registros que datan desde la Edad Antigua. Las mismas poseen metabolitos secundarios que pueden ser aislados en grandes cantidades a partir de sus extractos y utilizados como base para la obtención de drogas contra diversas enfermedades. Con el objetivo de seleccionar extractos y metabolitos activos que muestren actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi*, se evaluó el efecto de inhibición en el crecimiento de epimastigotes por extractos de especies vegetales recolectadas en la “Fundación Bosques Nativos Argentinos para la Biodiversidad”, provincia de Misiones: *Baccharis trimera*, *Brosimum gaudichaudii*, *Aristolochia triangularis*, *Achillea millefolium*, *Helietta apiculata* y *Jacaranda caroba*. Los resultados obtenidos mostraron que todos los extractos crudos resultaron activos a las 72 hs a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, con porcentajes de inhibición de hasta el 48 % respecto al control. A la par, se analizó un compuesto mayoritario (Uliscomoncadin A) de la corteza de *Helietta apiculata* que posee actividad anti-leishmania moderada ya reportada, y fue utilizado como material de partida en modificaciones sintéticas sencillas, con el fin de aumentar su actividad epimastigocida y disminuir su citotoxicidad, ya que se encuentran en el mismo orden de magnitud (EC_{50} , aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$). Tanto Uliscomoncadin A, como los derivados fueron evaluados en un rango de concentraciones entre 1,25 y 20 $\mu\text{g/ml}$. Se pudo observar que la citotoxicidad disminuyó para los derivados pero también se redujo la actividad antiparasitaria deseada. Para todos los casos, como control negativo se utilizó DMSO al 0,1 % y como control positivo Nifurtimox de Bayer a 2 $\mu\text{g/ml}$, concentración a la cual se observa un porcentaje de inhibición de aproximadamente 42 %. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y analizados por ANOVA ($p < 0.0001$).

27 - Utilidad de la técnica de PCR en el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea

Brusés B.L.1, Formichelli L.B.1, Vallejos A.1, Mijalec N.L.A.2, Anriquez G.2, Pacella M.J.2, Paniagua B.A.2, Escobar V.2, Fiad M.E.2, Tracogna M.3, Fernández M.3, Cattana M.3, Lucero R.H.1

1 Instituto de Medicina Regional-UNNE, ciudad de Resistencia, Chaco, Argentina.

2 Centro Dermatológico “Dr. M. M. Giménez”, Ciudad de Resistencia, Chaco, Argentina.

3 Hospital “Dr. Julio C. Perrando”- Servicio de Microbiología Clínica, Ciudad de Resistencia, Chaco, Argentina.

Se presentan cinco casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, de diferentes presentaciones clínicas, en pacientes del NEA.

1: Mujer de 64 años, consulta por placa eritematosa con bordes violáceos y centro ulcero-costroso de 5 meses de evolución en antebrazo. Los diagnósticos diferenciales planteados fueron leishmaniasis tegumentaria, esporotricosis y tuberculosis cutánea.

2: Hombre de 44 años, inmunocompetente, consulta por múltiples úlceras de diferentes tamaños en tórax y miembros inferiores, de borde indurado, sobreelevado y violáceo, fondo costroso, de 2 meses de evolución.

3: Hombre de 46 años, consulta por lesiones infiltradas granulomatosas en fosas nasales, mucosa bucal, y paladar, asintomáticas, de 6 meses de evolución.

4: Hombre de 59 años, inmunocompetente consulta por úlcera en antebrazo, con borde eritemato violáceo, centro granulante, de 3 meses de evolución, con lesiones similares más pequeñas en la cabeza y espalda.

5: Hombre de 66 años, con antecedentes de Hansen borderline tuberculoide, etilenolista y tabaquista. Presenta lesión tumoral tipo placa granulomatosa infiltrada con compromiso nasal, de labio superior y destrucción del tabique nasal. En paladar duro, presentaba lesión verrugosa, disfagia y odinofagia. Los diagnósticos diferenciales planteados fueron leishmaniasis mucocutánea, carcinoma espinocelular, rinofima y Hansen lepromatoso.

En todos los pacientes se realizó el examen microscópico directo en muestras de biopsia o escarificados, y se solicitó PCR para *Leishmania braziliensis*. En cuatro casos se pudo establecer el diagnóstico de leishmaniasis por el examen microscópico directo, mientras que en el primer caso resultó negativo. La PCR con los primers específicos LB1 y LB2, fue detectable en todas las muestras analizadas, lo que permitió no sólo hacer el diagnóstico en el primer caso, sino también confirmar la especie y verificar la multiplicidad de formas clínicas en la que puede presentarse. Todos los pacientes evolucionaron favorablemente al tratamiento, en el primer caso se utilizó anfotericina B y en los restantes antimonio de meglumina.

Es importante plantear la leishmaniasis como diagnóstico diferencial frente a lesiones cutáneas y mucosas, aún en presentaciones atípicas, por hallarnos en zona endémica. Es necesario disponer de rutina con técnicas altamente sensibles como la PCR, para complementar y en algunos casos definir el diagnóstico para poder implementar el tratamiento oportuno, y monitorear las especies circulantes.

Índice de Autores

- Abaca D., 85
Abdala M.E., 49
Abril M., 20, 48, 77, 78
Acevedo G.R., 25, 40, 86, 98
Acuña A., 48
Agüero F., 50
Aguero R.N., 90
Alarcón de Noya B., 91
Alarcón O., 20
Alba Soto C.D., 21, 54, 66, 90
Albareda M.C., 12, 41
Alcaráz P.B., 40, 98
Alfonzo J.D., 72
Allasia M., 48
Allemandi D., 66
Almazán M.C., 36
Almeida I.C., 51
Alonso G.D., 28, 30, 32, 74
Alonso-Padilla J., 51
Altcheh J., 50, 93, 94, 98
Alvarez M.G., 41
Alvarez-Valin F., 60
Alzogaray R.A., 34
Ancarola M.E., 41, 61, 73
Angel S.O., 16, 29, 39, 83
Anriquez G., 100
Apodaca S., 76
Apt W., 9
Aramay L.V., 36
Argüello L., 21
Argibay H.D., 18
Arias D.G., 63
Arias E., 80, 82
Armando M., 46
Arrúa E.C., 53

Balcazar D., 70
Ballering G., 93, 94, 98
Balouz V., 26, 32, 72
Barrera N.M., 28, 30
Batalla E., 21
Batalla E.I., 54, 66
Beati P., 30
Bedogni G.R., 52
Belaunzarán M.L., 89
Beltramone A., 48

Benatar A., 93
Benizio E., 84
Berná L., 60
Bernal D., 92, 100
Bertocchi G., 41
Bertotti S., 72
Besuschio S.A., 91, 93
Bilbao L., 55, 74
Bisio M., 18, 94, 98
Bizai M.A., 80
Bizai M.L., 82
Blancato V., 46
Bogdanovich E., 90
Bojanich M.V., 52, 81
Bontempi I., 46, 48, 85, 89
Borda C.E., 38, 56, 83, 95, 97
Bott E., 89
Bottasso O.A., 24, 88
Bracco L., 50
Brehm K., 61, 73
Briones G., 72
Brossas J.Y., 94
Bruno L., 45
Brusés B.L., 75, 96, 100
Búa J., 18, 21, 53
Burgos J.M., 21
Buscaglia C.A., 26, 32, 50, 72
Bustos P.L., 21

Cabral N., 46
Cabrera G., 46, 64, 85, 89
Cáceres A.J., 91
Caeiro L., 58
Caeiro L.D., 45
Cagnoni A.J., 98
Cajal S.P., 35, 81
Calderón E., 48
Cámara M. de los M., 26, 32, 72
Campos E.M., 63
Canabire M., 35
Cano F., 12, 37
Canziani G., 44
Carbajal de la Fuente A.L., 12, 37
Cardinal M.V., 18, 39
Carfagna I., 89
Caro N., 35

Carranza P.G., 49
 Carrillo C., 9, 70
 Casasco A., 45, 55, 99
 Casassa A.F., 43
 Cassataro J., 45
 Castro Eiro M.D., 41
 Cattana M., 96, 100
 Celas D., 65
 Centeno Camean C., 72
 Cerban F.M., 24
 Cervi L., 66
 Chadi R., 40, 86, 98
 Chapo G., 46
 Chiribao M.L., 60
 Cimino R.O., 19, 35, 78, 81
 Clemente M., 39, 83
 Coceres V.M., 16
 Comini M.A., 63
 Concepción J.L., 91
 Copa G.N., 36, 81
 Coria L., 45
 Corral R.S., 87
 Cribb P., 15, 31
 Cricco J.A., 71
 Cruz-Bustos T., 32
 Cucher M., 41, 61, 73
 Cura C., 78
 Curto M.Á., 76, 78

 D'Attilio L., 24, 88
 da Silva Oliveira Barbosa E., 46
 Dalla Costa J., 80
 Dámico I., 93
 Davies C., 63
 de la Fournière S., 65
 de Miguel N., 59
 De Pino V., 70
 Derio M., 46
 Di Iulio D., 49
 Díaz G., 48
 Díaz-Luján C., 84
 Diaz-Viraqué F., 31
 Diez C., 80
 Ducrey I., 72
 Durante I.M., 72

 Echaide I., 65
 Edreira M.M., 43, 67, 92, 100
 Elias M.C., 15
 Enriquez G.F., 18, 39
 Escalada A., 35, 36
 Escobar V., 100
 Espariz M., 46
 Esteva M.I., 10, 53, 98

 Fabbro D., 80, 82
 Fabiani M., 20, 77
 Farber M., 65
 Farré C., 46
 Fernández G.J., 75
 Fernandez L.R., 100
 Fernández M., 40, 86, 91, 96, 98, 100
 Fernandez M. del P., 39
 Fernández Vásquez R., 89
 Fernández Villamil S.H., 27, 30
 Fiad M.E., 96, 100
 Fichera L.E., 53
 Fleitas A.I., 97
 Fleitas L.I., 56, 95
 Fleitas P., 35, 78
 Fleming I.M.C., 72
 Formichelli L.B., 75, 96, 100
 Fraccaroli L., 70
 Frank F.M., 9, 42, 45, 55, 99
 Fretes R., 84
 Fridman V., 54
 Fronza G., 34, 77
 Fuchs A., 44

 Gallo Vaulet L., 90
 Gambino D., 55
 Ganuza A., 29
 Garat B., 55, 68, 74
 Garay A.S., 63
 Garbossa G., 18
 Garcia B.A., 36
 Gascon J., 51
 Gaspe M.S., 13, 33, 79
 Gauna L., 76
 Gené C.M., 56, 95
 Genta P.D., 74
 Gentile J., 44
 Gertiser M.L., 44
 Gil J.F., 35, 36, 81
 Gimenez G., 89
 Girard M.C., 40, 86, 98
 Gomez E., 39, 83
 Gómez K.A., 40, 68, 86, 91, 98
 Gómez-Bravo A., 78
 Gonçalves C.S., 15
 Goncalves Valente C.M., 90
 González B.F., 24
 González C., 21
 González Cappa S.M., 54, 66, 21
 González F.B., 46, 88
 Gonzalez L., 89
 González L.N., 85, 48
 Gonzalez N., 93, 94
 Goren N.B., 87, 89

Gori S., 43
 Gravisaco M.J., 65
 Grieff G., 31
 Guantay E.A., 36
 Guerrero S.A., 63
 Guhl F., 78
 Guillemi E., 65
 Gulin E., 98
 Gürtler R.E., 18, 33, 39, 79
 Gutierrez B., 41

 Hernández-Vazquez Y., 86
 Hernandez C., 44
 Hernández F., 55
 Hernandez Vasquez Y.M., 47
 Hernández Y., 40, 86, 98
 Herrea F., 63
 Herz M., 61
 Hoyos C.L., 36

 Iglesias A.A., 63

 Jaramillo Ortiz J.M., 65
 Jensen O., 44
 Juarez M., 35, 81
 Juiz N.A., 86

 Kamenetzky L., 61
 Katavich E., 96
 Kevorkian M.L., 27, 30
 Krolewiecki A.J., 35, 78, 81

 Labadie G.R., 61
 Lammel E.M., 89
 Larocca L., 70
 Laucella S.A., 12, 41, 53
 Lavayén S.N., 39, 83
 Leverrier A., 92
 Lichtenstein G., 61
 Liu B., 51
 Lizarraga A., 59
 Lobbia P., 37, 77
 Lobo M.M., 26, 72
 Lococo B., 41
 López Arias L., 65
 López M. de los A., 52, 81
 López M.G., 69
 López S.M., 47
 Lopez-Arencibia A., 55, 99
 Lorenzo-Morales J., 55, 99
 Lucero R.H., 23, 75, 96, 100
 Lucia A., 34
 Luna B.E., 49
 Lupi G., 85, 89
 Luque M.E., 49

 Macchiaroli N., 61
 Macchiaverna N.P., 18, 39
 Maglioco A., 44
 Magni C., 46
 Maldonado L., 73
 Maletto B., 65
 Manattini S., 80
 Marcilla A., 41, 61
 Marcipar I., 22, 46, 48, 85, 89, 93
 Mariño K.V., 98
 Martino F., 48
 Márquez J., 24
 Masip Y., 58, 70
 Massimino Stepňicka M., 28, 30
 Maza Y., 20, 48, 77
 Medina M.G., 52
 Mehta A., 51
 Meli S., 12
 Melo V., 96
 Mezzano L., 84
 Mierez M.I., 38
 Mijalec N.L.A., 96
 Mijalec N.L.A., 100
 Mildubegger N., 21
 Miles S., 73
 Miranda C.G., 66
 Miranda M., 91
 Miranda M.R., 29, 50, 62, 76
 Monte-Goncalves T., 37
 Montenegro V., 65
 Moreira Abán D., 36
 Moreira-Espinoza M.J., 84
 Moreno S.N., 16
 Moroni S., 93, 94
 Moscatelli G., 93, 94
 Mosquillo F., 55
 Motran C., 65
 Motta M.C.M., 15
 Mougabure-Cueto G., 14, 34, 77
 Mourglia-Ettlin G., 73
 Munera López J., 16
 Muñoz D., 29
 Muñoz-Calderón A., 76, 91
 Muschietti L., 99
 Muscia G.C., 55
 Musikant D., 43, 92, 100

 Nasser J.R., 35, 36
 Natale M.A., 41, 53
 Nattero J., 33, 37
 Nepote M., 82
 Nielsen M., 86

 Ocampo J., 30

Okulik N.B., 52
 Olivera L.V., 80, 82
 Orellano A., 65
 Orozco M., 18
 Ossowski M.S., 86, 98

 Pacella M.J., 100
 Pacini M.F., 24, 46, 88
 Pagura L., 71
 Palermo J., 92, 100
 Palma S., 66
 Paniagua B., 96
 Paniagua B.A., 100
 Paoletta M., 65
 Paravano L., 90
 Paris L., 94
 Parodi-Talice A., 60
 Pech-May A., 78
 Penas F.N., 87, 89
 Peralta M.E., 44
 Peralta R., 80
 Pereira C.A., 29, 50, 62, 76
 Pérez A.R., 24, 46, 88, 91
 Pérez Ganeselli M., 89
 Pérez L., 55
 Pérez M., 61
 Pérez Perri L.A., 86, 98
 Pérez-Díaz L., 74
 Perrone A.E., 21
 Petray P.B., 42, 45, 55, 99
 Peverengo L., 93
 Piñero J., 55
 Piñero J.E., 99
 Piccinali R.V., 33, 34, 37, 79
 Piegari M., 84
 Pino Martinez A.M., 66
 Pita S., 60
 Piwien-Pilipuk G., 24, 88
 Poncini C., 41, 61
 Poncini C.V., 26
 Postan M., 42
 Potenza M., 68
 Prado N.G., 47, 53
 Prochetto E., 46, 48, 85, 89
 Provecho Y., 12
 Pruzzo C., 65
 Pueblas Castro C., 45

 Quarnstrom Y., 51
 Quarroz Braghini J., 54
 Quebrada Palacio L.P., 42
 Quipildor M., 81

 Radío S., 68

 Ramírez M., 58
 Ramsey J.M., 78
 Rea M.J.F., 38, 56, 83, 95, 97
 Redko F., 99
 Reigada C., 29, 50, 62, 76, 91
 Repetto S.A., 21, 54, 90
 Reynoso M.M.N., 34
 Rial M.S., 53
 Riarte A.R., 10, 11, 47
 Rigazio C.S., 87
 Rijo G., 60
 Risso M.G., 21, 54, 90
 Rivera E.M., 39, 83
 Rivero F.D., 49
 Rivero M.B., 49
 Rivero R., 98
 Rizzi M., 45, 58
 Robello C., 31, 60
 Rodeles L., 89, 93
 Rodríguez Durán J.J., 68
 Rodrigues D., 63
 Rodriguez M., 60
 Rodriguez M.E., 45, 58, 70
 Rojas Cortez M., 37
 Rojas de Arias A., 37
 Roldán C., 85, 48
 Romagnoli P., 65
 Romano P.S., 17, 43
 Rosenzvit M., 61, 73
 Ruiz A., 98
 Ruiz Cobo L., 48
 Ruiz M.D., 70
 Russel M., 96
 Ruybal P., 21, 54, 90

 Sacramone C., 96
 Salomón C.J., 52, 53
 Salamone G., 43
 Salva L., 12
 Sanabria R., 65
 Sánchez D.O., 58
 Sanchez M., 100
 Sanchez P., 39, 83
 Sanmartino M., 9
 Santos da Silva M., 15
 Sartor P., 12, 20, 39, 48, 77
 Sasoni N., 63
 Sayé M., 29, 50, 62, 76, 91
 Scappini F., 96
 Schenone N., 100
 Schijman A.G., 10, 51, 75, 76, 78, 91, 93
 Schoijet A.C., 28, 32, 74
 Seremeta K.P., 52
 Serra E., 15, 31

Sierra M., 54, 90
Silber A., 53
Silva A.P., 39, 83
Silvane L., 65
Sione W., 80
Smircich P., 55, 68, 74
Socias E., 78
Sotelo-Silveira J., 68
Stecher D., 54
Sternlieb T., 32, 74
Stroppa M.M., 36
Suasnábar S., 82

Takada R., 72
Tavernelli L.E., 15, 31
Tejerina V., 35
Tekiel V., 45, 58, 70
Tellez-Iñón M.T., 68
Tevere E., 71
Toledano A., 90
Tolozza A.C., 34
Toneatto J., 24, 88
Torres Perez M., 48
Tracogna F., 96
Tracogna M., 100
Travacio M., 78
Triquell M.F., 84

Ulloa J., 99
Urbano K., 45, 99

Valenzano M., 65
Valera-Vera E.A., 29, 50, 62, 76, 91
Vallejos A., 100
Vallejos Y., 80
Vanagas L., 29
Vanrell M.C., 43
Varela G.M., 36
Vargas P., 35
Vicco M., 89, 93
Vilchez Larrea S.C., 27, 30
Villar S.R., 24, 46, 88
Volta B.J., 21

Wagner D.H., 42
Wasilewski S., 20, 77
Wehrendt D.P., 51, 75, 78
Weinberg D., 12, 20, 48, 77
Wilkowsky S., 65
Wong S., 51

Zago P., 63
Zerba E.N., 34