

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

“Análisis preclínico de la utilidad de la formulación de subunidades proteicas Trans- sialidasa- ISPA para su uso profiláctico y terapéutico”

Estefanía Prochetto

Director de Tesis: Iván Marcipar

Lugar de realización: Laboratorio de Tecnología Inmunológica-
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- Universidad Nacional
del Litoral

-2021-

Agradecimientos:

Llega el fin de una etapa de mucho trabajo y dedicación, de alegrías y tristezas, de triunfos y fracasos, y es el momento de agradecer... hay tanto para agradecer! En primer lugar quisiera agradecer a las instituciones que hicieron esto posible, a CONICET, por haberme otorgado la beca y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL, por permitirme realizar el doctorado y ser parte de esta institución. A mi director, Iván Marcipar, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de este maravilloso equipo, por guiarme y por ser tan paciente. A mis compañeros de trabajo que mas que compañeros son amigos, ¡gracias por tanto compartido! Gracias por hacerme reír, por escucharme, por cambiar mis días, por apoyarme y darme ánimos siempre ¡hacen del laboratorio un lugar hermoso! Gracias por ayudarme cuando necesitaba de muchas manos para terminar un experimento enorme, porque sin ustedes no hubiera podido hacer nada, fue un verdadero trabajo en equipo. Gracias Adrián por ayudarme con el modelado de las secuencias de proteínas para esta tesis, tema del cual no tengo ni idea. Gracias Ana Rosa Perez y todo su equipo por los parásitos que nos dan para realizar todos los experimentos y por la ayuda que me brindan siempre que lo necesito. Gracias Moni por realizar el análisis histológico de las muestras y gracias a Mirian Postan y su equipo por cedernos la cepa de parásitos Sylvio X10/4.

Gracias infinito a mi gran familia, a mis viejos, mis hermanos y sobrinos. Gracias por existir, el simple hecho de saber que están ahí, del otro lado, es motivo de una enorme sonrisa. El 2020 fue un año duro, con la pandemia que se nos vino encima y pasar meses sin poder vernos, pero hoy celebro que pudimos reencontrarnos y abrazarnos después de todo, ¡los quiero con toda mi alma! A mis amigas de la vida, que son muchas, gracias por ser esa hermosa familia que elijo día a día. Por último, y no menos importante, quiero agradecer a mi compañero de vida y mi gran amor, esto no hubiera sido posible sin tu

amor incondicional. Gracias por acompañarme en todo este proceso y en el caótico 2020, gracias por abrazarme bien fuerte cuando lo necesité y ponerme en eje cuando sentía que todo se me iba de las manos. Gracias por tanta paciencia y simpleza, sos mi polo opuesto y mi cable tierra, mi complemento y mi felicidad. ¡Gracias!.

Solo puedo decir: ¡Gracias, gracias y gracias a todos, por todo!

Publicaciones:

Estefanía Prochetto, Carolina Roldán, Iván A. Bontempi, Daiana Bertona, Luz Peverengo, Miguel H. Vicco, Luz M. Rodeles, Ana R. Pérez, Iván S. Marcipar and Gabriel Cabrera. Trans-sialidase-based vaccine candidate protects against *Trypanosoma cruzi* infection, not only inducing an effector immune response but also affecting cells with regulatory/ suppressor phenotype. *Oncotarget*. 2017 May 25. doi: 10.18632/oncotarget.18217.

Índice:

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas y símbolos: | 8 |
| Resumen: | 12 |
| Abstract: | 15 |
| Introducción: | 18 |
| Antecedentes de la problemática de la Enfermedad de Chagas e importancia del desarrollo de una vacuna para controlar la infección por <i>T. cruzi</i> | 18 |
| 1.I) Enfermedad de Chagas: | 19 |
| 1.I.1) Agente etiológico de la enfermedad: <i>Trypanosoma cruzi</i> | 21 |
| 1.I.1) a) El parásito: | 21 |
| 1.I.1) b) El genoma de <i>T. cruzi</i> y su clasificación en unidades discretas de tipificación: | 22 |
| 1.I.1) c) Ciclo de vida del parásito: | 22 |
| 1.I.2) Vector de la enfermedad: Triatomíneos..... | 26 |
| 1.I.3) Vías de transmisión: | 29 |
| 1.I.4) a) Fase aguda de la enfermedad:..... | 30 |
| 1.I.4) b) Fase crónica de la enfermedad:..... | 32 |
| 1.I.5) Aspectos inmunológicos de la infección:..... | 34 |
| 1.I.6) Tratamiento quimioterapéutico de la infección: | 36 |
| 1.II) Diseño racional de vacunas | 37 |
| 1.II.1) Introducción: | 37 |
| 1.II.2) Características de una vacuna: | 39 |
| 1.II.3) Tipos de vacunas: | 40 |
| 1.II.4) Desarrollo de vacunas contra <i>Trypanosoma cruzi</i>: | 43 |
| 1.II.4) a) Introducción: | 43 |
| 1.II.4) b) Antecedentes: | 45 |
| Objetivos:..... | 51 |
| Capítulo 1:..... | 52 |
| Evaluación de la formulación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa- ISPA para su uso profiláctico en un modelo murino de infección aguda | 52 |
| 1.I) Introducción:..... | 53 |
| 1.I.1) Selección de antígenos de <i>T. cruzi</i> : | 54 |
| 1.I.2) Trans-sialidasa como candidato vacunal:..... | 55 |

| | |
|--|-----|
| 1.I.3) Adyuvante basado en partículas inmunoestimulantes (ISPA):..... | 59 |
| 1.II) Objetivos específicos: | 61 |
| 1. III) Materiales y métodos: | 62 |
| 1.III.1) Obtención de los antígenos vacunales: | 62 |
| 1.III.1) a) Obtención de los fragmentos de TS:..... | 62 |
| 1.III.1) b) Obtención de los antígenos CP3 y ASP2:..... | 66 |
| 1.III.2) Inmunización de ratones BALB/c con las distintas formulaciones vacunales:..... | 67 |
| 1.III.2) a) Animales | 67 |
| 1.III.2) b) Formulación de los antígenos y esquema de inmunización:..... | 68 |
| 1.III.3) Evaluación de la respuesta inmune generada:..... | 70 |
| 1.III.3) a) Evaluación de anticuerpos específicos mediante técnica de ELISA..... | 70 |
| 1.III.3) b) Evaluación de la respuesta celular: reacción retardada de hipersensibilidad (DTH) | 71 |
| 1.III.4) Evaluación de la capacidad protectora de las distintas formulaciones vacunales: . | 71 |
| 1.III.4) a) Parásitos: | 71 |
| 1.III.4) b) Infección de los ratones:..... | 72 |
| 1.III.4) c) Evaluación de la parasitemia, peso, <i>score</i> clínico y supervivencia:..... | 72 |
| 1.III.5) Análisis estadístico: | 73 |
| 1. IV) Resultados: | 75 |
| 1.IV.1) Evaluación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa + CP3:..... | 75 |
| 1.IV.2) Evaluación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa:..... | 81 |
| 1.IV.3) Evaluación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa + ASP2:..... | 86 |
| 1.V)Discusión: | 94 |
| 1.VI) Conclusiones parciales:..... | 111 |
| Capítulo 2:..... | 112 |
| Evaluación de la formulación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa para su <i>uso terapéutico</i> en un modelo murino de infección crónica. | 112 |
| 2.I) Introducción:..... | 113 |
| 2.II) Objetivos específicos: | 116 |
| 2. III) Materiales y métodos: | 117 |
| 2.III.1) Evaluación terapéutica de la formulación vacunal en un modelo de infección crónica BALB/c- Sylvio X10/4. | 117 |
| 2.III.1) a) Animales: | 117 |
| 2.III.1) b) Parásitos:..... | 117 |

| | |
|--|------------|
| 2.III.1) c) Infección de los ratones: | 118 |
| 2.III.1) d) Tratamiento de los diferentes grupos experimentales: | 118 |
| 2.III.1) e) Evaluación de la infección:..... | 119 |
| 2.III.1) f) Evaluación de los diferentes tratamientos: | 121 |
| 2.III.2) Evaluación terapéutica de la formulación vacunal en un modelo de infección crónica BALB/c- Tulahuen cl2. | 126 |
| 2.III.2) a) Animales: | 126 |
| 2.III.2) b) Parásitos: | 126 |
| 2.III.2) c) Infección de los ratones: | 126 |
| 2.III.2) d) Evaluación de la infección:..... | 127 |
| 2.III.2) e) Tratamiento de los diferentes grupos experimentales: | 127 |
| 2.III.2) f) Evaluación de los diferentes tratamientos: | 128 |
| 2.III.3) Análisis estadístico: | 131 |
| 2.IV) Resultados: | 132 |
| 2.IV.1) Evaluación terapéutica de la formulación vacunal en un modelo de infección crónica BALB/c- Sylvio X10/4 | 132 |
| 2.IV.2) Evaluación terapéutica de la formulación vacunal en un modelo de infección crónica BALB/c- Tulahuen cl2 | 139 |
| 2. V) Discusión:..... | 146 |
| 2. V) Conclusiones parciales:..... | 160 |
| Conclusiones:..... | 162 |
| Bibliografía: | 164 |
| ANEXO: Información complementaria | 194 |

Abreviaturas y símbolos:

- * °C: grados centígrados.
- * α-Gal: galactosa α 1,3 galactosa.
- * µg: microgramos.
- * µl: microlitros.
- * aa: aminoácidos.
- * ADN: ácido desoxirribonucleico.
- * ADNc: ácido desoxirribonucleico copia.
- * ARN: ácido ribonucleico.
- * ASP2: de la sigla proteína de superficie de amastigote 2.
- * aTS: Trans-sialidasa activa.
- * AUC: de la sigla área bajo la curva
- * BCA: de la sigla ácido bicinconínico.
- * BCG: bacilo Calmette-Guerin.
- * BENEFIT: de su sigla evaluación de benznidazole para interrumpir la tripanosomiasis.
- * BSA: de sus sigla albúmina sérica bovina.
- * Bz: benznidazol.
- * c-di- AMP: adenosín monofosfato di cíclico.
- * CCC: Cardiopatía Chagásica Crónica.
- * CP3: de su sigla proteína quimera 3.
- * Cz: Cruzipaína.
- * Da: Dalton.
- * dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato.
- * DO: densidad óptica.
- * DTH: de su sigla hipersensibilidad de tipo retardada.
- * DTU: de su sigla unidades discretas de tipificación.
- * *E. coli*: *Escherichia coli*.
- * ECG: electrocardiograma.
- * ELISA: de su sigla ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
- * Fc: frecuencia cardíaca.

- * FDA: de su sigla Administración de Alimentos y Medicamentos.
- * Foxp3+: linfocitos T reguladores.
- * g: gramos.
- * GE: solución de guanidina EDTA.
- * GILPS: de sus sigla glicoinositolfosfolípidos.
- * GPI: de su sigla glicosilfosfatidilinositol.
- * H&E: tinción hematoxilina-eosina.
- * h: hora.
- * His: histidina.
- * IFN- γ : interferón gamma.
- * IgG: inmunoglobulina de tipo G.
- * IgG1: inmunoglobulina de tipo G subclase 1.
- * IgG2a: inmunoglobulina de tipo G subclase 2a.
- * IgM: inmunoglobulina de tipo M.
- * IL-1 β : interleucina 1 beta.
- * IL-2: interleucina 2.
- * IL-10: interleucina 10.
- * IL-12: interleucina 12.
- * IMAC: de su sigla cromatografía de afinidad por ion metal inmovilizado.
- * IMX: ISCOMATRIX.
- * iNOS: enzima óxido nitrito oxidasa.
- * IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
- * ISCOM: complejos inmunoestimulantes.
- * ISPA: de su sigla adyuvante de partículas inmunoestimulantes.
- * iTS: Trans-sialidasa inactiva.
- * *L. lactis*: *Lactococcus lactis*.
- * LB: medio de cultivo Luria Bertani.
- * M: molar.
- * MAP: de su sigla proteína de unión a microtúbulos.
- * MHC: de sus siglas complejo mayor de histocompatibilidad.
- * min: minutos.
- * ml: mililitros.
- * mM: milimolar.

- * *M. Bovis: Mycobacterium bovis*
- * NADPH: de sus siglas en inglés nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
- * NI: grupo control no infectado ni tratado.
- * NK: de sus siglas células asesinas naturales.
- * NLR: receptores tipo NOD.
- * nm: nanómetro.
- * NO: de su sigla óxido nítrico.
- * Nx: Nifurtimox.
- * OMS: Organización Mundial de la Salud.
- * P: tinción de rojo de picosirius.
- * PAGE: de su sigla electroforesis en gel de poliacrilamida.
- * pb: pares de bases.
- * PBS: de su sigla tampón fosfato salino.
- * PCR: de su sigla reacción en cadena de la polimerasa.
- * qPCR: de su sigla reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real.
- * QTc: intervalo QT corregido.
- * ROS: de su sigla especies reactivas del oxígeno.
- * Rpm: revoluciones por minuto.
- * SAPA: antígeno repetitivo de la fase aguda.
- * SDS: dodecilsulfato de sodio.
- * SIA: ácido siálico.
- * *T. brucei: Trypanosoma brucei.*
- * *T. cruzi: Trypanosoma cruzi.*
- * *T. gondii: Toxoplasma gondii.*
- * *T. rangeli: Trypanosoma rangeli.*
- * T CD4+: Linfocitos T CD4.
- * T CD8+: Linfocitos T CD8.
- * TH1: linfocito T helper 1.
- * TH2: linfocito T helper 2.
- * TLR: receptores tipo Toll.
- * TLR2: receptores tipo Toll 2.
- * TLR4: receptores tipo Toll 4.

- * TLR7: receptores tipo Toll 7.
- * TLR9: receptores tipo Toll 9.
- * TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina.
- * TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
- * TS: Trans-sialidasa.
- * TSf: fragmento carboxilo terminal de la TS.
- * TSm: Trans-sialidasa mutada.
- * TSNT: fragmento amino terminal de la TS.
- * TSSA: de su sigla antígeno pequeño de superficie.
- * Tyr: tirosina.
- * VLP: de su sigla partícula similar a virus.

Resumen:

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Actualmente se calcula que entre 6 a 7 millones de personas se encuentran infectadas y que por año se originan 30.000 nuevos casos de esta infección y 10.000 nuevas muertes. Inicialmente, esta enfermedad estaba confinada principalmente a América Latina, pero hoy en día ha sido detectada en muchos otros países alrededor del mundo. La enfermedad de Chagas presenta dos fases sucesivas: una primera fase aguda asintomática o con síntomas leves, que pasa desapercibida en la mayoría de los casos, seguida por la fase crónica, en la cual los pacientes pueden desarrollar síntomas, siendo el corazón el órgano más frecuentemente afectado. Actualmente existen dos drogas disponibles para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*: el Benznidazol (Bz) y el Nifurtimox (Nx). Se ha observado que estas drogas son capaces de erradicar el parásito cuando se aplican en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, hasta el momento no han mostrado ser efectivas en el control de la fase crónica, etapa en la que habitualmente es detectada la infección. Por ello, disminuir la prevalencia de enfermos de Chagas sigue siendo un desafío. En ese sentido las vacunas profilácticas y terapéuticas podrían ser alternativas adecuadas para la prevención y tratamiento de dicha enfermedad.

En la investigación de vacunas contra el *T. cruzi* se han ensayado desde parásitos vivos o atenuados hasta las más nuevas vacunas de ADN, la gran mayoría aplicadas como vacunas profilácticas, en donde ninguna ha conseguido hasta el momento la eliminación completa del parásito. En los últimos años ha surgido con elevadas expectativas el uso de vacunas terapéuticas que permitan atenuar las lesiones producidas por el parásito en la etapa crónica de la enfermedad. En base a lo expuesto, en este trabajo de tesis se ha propuesto obtener una formulación vacunal basada en subunidades proteicas de la proteína Trans-sialidasa (TS) conjugadas con otros antígenos, que sea superadora de las formulaciones anteriormente evaluadas en nuestro laboratorio para el control de la fase

aguda de la infección. Además, se propuso determinar la utilidad de una formulación vacunal como estrategia terapéutica para atenuar las lesiones producidas en la etapa crónica.

Para la evaluación de vacuna profiláctica se ensayaron dos fracciones de la proteína TS: la fracción amino terminal (TSNt) y la fracción carboxilo terminal (TSf). Con el objetivo de potenciar dichas formulaciones vacunales se evaluó una nueva quimera CP3 y la proteína ASP2. Todos estos antígenos se evaluaron en forma individual y combinados, en donde se trabajó con las siguientes mezclas: TSf+CP3, TSNt+TSf y TSNt+TSf+ASP2. Estos antígenos o mezclas de antígenos se formularon con un adyuvante de producción propia llamado ISPA (adyuvante de partículas inmunoestimulantes) y se inmunizaron ratones BALB/c con tres dosis administradas por la vía subcutánea. Una vez finalizado el esquema de inmunización y evaluado la respuesta inmune generada por ELISA y DTH, se procedió a desafiar los ratones con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen cl2. Se evaluó la parasitemia, la supervivencia, el peso y desarrollo de manifestaciones clínicas. De todas las proteínas evaluadas de forma independiente, el fragmento TSNt mostró los mayores niveles de protección alcanzando una supervivencia del 100%-60% en comparación con el grupo control que mostró 100% de mortalidad. Con respecto a las mezclas de antígenos ensayadas se observó que la mezcla TSNt+TSf logró los mejores resultados mejorando el desempeño de los antígenos por separado, con porcentajes de supervivencia del 80%, la menor parasitemia y el menor desarrollo de síntomas clínicos. El agregado de CP3 no mostró complementar al antígeno TSf y la presencia de ASP2 en la mezcla TSNt+TSf mostró disminuir la capacidad protectora de dicha formulación vacunal, reduciendo la supervivencia al 20% y presentando los valores más altos de parasitemia y de signos clínicos asociados.

En cuanto a la evaluación de la formulación vacunal como tratamiento de la fase crónica de infección, se empleó al antígeno TSNt-ISPA, teniendo en cuenta su eficacia como candidato vacunal. Se ensayó también el desempeño de la droga parasiticida Bz sola, sin combinar, y se probó un tratamiento mixto TSNt+Bz. Se trabajó con dos modelos de infección crónica diferentes, un modelo BALB/c- Sylvio X10/4 y otro modelo más

virulento, BALB/c- Tulahuen cl2. Se infectaron los ratones al iniciar el experimento y al día 120 post infección (fase crónica) se administraron las dos estrategias. La formulación TSnt-ISPA se administró en tres dosis subcutáneas y el Bz se aplicó durante 30 días consecutivos en una dosis de 100 mg/kg/día. A distintos días post infección se evaluó la parasitemia y el día 265. Se finalizaron los experimentos, en donde se realizaron electrocardiogramas (ECG) y se evaluó la carga parasitaria en corazón. Se observó que la formulación vacunal TSnt-ISPA logró disminuir la parasitemia, redujo el porcentaje de arritmias en los ECG y mostró una tendencia a disminuir la carga parasitaria en corazón. El tratamiento con Bz, en cambio, no logró la misma efectividad. El tratamiento mixto TSnt+Bz mostró un efecto sinérgico significativo obteniéndose bajos valores de parasitemia, una gran disminución del porcentaje de arritmias detectadas y disminuyó los parámetros QRS y QTc de los ECG.

De los resultados obtenidos se concluye que de todos los antígenos evaluados como candidatos para vacunas profilácticas, el fragmento TSnt fue el que arrojó los mejores resultados de protección; en cuanto a las mezclas ensayadas, observamos que TSnt+TSf presentó los mayores niveles de protección y que el agregado de otras proteínas, como ASP2, no favorece al desempeño de dicha formulación. En cuanto al análisis de los tratamientos aplicados en la fase crónica de infección, observamos que la formulación vacunal TSnt-ISPA mostró ser un tratamiento efectivo, a diferencia del Bz, ya que mejoró el número de alteraciones electrocardiográficas encontradas, así como la carga parasitaria en corazón. Sin embargo, la combinación de ambos tratamientos, TSnt+Bz, resultó notablemente sinérgica ya que redujo significativamente la parasitemia, las arritmias encontradas y disminuyó los parámetros de ondas de los ECG dentro de los valores normales.

Abstract:

Chagas disease, also called American trypanosomiasis, is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Currently it is estimated that 6 to 7 million people are infected and 30,000 new cases of this infection and 10,000 new deaths occur per year. Initially, this disease was confined mainly to Latin America, but today it has been detected in many other countries around the world. Chagas disease presents two successive phases: a first acute phase that goes unnoticed in most cases, followed by a chronic phase in which patients can develop symptoms. In this phase, the heart is the most frequently affected organ. There are two available drugs for the treatment of *T. cruzi* infection: Benznidazole (Bz) and Nifurtimox (Nx). It has been observed that these drugs are capable of eradicating the parasite when they are supplied in the acute phase of the disease; however, so far, they have not been shown to be effective in controlling the chronic phase of the disease, stage in which the disease is usually detected. Therefore, reducing the prevalence of patients affected with chronic Chagas disease continues to be a challenge. In this sense, prophylactic and therapeutic vaccines could be a suitable alternative for the prevention and treatment of this disease.

In the research of vaccines against *T. cruzi*, it has been tested since live or attenuated parasites to the newest DNA vaccines, the vast majority applied as prophylactic vaccines where none has achieved complete elimination of the parasite so far. In recent years, the use of therapeutic vaccines has emerged with great prospects to mitigate the lesions produced by the parasite in the chronic stage of the disease. This thesis work aimed to obtain a vaccine formulation based on protein subunits of the Transsialidase protein (TS) conjugated with other antigens, which can be superior to the formulations previously evaluated in our laboratory for control of the acute phase of infection. In addition, it was proposed to determine the usefulness of a vaccine formulation as a therapeutic strategy to attenuate the lesions produced in the chronic stage.

For the evaluation of the prophylactic vaccine, two fractions of the TS protein were tested: the amino terminal fraction (TSNt) and the carboxyl terminal fraction (TSf). In order to enhance these vaccine formulations, a new CP3 chimera and the ASP2 protein were evaluated. All these antigens were assessed alone and in combination, where the following mixtures were used: TSf+CP3, TSNt+TSf, TSNt+TSf+ASP2. These antigens or antigen mixtures were formulated with a self-produced adjuvant called ISPA and BALB/c mice were immunized with them, administering three subcutaneous doses. Once the immunization scheme had been completed and the resulting immune response was evaluated by ELISA and DTH, the mice were challenged with 1000 Tulahuen cl2 trypomastigotes. Parasitaemia, survival, weight and development of clinical symptoms were then evaluated. Of all the proteins evaluated separately, the TSNt fragment showed the highest levels of protection reaching a survival of 100% -60% compared to the control group that showed 100% mortality. Regarding the antigen mixtures that were tested, it was observed that the TSNt+TSf mixture achieved the best results, improving the performance of the antigens separately, with survival rates of 80%, the lowest parasitemia and the lowest rate of development of clinical signs. The addition of CP3 did not complement the TSf antigen and the presence of ASP2 in the TSNt+TSf mixture showed a decrease in the protective capacity of said vaccine formulation, reducing survival to 20% and showing the highest values of parasitemia and clinical signs of disease.

Regarding the evaluation of the vaccine formulation as a treatment for the chronic phase of infection, the TSNt-ISPA antigen was used. The performance of the parasitocidal drug Bz alone, was tested as well as a mixed TSNt+Bz treatment. Two different chronic infection models were used, a BALB/c-Sylvio X10/4 and another more virulent model, BALB/c-Tulahuen cl2. The mice were infected at the beginning of the experiment and around a 120 day post infection (chronic phase) the different treatments were started; the TSNt-ISPA formulation was applied in three subcutaneous doses and the Bz was administered orally for 30 consecutive days in a 100 mg/kg/day dose. Parasitaemia was evaluated at different days post infection, completing the experiments on day 265, when an evaluation by electrocardiogram (ECG) and parasite load in cardiac tissue was

performed. It was observed that the TSNT-ISPA vaccine formulation reduced the parasitaemia, the percentage of arrhythmias in the ECGs and showed a tendency to decrease the parasite load in the heart. Treatment with Bz, on the other hand, did not achieve the same effectiveness. The mixed treatment TSNT+Bz showed synergy, obtaining the lowest parasitemia values in both infection models; in the same line, the percentage of arrhythmias decreased and it was the only group to show improvements on the QRS and QTc parameters of the ECGs.

Taking in mind this results, it is concluded that of all the antigens evaluated as candidates for prophylactic vaccines, the TSNT fragment was the one that gave the best protection and, regarding the mixtures tested, we observed that TSNT+TSf presented the highest levels of protection. The addition of other proteins, such as ASP2, did not improve the performance of this formulation. Regarding the analysis of the treatments applied in the chronic phase of infection, we observed that the TSNT-ISPA formulation proved to be an effective treatment, unlike Bz, since it improved the alterations found in the ECG as well as the parasitic load in the heart. However, the combination of both treatments, TSNT+Bz, resulted in a notable synergy since it allowed to obtain the lowest values of parasitemia, a decrease in the percentage of arrhythmias and electrocardiographic parameters that resulted similar to the uninfected group.

Introducción:

**Antecedentes de la problemática de la
Enfermedad de Chagas e importancia del
desarrollo de una vacuna para controlar la
infección por *T. cruzi***

1.1) Enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas, también llamada como tripanosomiasis americana, es una enfermedad causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1909, en Mina Gerais Brasil y años después sus estudios fueron confirmados por los aportes de Salvador Mazza en Argentina. Curiosamente, Charles Darwin ya había descrito en su libro "Viaje de un naturalista alrededor del mundo" dentro del capítulo "Nubes de langostas. La Benchuca, enorme chinche negra de las Pampas" su encuentro con el vector en marzo de 1835 mientras se encontraba en Chile. A su regreso a Inglaterra, Darwin se mantuvo asintomático hasta 1841, cuando comenzó a manifestar síntomas cardíacos y gastrointestinales que empeoran hasta afectarlo gravemente falleciendo de un ataque cardíaco el 19 de abril de 1882. Con el paso de los años se ha asociado lo descrito en dicho capítulo con la condición de salud que se fue manifestando en Darwin, planteando la hipótesis de que los males de Darwin se originaron en el Mal de Chagas, afección contraída en sus viajes por Chile y Argentina, zona endémica de la enfermedad [1].

Actualmente se calcula que entre 6 a 7 millones de personas alrededor del mundo se encuentran infectadas y que por año se originan 30.000 nuevos casos de esta infección, produciéndose un total de 10.000 muertes al año por dicha enfermedad [2]. Inicialmente, la enfermedad de Chagas estaba confinada a las zonas rurales de la Región de las Américas, principalmente en América Latina. Debido a la gran movilidad de la población en los últimos decenios, la mayoría de las personas infectadas han pasado a vivir en entornos urbanos y la enfermedad se ha ido detectando cada vez más en los Estados Unidos, Canadá, en muchos países europeos y en algunos africanos [3].

En 14 de abril del el año 2020 la comunidad global celebró el primer Día Mundial de la Enfermedad de Chagas, cuyo evento buscó visibilizar a una de las enfermedades tropicales más desatendidas a pesar de que se descubrió hace más de un siglo. "La enfermedad de Chagas se ha asociado durante mucho tiempo con poblaciones principalmente pobres, rurales y marginadas y se caracteriza por la pobreza y la

exclusión”, dijo el Dr. Mwelecele Ntuli Malecela, Director del Departamento de Control de Enfermedades Tropicales Desatendidas de la OMS. "Es hora de que acabemos con esta negligencia y el estigma social asociado con la infección que se erige como una barrera importante para la detección, el diagnóstico, el tratamiento y el control eficaz". Las consecuencias del estigma asociado a la enfermedad de Chagas conducen al rechazo social, ya que las personas que padecen la enfermedad pueden enfrentar restricciones laborales, porque a menudo se asocia con problemas de salud y posibles dificultades para realizar el trabajo, y es por estas razones que las personas se muestran reacias a buscar ayuda médica, lo que lleva a manifestaciones clínicas más graves con complicaciones finales y una mayor propagación de la enfermedad [4] (Figura 1).



Figura 1: Volantes de difusión emitidos por la OMS para la visibilización de la Enfermedad de Chagas, año 2020 [4].

En Argentina se calcula que existen alrededor de 2 millones de personas infectadas, en donde el 30% de ellos pueden presentar alteraciones cardíacas de distinto grado a lo largo de su vida. La mayor cantidad de nuevos casos de la Enfermedad de Chagas se produce antes de los 14 años, sobre todo en menores de 5 años [5].

1.1.1) Agente etiológico de la enfermedad: *Trypanosoma cruzi*

1.1.1) a) El parásito:

El parásito *Trypanosoma cruzi* es un protista del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, caracterizado por la presencia de un único flagelo y una sola mitocondria. El genoma mitocondrial se encuentra ordenado en una compleja y compacta región (dentro de la propia mitocondria y cerca de la base del flagelo), denominada kinetoplasto (Tabla 1). Es un parásito intracelular con un ciclo de vida complejo que involucra animales vertebrados e invertebrados.

Tabla 1: Clasificación taxonómica del *T. cruzi*.

| Taxonomía | Característica |
|----------------------------------|--|
| Súper Reino: Eucariota | Posee núcleo verdadero. |
| Reino: Protista | Organismos unicelulares. |
| Phylum: Sarcomastigophora | Locomoción mediante flagelos. |
| Sub-phylum: Mastigophora | Presentan un pequeño número de flagelos, se reproducen por fisión binaria y en algunos grupos por reproducción sexual. |
| Clase: Zoomastigophorea | Huésped animal. |
| Orden: Kinetoplastida | Presencia de kinetoplasto. |
| Familia: Trypanosomatidae | Posee un único flagelo libre, que nace cerca del kinetoplasto, con una membrana ondulante. |
| Género: Trypanosoma | Requiere de dos huéspedes, uno invertebrado y el otro vertebrado para completar su ciclo biológico. |
| Especie: Cruzi | Causante de la enfermedad de Chagas. |

1.1.1) b) El genoma de *T. cruzi* y su clasificación en unidades discretas de tipificación:

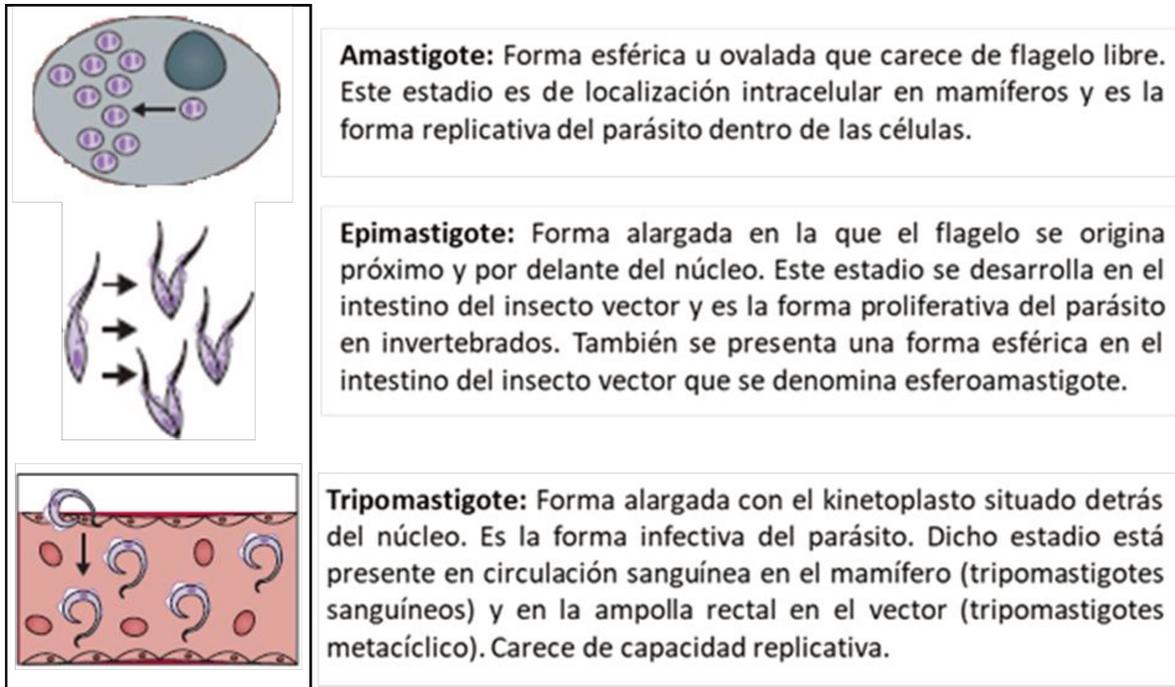
El parásito *T. cruzi* es básicamente un organismo diploide y su genoma está distribuido en pares de cromosomas homólogos que pueden variar en número y tamaño a lo largo de las diferentes cepas [6], [7]. Esta característica y las grandes diferencias en el contenido de ADN entre cepas indican una alta plasticidad del genoma y su posible participación en la generación de diversidad genotípica y fenotípica [8].

El consenso para la nomenclatura de *T. cruzi* fue propuesto en 2009 en donde se reconoció un mínimo de seis linajes genéticos o unidades de tipificación discretas (DTU), denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (o DTU I- VI) [9]. Para esta recomendación se consideraron estudios previos que dividieron al *T. cruzi* en distintos grupos basados en el patrón de marcadores genéticos, bioquímicos o biológicos. También se ha considerado una potencial séptima DTU restringida a murciélagos: Tcbat [10], la cual ha mostrado poseer diferentes marcadores moleculares, lo que apoya a la clasificación de esta como una nueva DTU [11]. Esta diversidad entre las distintas DTU ha sido demostrada por diferencias en morfología de las formas sanguíneas, virulencia, patogenicidad, susceptibilidad a los agentes terapéuticos, propiedades inmunológicas e infectividad en las células del huésped [12]. Además, ha sido asociada con la distribución geográfica: mientras que TcI está principalmente asociado a América Central y al sur de Estados Unidos; TcII, TcV y TcVI se encuentra asociado a los países del sur de Latinoamérica [13]. En Argentina se ha encontrado una prevalencia de las DTU TcV y TcVI identificadas principalmente en triatominos, perros y humanos [14]–[16].

1.1.1) c) Ciclo de vida del parásito:

El *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo y adopta diferentes formas en su evolución, las cuales poseen características propias que reflejan su adaptación a los

distintos hábitats por los que deben pasar durante su ciclo evolutivo. Los principales estadios del parásito se ilustran en la Figura 2:



Amastigote: Forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre. Este estadio es de localización intracelular en mamíferos y es la forma replicativa del parásito dentro de las células.

Epimastigote: Forma alargada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo. Este estadio se desarrolla en el intestino del insecto vector y es la forma proliferativa del parásito en invertebrados. También se presenta una forma esférica en el intestino del insecto vector que se denomina esferoamastigote.

Tripomastigote: Forma alargada con el kinetoplasto situado detrás del núcleo. Es la forma infectiva del parásito. Dicho estadio está presente en circulación sanguínea en el mamífero (tripomastigotes sanguíneos) y en la ampolla rectal en el vector (tripomastigotes metacíclico). Carece de capacidad replicativa.

Figura 2: Representación gráfica de los tres estadios del *Trypanosoma cruzi*. (Imagen adaptada de Perez-Molina y Molina, 2018 [17]).

Se podría considerar que el ciclo de este parásito comienza cuando el triatomino (vector de la enfermedad) succiona sangre proveniente de una persona o animal infectado con *T. cruzi* en su estadio tripomastigote. Una vez ingerido, la mayor parte de los parásitos son lisados en el estómago del insecto y aquellos que logran sobrevivir, se transforman pocos días después en epimastigotes. Estos últimos migran luego al recto del insecto, donde pasan a la forma tripomastigotes metacíclicos. Este ciclo continúa cuando el triatomino infectado pica a otra persona o animal para alimentarse, momento en el cual defeca, liberando junto con las heces a los tripomastigotes metacíclicos. Esto ocurre normalmente de noche y genera prurito. La infección del nuevo huésped sucede a través de las mucosas o la piel lesionada, luego de que la persona o animal se rasque la picadura

del insecto o la persona se lleve las manos con parásitos hacia la boca u ojos [18] (Figura 3).

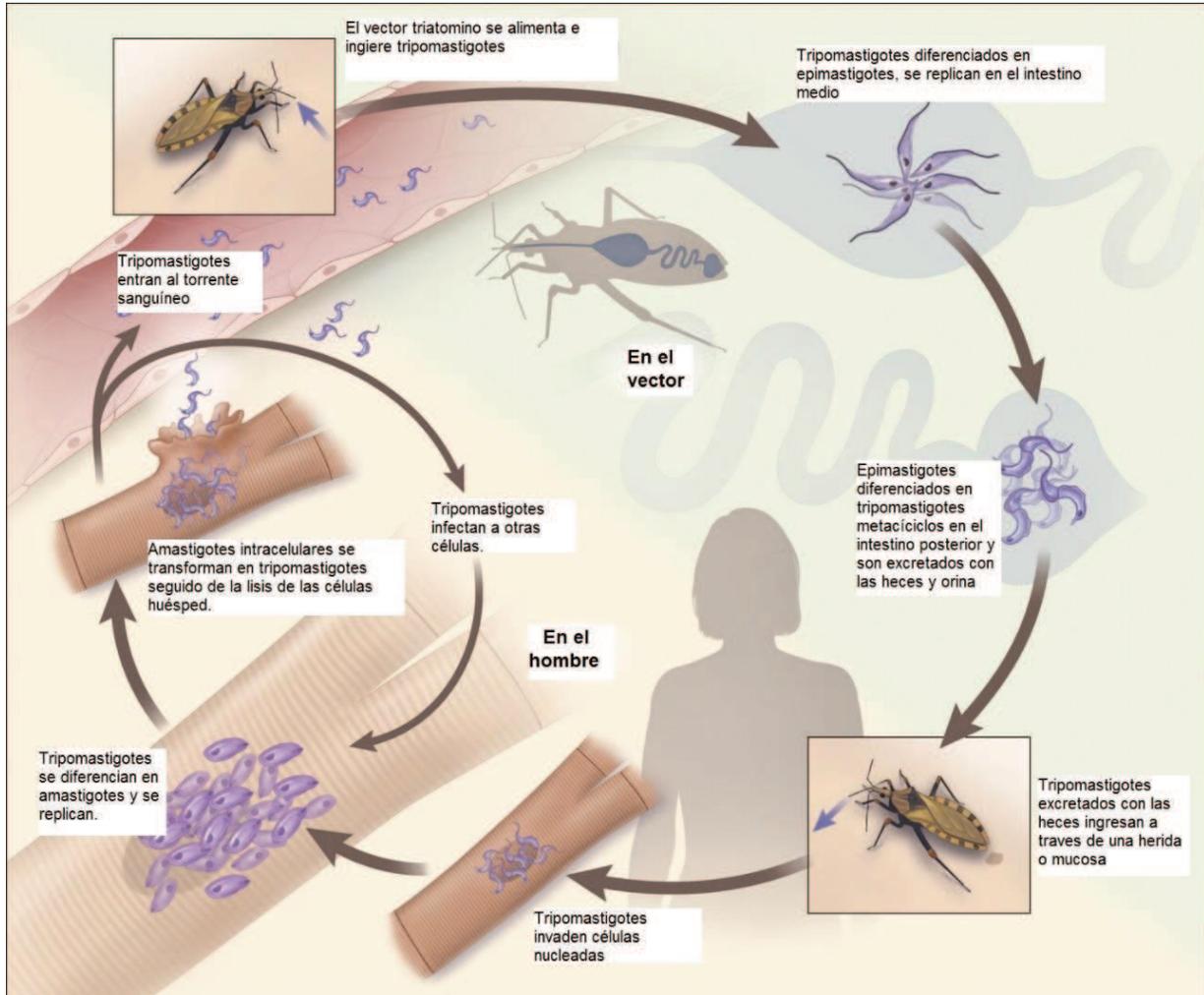


Figura 3: Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Imagen adaptada de Bern, 2015 [18].

Una vez dentro del huésped vertebrado, los tripomastigotes invaden las células en el sitio de inoculación a través de un reconocimiento específico entre el parásito y las células de los mamíferos, el cual involucra numerosas moléculas presentes en ambos tipos de células [19]. El proceso de entrada del *T. cruzi* a la célula fue clásicamente dividido en dos pasos específicos: el proceso de adhesión, relacionado a la unión de los antígenos de *T. cruzi* a los receptores de la célula huésped, el cual dispara eventos de señalización

celular; y el proceso de internalización, que describe el mecanismo que culmina en la formación de una vacuola parasitófora de *T. cruzi* [20]. Se han propuesto dos modelos diferentes para la invasión de los tripomastigotes y la formación de esta vacuola parasitófora: activando la exocitosis lisosomal o induciendo un proceso similar a la endocitosis. Ambos procesos coinciden en la ausencia de protuberancias (y microfilamentos) de la membrana plasmática, pero difieren en la fuente de la membrana que envuelve inicialmente al parásito. Una vez formada la vacuola parasitófora del *T. cruzi* se produce una fusión con los lisosomas celulares que originan una maduración de esta, hecho fundamental para el progreso de la infección [22] (Figura 4). Esta fusión lisosomal podría atribuirse al inicio del proceso de diferenciación de tripomastigotes a amastigotes inducido en parte por el pH ácido ganado por la vacuola durante este proceso [23]. Estos amastigotes generados lisan la membrana de la vacuola con enzimas propias y entran en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped, dando lugar a la reproducción asexual por fisión binaria (Figura 4). Una vez instalado estos amastigotes dentro de la célula huésped pasan al estadio tripomastigote, los cuales son liberados durante la ruptura celular, infectando otras células o re-ingresando al torrente sanguíneo [24] (Figura 3).

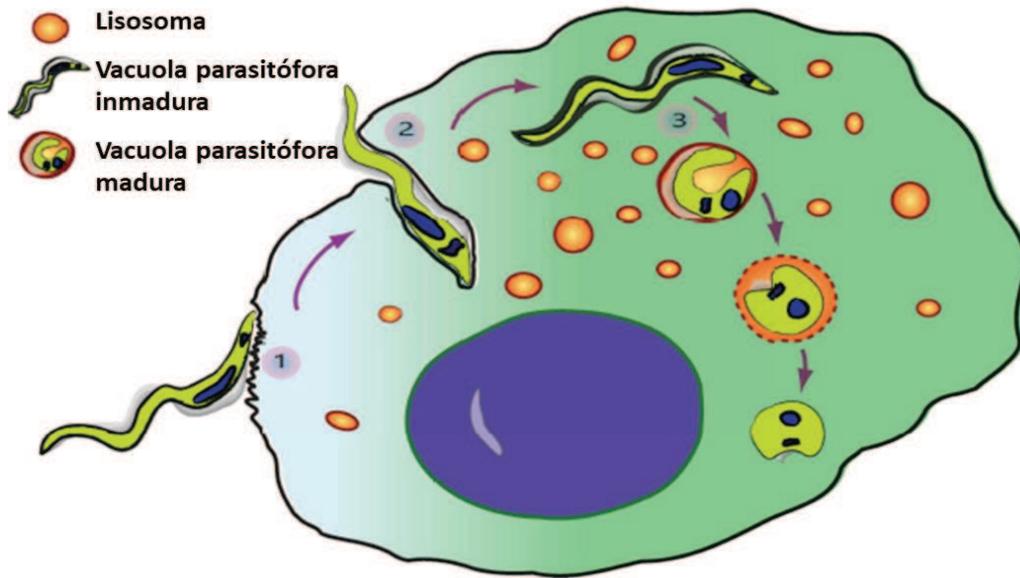


Figura 4: Pasos involucrados en la invasión celular del *T. cruzi*. El esquema sintetiza el proceso de entrada del *T. cruzi* en las células huésped. **(1)** Adhesión de tripomastigotes a la superficie celular. **(2)** Internalización de tripomastigotes producido por una invaginación de la membrana plasmática. **(3)** Proceso de maduración de la vacuola parasitófora después de la fusión con los lisosomas lo que inicia la diferenciación del *T. cruzi* de tripomastigotes a amastigotes. Imagen adaptada de Salassa y Romano, 2019 [22].

1.1.2) Vector de la enfermedad: Triatominos

Los triatominos son insectos pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae; son hematófagos y sirven como vectores al *T. cruzi*. Estos insectos se encuentran principalmente en América Latina, pero también se los ha detectado en algunas partes de Estados Unidos, como es el caso de Texas [25], [26]. Los vectores más importantes son el *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay Uruguay y Perú; el *Rhodnius prolixus* en Colombia, Venezuela y Centroamérica, el *Triatoma dimidiata* en Ecuador y América Central y el *Rhodnius pallescens* en Panamá [3] (Figura 5).



Figura 5: Fotografía de un *Triatoma dimidiata* capturado en Honduras. Imagen extraída de la página web de la OMS: “La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana),” 2020 [2].

Estos insectos transmiten el *T. cruzi* no solo a humanos sino también a múltiples animales domésticos (perros, gatos, cabras, etc.) y animales salvajes (roedores, mapaches, armadillos, entre otros) y se han adaptado a convivir con humanos, habitando en recovecos y grietas de las paredes y en corrales de animales ubicados en el peridomicilio [27] (Figura 6). Esta adaptación al ambiente humano se ha dado como resultado de las actividades del hombre sobre el medioambiente, que afectaron fuertemente la ecología de vectores y huéspedes [28].



Figura 6: Casas rurales y estructuras peridomiciliarias típicas en los distritos de La Asunción y San José, Mendoza, Argentina, en donde se han encontrado *Triatoma infestans*. **A)** Domicilio hecho de barro y caña. **B)** Interior de un domicilio hecho con techo de caña. **C)** Corrales de cabras y gallineros. **D)** Corral de cabras típico con paredes de ramas apiladas. (Imagen adaptada de Carbajal-de-la-Fuente et al., 2017 [27]).

Actualmente, en nuestro país, se considera que existen alrededor de 16 especies diferentes de triatomíneos, siendo el *Triatoma infestans* (comúnmente llamado Vinchuca) la más problemática ya que actúa como vector del *T. cruzi*. Para que las personas puedan distinguir a este triatomíneo del resto, se lanzó en el año 2018 una aplicación para teléfonos celulares llamada GeoVin, la cual tiene como objetivo que los ciudadanos de cualquier punto del país puedan enviar sus fotografías para que expertos determinen si se trata de *T. infestans* o no. En caso de que así sea, toda la información pasa a los entes de control para que activen las medidas preventivas ante un posible riesgo epidemiológico, creándose así la primera base de datos actualizada sobre la distribución geográfica de las vinchucas en nuestro país para poder prevenir así su proliferación [29].

1.1.3) Vías de transmisión:

Existen diferentes mecanismos por los cuales se puede transmitir el *T. cruzi*, aunque la vía vectorial, mediada por el insecto vector y descrita en el apartado “1.1.1 c) Ciclo de vida del parásito”, es considerada la forma clásica de transmisión. Hoy en día, gracias al esfuerzo de muchos países para controlar al insecto vector, se ha reducido drásticamente esta vía de infección [30].

Otra vía de transmisión es a través de transfusiones de sangre y transplante de órganos, que se ha dado debido al constante movimiento migratorio de personas de zonas endémicas hacia zonas no endémicas y la falta de los controles respectivos. Actualmente, en los bancos de sangre de los países de Latinoamérica y en la mayoría de los países Europeos, se realizan pruebas para detectar la presencia de *T. cruzi* en las muestras y evitar así la transmisión de este parásito por esta vía [31].

Por otro lado, la transmisión materno-fetal del *T. cruzi* (vía vertical) es un nuevo desafío en políticas de salud e investigación aún mayor que el de las otras vías de transmisión, teniendo en cuenta que el control de Triatomíneos llevado a cabo en zonas endémicas y el apropiado control de muestras de sangre que interrumpen la transmisión del parásito han sido muy exitosos. En esta vía vertical, el parásito atraviesa la placenta y se dirige al feto en donde el éxito o el fracaso de esta infección congénita dependen de las interacciones entre el parásito, la placenta, la madre y el feto [32]. Se ha reportado que esta vía de transmisión ocurre en un 1-12% de las embarazadas y se relaciona con el nivel de parásitos en sangre que presenta la madre gestante [33]. En nuestro país la tasa de transmisión de *T. cruzi* por esta vía ocurre en un 6% [34] y se estima que nacen alrededor de 9.000 bebés infectados con este parásito por año en Latinoamérica [3].

El *T. cruzi* también se puede transmitir por vía oral, la cual se produce por la ingesta de alimentos contaminados con heces de triatomíneos o de mamíferos infectados. Esto es posible ya que este parásito es capaz de invadir el epitelio gástrico, resistiendo a la lisis proteolítica del estómago mediante la presencia de proteínas específicas [35], [36]. En los últimos años se han descrito, con tendencia al incremento, brotes de Chagas oral en

Brasil, Colombia, Venezuela y Bolivia, entre otros países, por la ingesta de tripomastigotes presentes en bebidas y otros alimentos contaminados [37]–[39]. Asimismo, se ha puesto en evidencia la supervivencia de *T. cruzi* en las bebidas durante más de 24 h de la contaminación, ventana de tiempo que permite la fácil transmisión del parásito por vía oral [40], manifestándose con una alta mortalidad y peor pronóstico [41], [42]. Se cree que este mecanismo podría haber sido la forma ancestral y más frecuente de transmisión entre mamíferos salvajes y domésticos [43].

Por último, la vía de transmisión sexual es un tópico bajo estudio, ya que si bien ha sido sugerida desde hace mucho tiempo, pocos estudios han sido publicados sobre ello [44]. Evaluaciones realizadas en modelos murinos de infección demostraron que después del encuentro sexual entre ratones infectados y sanos, los ratones sanos mostraron presencia de *T. cruzi*, lo que indicaría que la transmisión por esta vía es posible [45]–[47]. En humanos, se han estudiado familias que padecían la Enfermedad de Chagas, en donde se halló ADN de *T. cruzi* en muestras de semen y, al combinar la información clínica de estas personas, establecieron que la transmisión sexual puede ser posible [48]. Sin embargo, estudios adicionales son requeridos para confirmar este hecho.

1.1.4) Patología de la infección:

La enfermedad de Chagas presenta dos fases o etapas sucesivas, una primera etapa aguda, seguida por la etapa crónica.

1.1.4) a) Fase aguda de la enfermedad:

Esta etapa comienza inmediatamente luego de la infección por *T. cruzi*. En la mayoría de los casos es asintomática, puede durar entre seis a ocho semanas y se caracteriza por una elevada parasitemia en sangre [49]. En aquellos casos en los que se evidencian síntomas, los individuos infectados pueden presentar fiebre, escalofríos,

náuseas, vómitos o diarrea. También se puede observar una gran lesión inflamatoria en el punto de entrada del parásito, conocida como chagoma. Si la inoculación fue a través de la mucosa conjuntival, se produce lo que se conoce como signo de Romaña, que es el único signo propio de la infección por *T. cruzi* [50] (Figura 7). En muy pocos casos se desarrollan problemas más severos en esta etapa como miocarditis aguda o meningoencefalitis que pueden ser fatales, siendo su prevalencia más alta en personas menores de 5 años, ancianos, inmunocomprometidos o en los casos en los que hubo una elevada ingesta de parásitos. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos se presenta escasa sintomatología por lo que la infección pasa desapercibida para el huésped, siendo comúnmente diagnosticada en el estadio crónico de la enfermedad [30], [51]. Aquellos bebés recién nacidos que se encuentran infectados congénitamente presentan también una fase aguda asintomática o síntomas leves y solo una minoría presenta una enfermedad grave que amenaza con su vida [32]. Para el caso de la transmisión de *T. cruzi* por vía oral, la fase aguda que se produce es mucho más severa, ocasionando mayor mortalidad que las otras vías de contagio [42], [52]

La detección de la infección en esta etapa aguda se puede realizar mediante microscopia y/o PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) debido a la alta parasitemia en sangre que presenta el huésped [17], [53].



Figura 7: Fotografía de paciente con sintomatología de fase aguda. Chagoma, provocado por la infección por *T. cruzi* (Imagen adaptada de Barrett et al., 2003 [54]).

1.1.4) b) Fase crónica de la enfermedad:

Al finalizar la etapa aguda, todos los individuos infectados ingresan en una fase crónica, la cual puede ser subdividida en dos etapas diferentes: fase crónica asintomática (o indeterminada) y fase crónica sintomática.

1.1.4) b.1) Fase crónica asintomática o indeterminada:

Esta fase se caracteriza por la ausencia de manifestaciones clínicas. Estas personas muestran resultados normales en estudios radiológicos de corazón, esófago y colon, y no presentan variaciones en los electrocardiogramas [17]. No obstante, pese a ser asintomáticos, estos pacientes presentan anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, mostrando la existencia de un verdadero equilibrio entre el parásito y el hospedero. Esta fase puede durar años o incluso la vida entera [55].

1.1.4) b.2) Fase crónica sintomática:

Alrededor del 30% de las personas infectadas evolucionan a una fase crónica sintomática, mientras que el resto permanece en un estadio indeterminado de la enfermedad. Esta fase puede manifestarse años o décadas después de la infección inicial, aunque generalmente aparece entre la segunda y la cuarta década de vida del paciente, luego de cinco a quince años de la infección inicial. Las manifestaciones clínicas en esta etapa están relacionadas con daños patológicos en el corazón, esófago y/o colon (Figura 8) [55].

El corazón es el órgano más afectado en este estadio crónico, lo que podría deberse al particular tropismo que el *T. cruzi* muestra por los miocardiocitos [56]. La mayoría de las personas que presentan síntomas en esta fase crónica desarrollan lo que se conoce como Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC), en donde los corazones suelen estar agrandados globalmente, con marcada alteración en tamaño y forma (Figura 8).

Aproximadamente en la mitad de las personas que desarrollan una enfermedad crónica, el corazón muestra un adelgazamiento inusual de la pared ventricular, que se abulta en forma de aneurisma, en donde la evaluación microscópica de estas áreas muestra una atrofia dramática, con la pérdida de fibras miocárdicas y su reemplazo por tejido cicatricial fibroso denso y grasa entre el endocardio y el epicardio [57].

Por otra parte, alrededor de un 10% y 15% de los infectados crónicos sufren daño digestivo, principalmente megavísceras. Los pacientes presentan dilatación del esófago y/o colon, lo que se conoce como megaesófago y megacolon (Figura 8), debido probablemente a las disfunciones neuronales ocasionadas por el parásito [58].

En esta etapa crónica, el número de parásitos en sangre disminuye considerablemente, por lo que cual el diagnóstico se centra en la detección de anticuerpos séricos contra el mismo. Para ello pueden realizarse ensayos serológicos diferentes siendo los tres más comunes: hemoaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y ELISA [49]. A esto se suman controles periódicos de electrocardiograma y radiología, que buscan signos de las manifestaciones cardíacas o digestivas [55].

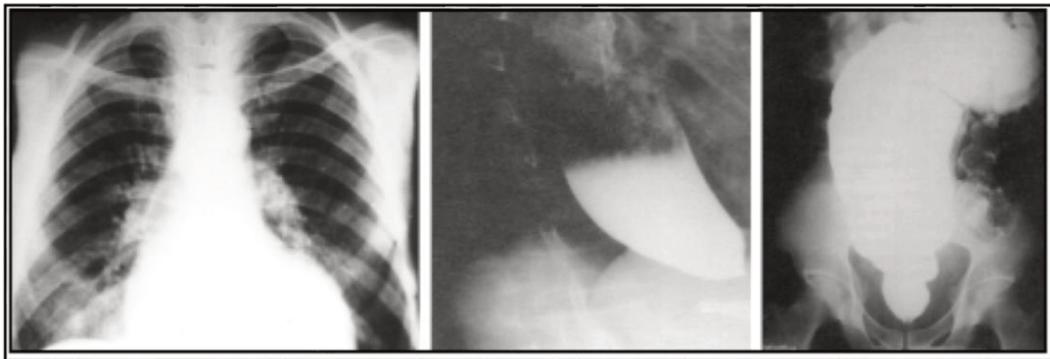


Figura 8: Radiografías de pacientes con sintomatología de fase crónica de la Enfermedad de Chagas. **A)** Cardiomegalia moderada. **B)** Megaesófago. **C)** Megacolon. Imágenes adaptada de Barrett et al., 2003 [54].

1.1.5) Aspectos inmunológicos de la infección:

Después de la infección *T. cruzi* induce una fuerte respuesta inmune innata y adaptativa en los mamíferos que juega un papel importante durante la fase aguda y crónica de la enfermedad. No obstante, esta respuesta no es lo suficientemente eficaz para lograr la eliminación completa del parásito. Para sobrevivir dentro del hospedador mamífero, y como consecuencia de una extensa historia de coevolución, *T. cruzi* ha desarrollado varios mecanismos sofisticados para evadir la acción del sistema inmunitario sin afectar críticamente a su hospedador [59].

Uno de los mecanismos de reconocimiento de la inmunidad innata más estudiados en la infección por *T. cruzi* es el que ocurre a través de la activación de los TLR (*Toll Like Receptor*). Este parásito posee múltiples ligandos de TLR que provocan una potente activación de la inmunidad innata y el subsecuente desarrollo de una respuesta inmune adaptativa. Se ha descrito que los receptores TLR2 y TLR4 son los responsables del reconocimiento de glicoproteínas (GPI-mucinas) y glicoinositolfosfolípidos (GILPSs) respectivamente, presentes en la superficie de los tripomastigotes [60]–[62]. Además, el ADN y ARN del parásito han sido identificados como potentes activadores de los TLR9 y TLR7 respectivamente [63]. También, se ha descrito la participación de los receptores solubles NLR (de sus siglas en inglés receptores tipo NOD) en la inducción de la respuesta inmune contra el parásito. Entre estos receptores se encuentran los constituidos por las proteínas NOD1 (Dominios de oligomerización de unión a nucleótidos 1) y el inflamasoma NLRP3/ASC/caspasa-1. Estos receptores solubles también parecen estar implicados en la detección del parásito y la generación de una respuesta inflamatoria [64], [65].

Este reconocimiento del *T. cruzi* por parte de los receptores presentes en las células del sistema inmune innato lleva a la activación y generación de citoquinas proinflamatorias como lo es IL-12. Esto ocurre principalmente en células dendríticas y macrófagos, que juegan un papel fundamental en el reconocimiento inicial del parásito [61]. Esta citoquina IL-12 induce la activación de las células *natural killers* (NK), las cuales parecen ser la primera fuente de IFN- γ , TNF- α y otras citoquinas pro-inflamatorias. En

particular, se ha observado que las células NK producen un pico de secreción de IFN- γ inmediatamente después de que se produce la infección [59], [66], [67]. El IFN- γ liberado es importante para la activación de macrófagos e influye en la diferenciación de LT vírgenes hacia el perfil TH1. Esta activación de los macrófagos lleva a la inducción de las enzimas óxido nítrico sintetasa (iNOS) y NAPDH oxidasa para la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales son críticas para la actividad tripanolítica [68]–[70]. Sin embargo, la generación sostenida y excesiva de estos productos, junto con una respuesta antioxidante inadecuada, podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Así, mientras las ROS son esenciales para la activación de las respuestas inflamatorias y para el control del patógeno en la fase aguda, el estrés oxidativo persistente generado por la presencia de *T. cruzi* intracelular o antígenos que perduran durante la infección crónica, pueden interactuar con las células inmunes y no inmunes en el miocardio y activar las cascadas de señalización que desencadenan la producción de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β). Estas citoquinas junto con las ROS generan hipertrofia de los miocitos cardíacos, desempeñando un papel importante en la remodelación cardíaca y la evolución de la enfermedad crónica de Chagas [71], [72].

Las células T CD4+ específicas hacia el parásito son necesarias, ya que ayudan en el control del *T. cruzi* a través de la secreción de citoquinas TH1 (IFN- γ e IL-2), la amplificación de la actividad fagocítica de los macrófagos, la estimulación de la proliferación de células B con la consiguiente producción de anticuerpos, así como con la diferenciación y activación de células T CD8+ [59]. Aunque las células TCD8+ se desarrollan lentamente en las primeras etapas de la infección, con el correr de los días alcanzan niveles importantes y son fundamentales para la resistencia y control de la patología, incluso en la fase crónica [73]. Las células invadidas por el parásito son capaces de presentar antígenos de *T. cruzi* en el contexto de MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de clase I, permitiendo su reconocimiento por células CD8+ específicas, lo cual puede llevar a la destrucción de varios tipos celulares, como miocitos, adipocitos, células epiteliales, fibroblastos, macrófagos y otros [74].

Con respecto a la respuesta humoral, existe amplia evidencia de que esta juega un papel importante en la respuesta hacia el parásito, fundamentalmente aquella compuesta de anticuerpos líticos asociados a un perfil TH1. En cambio, los anticuerpos IgM o IgG no líticos no tendrían un rol relevante durante la infección [75].

Más allá de todos los mecanismos puestos en marcha, el balance final de la etapa aguda suele ser la persistencia del parásito, la cual está sustentada por el establecimiento de un estado de inmunosupresión generalizado, que si bien impide la erradicación del parásito, reduce los daños causados por la respuesta inflamatoria que demuestra ser insuficiente para controlar la infección y que pueden llegar a ser letal en ausencia de mecanismos inmunoregulatorios. Ejemplos de estos son los ejercidos por los glucocorticoides, las células supresoras de origen mieloide, las células T regulatorias Foxp3+ y la IL-10 descritas en el proceso infección por *T. cruzi* [76]–[79].

1.1.6) Tratamiento quimioterapéutico de la infección:

Existen actualmente dos drogas disponibles para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*: el Benznidazol (Bz) y el Nifurtimox (Nx). El Bz es un derivado del nitroimidazol y funciona uniéndose de manera covalente a macromoléculas como ADN, lípidos y proteínas. El Nx es un nitrofurano que inhibe la síntesis de ácido pirúvico, lo que produce una interrupción en el metabolismo de carbohidratos produciendo la muerte del *T. cruzi*. [80].

Se ha observado que estas drogas son capaces de erradicar el parásito en aproximadamente el 50% al 80% de los casos cuando se aplican en la fase aguda de la enfermedad [81]. Sin embargo, estas drogas tripanocidas no han mostrado ser efectivas en el control de la etapa crónica de la misma. En un estudio multicéntrico denominado BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) se estudió la eficacia del Bz en la reducción de las manifestaciones clínicas en pacientes con CCC, para el cual se involucraron 2854 pacientes con una CCC establecida y se les realizó un seguimiento

por más de 5 años [82]. Como resultado de este estudio se informó que el tratamiento con Bz redujo significativamente la carga parasitaria en sangre pero que dicha disminución de carga no se correlacionó con una mejora en los problemas cardiacos a largo plazo en los pacientes [82]. Esto indica la necesidad de nuevas alternativas de tratamientos.

Otro de los inconvenientes que genera la utilización de estas drogas son los efectos secundarios que producen en las personas que los ingieren, dentro de los cuales los más frecuentes son dermatológicos, usualmente erupciones leves que responden a antihistamínicos, pero también se han descrito dermatitis grave o exfoliativa o dermatitis asociada con fiebre y linfadenopatía que llevan a la interrupción inmediata del tratamiento. Además se ha observado que el 70% de los pacientes pueden sufrir efectos secundarios gastrointestinales como anorexia, pérdida de peso, náuseas y vómitos, lo que muchas veces culmina en el abandono del tratamiento por parte de las personas [83]. Por otra parte, estas drogas parasiticidas no pueden ser aplicadas en mujeres embarazadas [84], por lo que un diagnóstico temprano en recién nacidos es esencial, más considerando el hecho que estas drogas son bien toleradas en niños en donde no hay efectos adversos [33].

1.II) Diseño racional de vacunas:

1.II.1) Introducción:

El objetivo de la vacunación es inducir una respuesta inmune protectora contra un patógeno determinado sin generar la enfermedad y las potenciales complicaciones que esta pueda conllevar [85]. Se cree que los primeros intentos de vacunar se remontan a la antigüedad, habiendo registros documentados en China para la inmunización contra la viruela en el siglo VI. Sin embargo, el primer intento científico de controlar una enfermedad infecciosa por inoculación sistemática deliberada, es el trabajo de Edward Jenner con la vacuna de la viruela bovina. El siguiente avance en vacunación fue

conseguido por Pasteur con sus estudios de vacunación contra el cólera aviar y la rabia [86].

Las vacunas se consideran uno de los mayores logros en la salud pública en el último siglo. Se ha estimado que salvan entre 2-3 millones de vidas por año y han reducido en gran medida la incidencia de varias enfermedades importantes como la poliomielitis y el sarampión [87]. Al igual que las infecciones naturales, las vacunas actúan iniciando una respuesta inmune innata, que a su vez activa una respuesta inmune adaptativa específica de antígeno. Dependiendo de la biología de la infección y de la enfermedad a prevenir, una vacuna puede requerir la inducción de diferentes mecanismos inmunitarios para ser eficaz. Por lo tanto, comprender el modo de acción de las vacunas es importante para predecir su eficacia, su perfil de seguridad y el beneficio esperado para las personas vacunadas y la población en general. Las vacunas protegen por mecanismos efectores capaces de controlar rápidamente la replicación del patógeno o inactivar sus componentes tóxicos. Entre estos mecanismos inmunes efectores activados está la respuesta de anticuerpos, producidos por linfocitos B, capaces de unir específicamente y neutralizar una toxina o patógeno específico o mediar la destrucción de éste por un mecanismo de citotoxicidad mediada por anticuerpos. Otro mecanismo efector son los linfocitos citotóxicos T CD8+, que pueden limitar la dispersión del agente infeccioso por el reconocimiento y destrucción de células infectadas o por la síntesis de citoquinas antivirales, y los linfocitos T CD4+, los cuales proveen soporte a la generación y mantenimiento de la respuesta de linfocitos B y T CD8+ [88].

Aunque las vacunas se ven principalmente como herramientas para la protección individual, las vacunas también pueden proteger a las poblaciones no vacunadas al reducir la tasa de transmisión y limitar el riesgo de exposición de las personas. Esta protección indirecta, llamada protección de rebaño o comunidad, requiere que una gran parte de la población (75-95% dependiendo del agente infeccioso la) o un grupo especial que juega un papel clave en la transmisión de la infección, esté vacunada [85].

1.II.2) Características de una vacuna:

Para el diseño racional de una vacuna, hay tres factores claves que deben ser considerados: el inmunógeno, el adyuvante y el sistema de administración controlada (*delivery*).

El **inmunógeno** es la sustancia capaz de producir una respuesta inmune específica frente a un determinado patógeno. La elección de dicho inmunógeno es fundamental en el diseño racional de una vacuna en donde debe considerarse la antigenicidad, la virulencia y la utilidad que tiene el inmunógeno para proteger contra distintas cepas de un patógeno. De todos modos, más allá de las especulaciones, solo la prueba empírica permite evaluar la funcionalidad de cada inmunógeno [88].

Los **adyuvantes o inmunopotenciadores** son sustancias agregadas a la vacuna para potenciar la inmunogenicidad del inmunógeno o redirigir su acción a un determinado perfil de respuesta, incrementando la efectividad de la misma. Los adyuvantes pueden también crear un depósito de la vacuna prolongando así su disponibilidad en un sitio particular e impidiendo su consumo inmediato, lo que permite generar una respuesta inmune prolongada en el tiempo. Estos adyuvantes se clasifican generalmente en inmunoestimulantes, vehículos, o aquellos que comparten ambas propiedades. Los inmunoestimulantes actúan directamente sobre el sistema inmune y dentro de estos se encuentran: ligandos de receptores de tipo Toll, citoquinas, saponinas y exotoxinas bacterianas. Los vehículos transportan al antígeno y a la vez sirven de matriz [89] (Figura 9).

El **sistema de administración controlada (*delivery*)** hace referencia a la vía de administración, la dosis y la estrategia de *delivery* de la vacuna. La ruta empleada por una vacuna puede ser subcutánea, intradérmica, intramuscular, endovenosa, oral, etc y para lograr la respuesta deseada en cuanto a la liberación y estabilidad del inmunógeno pueden emplearse sales minerales, macropartículas sintéticas, emulsiones, liposomas, etc [89].

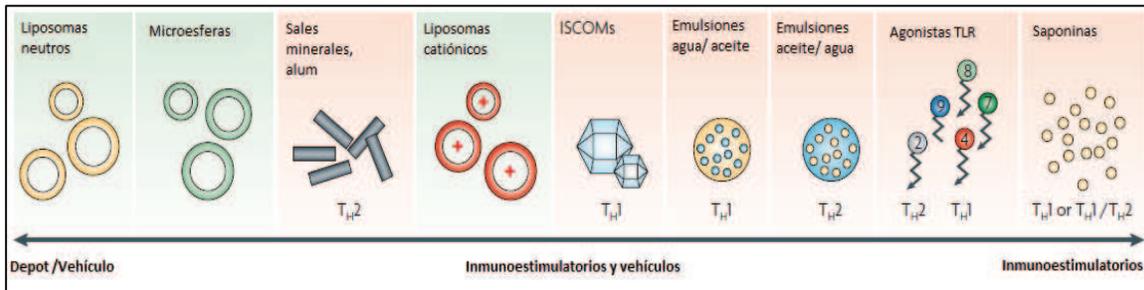


Figura 9: tipos de adyuvantes y clasificación de acuerdo al modo de acción. (Modificado de Guy, 2007 [90])

1.II.3) Tipos de vacunas:

Existen diferentes clasificaciones para las vacunas siendo la siguiente una de las clasificaciones más utilizada por los autores:

Vacunas vivas atenuadas: Contienen microorganismos vivos que infectan al huésped de una forma similar a la infección natural y por ende, generan una respuesta inmune semejante a la inducida por el microorganismo salvaje. Dichos microorganismos presentan atenuada su virulencia, lo que implica que la capacidad de causar enfermedad está virtualmente eliminada. En este tipo de vacunas, al estar vivos los microorganismos, estos son capaces de replicarse dentro del hospedero durante un tiempo, lo que permite generar una respuesta inmune fuerte y constante. Sin embargo, estas vacunas tienen la gran desventaja del riesgo que implica la posibilidad de que los microorganismos reviertan hacia la forma virulenta y están contraindicadas para personas inmunocomprometidas y embarazadas [85]. Muchas de las primeras vacunas que se produjeron consistieron en vacunas vivas atenuadas, como la vacuna contra la rabia, la viruela, la tuberculosis, la fiebre amarilla y la vacuna oral de la polio, algunas de las cuales todavía están en uso [91].

Vacunas muertas o inactivadas: este tipo de vacunas poseen microorganismos enteros que han sido inactivados por medios físicos o químicos, de manera tal que no puedan multiplicarse o diseminarse para causar la enfermedad. Estos agentes inactivos exponen una gran variedad de inmunógenos al sistema inmune para estimular una

respuesta protectora. El tipo de respuesta inmune que generan estas vacunas se caracteriza por una fuerte respuesta humoral, pero baja respuesta citotóxica, lo que está relacionado principalmente con la incapacidad del microorganismo de replicarse. Al contrario de lo que sucede con las vacunas vivas atenuadas, estas no presentan riesgo de reversión y por lo tanto son más seguras que las primeras [85]. Los enfoques de inactivación se utilizaron por primera vez para crear vacunas contra patógenos como la fiebre tifoidea, la peste y el cólera. Los ejemplos actuales de vacunas inactivadas incluyen la vacuna inactiva contra el virus de la polio, vacunas contra la tos ferina, rabia y hepatitis A [92].

Vacunas de ADN y ARN: La base de este concepto es la introducción de ADN plasmídico o ARN desnudo que codifican transgenes antigénicos, capaces de sintetizarse dentro de las células del huésped. Esta expresión permite que los compuestos antigénicos sean procesados y presentados en la superficie celular (dentro del marco de las moléculas MHC I), originando una respuesta inmune con un mayor perfil de respuesta celular [85]. Estas vacunas utilizan material genético, tanto ADN como ARN, que codifica proteínas antigénicas, el cual se transfecta en las células del cuerpo lo que induce la presentación de antígenos en la superficie de dichas células y la posterior activación del sistema inmune [93]. Debido a que esta tecnología en la generación de vacunas es medianamente reciente, no existen aún vacunas de ADN con licencias aprobadas para su uso en humanos, en donde uno de los principales motivos es la falta de pruebas sobre la seguridad de dichas vacunas y el temor si dicho material genético es capaz de insertarse en el genoma celular. Sin embargo, debido al contexto de pandemia actual a causa del virus SARS-CoV-2, la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU.) ha permitido, bajo una autorización de emergencia, el uso de las primeras vacunas en humanos basadas en ARN mensajero producidas por las empresas Pfizer- BioNTech [94] y Moderna, Inc [95].

Vacunas de virus recombinantes y bacterias como sistema de delivery: este enfoque consiste en utilizar vectores virales y bacterianos vivos como sistema de *delivery*, los cuales expresan al antígeno en cuestión. Los vectores virales que se utilizan en este tipo de vacunas son provenientes de virus no patógenos y se han desarrollado vectores

derivados de retrovirus, virus del herpes simple, adenovirus o poxvirus para la vacunación contra una amplia gama de patógenos, algunos de los cuales han sido evaluados en ensayos clínicos durante los últimos años. Sin embargo, su uso puede estar limitado por la pre-exposición a los virus utilizados como vectores, lo que puede conducir a una eliminación temprana de la vacuna y una inmunogenicidad reducida. Además, existe un riesgo de que dicho ADN exógeno se inserte en el genoma de las células [96]. Sin embargo, tal como ha ocurrido con las vacunas de ARN, se ha aprobado en Rusia la primera vacuna basada en adenovirus recombinantes contra el virus SARS-CoV-2, la cual emplea dos adenovirus diferentes: el adenovirus 5 y 26 [97], sentando un precedente en la aprobación y uso de este tipo de vacunas. Las vacunas de bacterias como sistema de *delivery*, por otro lado, son bacterias atenuadas que expresan el antígeno vacunal como una proteína propia, siendo procesadas por las células del sistema inmune cuando fagocitan a dichas bacterias. Los modelos de vacunas de virus y de bacterias tienen la ventaja de estimular la respuesta innata mediante la activación de los diferentes TLR, aumentando la inmunogenicidad de los antígenos evaluados [85].

Vacunas a subunidades: Se basan en utilizar subunidades, como proteínas o polisacáridos, del microorganismo en cuestión sin necesidad de incorporarlo entero. Estas subunidades se pueden obtener purificándolas directamente del microorganismo o pueden ser proteínas recombinantes obtenidas en un sistema de expresión heterólogo. Dentro de este grupo están las *vacunas toxoides*, las cuales contienen toxinas modificadas del microorganismo, como lo son las vacunas contra la difteria y el tétano; las *vacunas de polisacáridos o conjugadas*, que utilizan polisacáridos del microorganismo el cual puede conjugarse a una proteína transportadora o *carrier* (vacunas conjugadas), cuya función es potenciar la respuesta inmune generada ya que los polisacáridos por sí solos inducen una respuesta muy pobre; y también están las *vacunas VLPs (Virus Like Particles)* las cuales se basan en la observación de que la expresión de ciertas proteínas virales conduce al ensamblaje espontáneo de partículas estructuralmente similares a los virus originales, pero que no son infecciosas porque carecen del genoma viral. Sin embargo, la conformación nativa de las proteínas antigénicas en estas VLPs está bien conservada, lo

que mejora su inmunogenicidad en comparación con las proteínas libres. Las vacunas a subunidades son consideradas las vacunas más seguras porque al ser definidas permiten un control estricto de la calidad de los insumos y, al no involucrar material genético, no presentan riesgo de inserción en el genoma. A pesar de estas ventajas, las mismas han presentado tradicionalmente la característica de generar respuestas inmunológicas pobres y por lo tanto de baja protección [85]. Sin embargo, el desarrollo actual de nuevos adyuvantes permite revertir esa tendencia por lo que un nuevo panorama se ha abierto para el desarrollo de estas vacunas [89].

1.II.4) Desarrollo de vacunas contra *Trypanosoma cruzi*:

1.II.4) a) Introducción:

El control vectorial ha sido y es el principal método empleado para prevenir la transmisión de la enfermedad de Chagas junto con el cribado en los bancos de sangre para prevenir la infección por transfusiones y transplantes. Sin embargo, existen varios factores que dificultan la erradicación definitiva del *T. cruzi* entre los cuales cabe mencionar: la existencia de regiones geográficas como el Gran Chaco donde ciertos vectores son resistentes a los insecticidas [98], la presencia de reservorios del parásito en animales domésticos, la persistencia del mismo en personas infectadas que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad y la falta de una adecuada quimioterapia para el tratamiento de la infección. Por estos motivos, el desarrollo de una vacuna contra el parásito representa una alternativa valiosa que podría contribuir al control de la enfermedad [99].

Una vacuna eficaz, segura y confiable contra el *T. cruzi* aliviaría los costos que se realizan para el control del vector y de las drogas que se usan para disipar esta infección en países endémicos. Además, el desarrollo de una vacuna eficaz implicaría la reducción de enfermedades gastrointestinales y cardíacas severas, que van asociadas a la disminución de la calidad de vida, al aumento del desempleo y de importantes gastos

médicos [100]. Estudios basados en modelados computacionales muestran que una vacuna contra *T. cruzi* sería económicamente viable y generaría un ahorro de costos netos aún con parámetros de simulación del 1% de riesgo de infección, eficacia del tratamiento del 25% y un costo de 20 dólares por dosis [101], [102]. Inclusive con una eficacia mayor del 50%, un riesgo de infección del 20% y un costo de vacuna mayor a 200 dólares también presentaría una ventaja económica [103]

Existen dos estadios del *T. cruzi* contra los cuales se puede diseñar una vacuna: el estadio intracelular amastigote y el estadio extracelular tripomastigote. Ambos tipos de vacunas podrían detener o atenuar el desarrollo de la enfermedad en humanos y en los mamíferos que sirven como reservorio, lo que interrumpiría o disminuiría la transmisión del parásito [90]. Un hecho que resulta clave para la generación de cualquier tipo de vacuna es un buen entendimiento de las interacciones entre el patógeno y el sistema inmune, por este motivo, una vacuna óptima para el control de la enfermedad de Chagas debería generar una respuesta de anticuerpos líticos, citoquinas de tipo 1 y células T citotóxicas [98], [104]. Es aceptado que una vacuna contra el *T. cruzi* debe incluir antígenos *target* de todos los estadios del parásito y debería ser útil como vacuna terapéutica y profiláctica [105]. En un principio el desarrollo de una vacuna para la enfermedad de Chagas fue obstaculizada por el temor de ocasionar una exacerbada lesión del miocardio producida por una respuesta autoinmune severa. Sin embargo, existen estudios que indican que para el desarrollo de la patología es necesaria la presencia del parásito, además de una respuesta inmune desbalanceada [73], [74], por lo que el desarrollo de una vacuna a subunidades que genere una respuesta inmune balanceada, con componentes efectores así como también componentes inmunoregulatorios, no implicaría ningún riesgo en ese sentido [105].

Si bien el desarrollo de una vacuna profiláctica contra *T. cruzi* sería el logro más importante a alcanzar, ya que permitiría eliminar dicha infección en humanos, el desarrollo de vacunas terapéuticas para ser aplicadas en la fase crónica de la enfermedad resultaría sumamente beneficioso, en donde el objetivo de este tipo de vacunas es

detener o al menos retrasar la progresión de las complicaciones cardíacas y/o gastrointestinales en pacientes infectados [106].

1.II.4) b) Antecedentes:

La protección inmunológica contra la infección experimental de *T. cruzi* ha sido estudiada desde la segunda década del siglo pasado. Desde entonces, varios tipos de inmunógenos han sido testeados: desde parásitos vivos o atenuados hasta las más nuevas vacunas de ADN [90]. La mayoría de los desarrollos hasta el momento se han centrado en obtener vacunas profilácticas. El desarrollo de vacunas terapéuticas contra *T. cruzi* empezó a cobrar impulso en los últimos años en donde se reportó que la acción de este tipo de vacunas generaba una disminución de la carga parasitaria y una reducción de la inflamación en corazón [107]–[110]

Los primeros prototipos evaluados en ratones fracasaron por estimular una respuesta asociada principalmente a la producción de anticuerpos, los cuales juegan un papel importante en el control del parásito, pero resultan insuficientes para su eliminación [90]. Numerosos trabajos realizados utilizando diferentes modelos murinos, así como también evaluando pacientes crónicamente infectados con lesiones cardíacas, han comprobado la importancia que tiene la respuesta celular en el control y la eliminación del *T. cruzi*. En el trabajo con ratones se observó que la ausencia de células T CD8+ conduce a una extrema sensibilidad hacia la infección experimental [111]. Estas células T específicas promueven resistencia a través de la producción de IFN- γ , pero una actividad citotóxica directa mediada por perforinas también podría jugar un papel importante en dicha acción [98]. A pesar de la eficacia que presentan estas células en el control del parásito junto a otros mecanismos inmunes efectores, el resultado final es la falla en la eliminación de la infección. Esto puede deberse, entre otras cosas, al desarrollo de una respuesta inmune adaptativa lenta con un retraso en la aparición de células T CD8+ *T. cruzi* específicas, lo cual es causado por diversos factores incluyendo una débil respuesta innata contra dicho parásito [112]. Una solución a esto podría ser la

inmunización, ya que permitiría la inducción temprana de una respuesta inmune efectiva [113].

De esta manera, la respuesta que se debería alcanzar para lograr una vacuna efectiva contra la enfermedad de Chagas es una respuesta inmune compleja y balanceada, que por un lado abarque anticuerpos líticos, citoquinas asociadas a una respuesta tipo Th1 (IFN- γ), actividad fagocítica de macrófagos y linfocitos T CD8+ citotóxicos; pero que a la vez contenga componentes inmunoregulatorios, tales como la citoquina IL-10 o células con capacidad regulatoria que contrarresten los efectos colaterales generados por la respuesta inmune inflamatoria [104], [108].

1.II.4) b.1) Vacunas vivas e inactivadas contra el *T. cruzi*:

Las vacunas vivas basadas en *T. cruzi* fueron desarrolladas mediante cepas del parásito atenuadas, ya sea por tratamiento con agentes farmacológicos, pasaje en serie en cultivos *in vitro* o *knockout* de genes potencialmente virulentos. Estas parásitos atenuados han demostrado su potencial en modelos murinos y caninos logrando un control de las infecciones con cepas virulentas. También se ha evaluado la utilización de otras clases de parásitos como vacunas vivas contra el *T. cruzi* como lo es el *Trypanosoma Rangeli* (*T. Rangeli*), el cual comparte una gran homología con el *T. cruzi* pero no es patógeno para los seres humanos, y el *Phytomonas serpens*, el cual es un parásito de tomate que comparte antígenos con *T. cruzi*. Los autores han visto que la inmunización de ratones con estos parásitos genera una disminución de la parasitemia y una protección frente a un desafío contra *T. cruzi* [99], [114]. Sin embargo, las preocupaciones sobre el uso de vacunas atenuadas basadas en *T. rangeli* o *T. cruzi* parecen superar los beneficios que ofrecen las vacunas de organismos completos en el contexto de la enfermedad de Chagas [90]. Por este motivo, esta estrategia ha sido básicamente propuesta para inmunizar perros y animales domésticos con el objetivo de disminuir la transmisión del ciclo doméstico [115].

1.II.4) b.2) Vacunas de subunidad contra el *T. cruzi*:

Muchos estudios han examinado el potencial de las proteínas de *T. cruzi* como antígenos vacunales. Estos incluyeron a las proteínas PFR (de la varilla paraflagelar), ASP2 (proteína de superficie de amastigotes), TS (trans-sialidasa), TC24 (proteína excretora-secretora de tripomastigotes 24), TSA (antígeno de superficie de tripomastigote), entre otros (Tabla 2). La mayoría de estos antígenos exhibieron una serie de propiedades atractivas como candidatos a vacuna, incluidos los expresados abundantemente en las etapas infecciosa e intracelular de *T. cruzi* y altamente inmunogénicos en la infección natural. Estos estudios, diseñados para estimar la eficacia protectora de los candidatos a vacunas basados en la supervivencia después de una infección de desafío letal, pronto dejaron en claro que las vacunas de proteínas usadas solas o con adyuvantes clásicos eran más adecuadas para inducir respuestas de anticuerpos y no eran eficientes para provocar la inmunidad mediada por células. Esta observación se ha revertido gracias al empleo de adyuvantes de nueva generación capaces de orientar la respuesta inmune hacia un perfil más adecuado para el control del *T. cruzi* (Revisado en [90], [99]).

Recientemente se ha publicado el uso de una vacuna experimental conjugada para uso profiláctico que utiliza el epítipo glucosídico α -Gal ($\text{Gal}\alpha 13\text{Gal}\beta 14\text{GlcNAc}$), conjugado con albúmina sérica humana [116]. En dicho trabajo se observó una protección de los ratones inmunizados frente a un desafío letal por *T. cruzi* y una disminución de carga parasitaria y daño evaluado en corazón [117] (Tabla 2).

También se han estudiado fracciones subcelulares del *T. cruzi* como posibles candidatos vacunales, como por ejemplo, la porción flagelar del parásito, la fracción soluble o partes de la membrana de este, en donde se obtuvo que la inmunización de ratones con estos fragmentos generó daño en corazón en ausencia de infección, descartándose como candidatos vacunales promisorios [99].

Tabla 2: Revisión de vacunas de subunidades de desarrolladas contra *T. cruzi*. Se muestra una revisión no exhaustiva de distintas formulaciones (antígeno y adyuvante) evaluadas contra *T. cruzi* como vacunas de subunidades y los resultados en carga parasitaria y % de supervivencia (Tabla adaptada de Rios et al., 2019 [90]).

| Antígeno | Adyuvante | Modelo experimental (cepa de <i>T. cruzi</i>). Etapa aguda, intermedia, crónica | Carga parasitaria (localización) | % Supervivencia (días post infección) | Referencias |
|-----------------------|----------------|--|---|---|--|
| PFR1, PFR3 | iFreund | Ratones C57, BALB/c. (Peru & Y), crónica | Disminuyó (sangre) | 100 (120) | Wrightsmen et al. (2002) |
| TSA1 | IL-12 / GM-CSF | Ratones C57 (Brazil), aguda y crónica | Disminuyó (corazón, músculo esq.) | 60 (140) | Garg and Tarleton, (2002) |
| ASP1 | IL-12 / GM-CSF | Ratones C57 (Brazil) | Disminuyó (corazón, músculo esq.) | 60 (140) | Garg and Tarleton (2002) |
| ASP2 | IL-12 / GM-CSF | Ratones C3H, C57 (Brazil), aguda y crónica | Disminuyó (corazón, músculo esq.) | 80 (140) | (Garg and Tarleton, 2002) |
| TcG2, TcG4 | IL-12 / GM-CSF | Ratones BALB/c (Sylvio), aguda | Disminuyó (corazón, músculo esq.) | 66.7 (60) | Hegazy-Hassan et al. (2019) |
| FCaBP (Tc24) | IL-12 / GM-CSF | Ratones C3H, C57 (Brazil), crónica | NA | 0 (65) | Fralish and Tarleton (2003) |
| TcG1 | IL-12 / GM-CSF | Ratones C57 (Sylvio), aguda, intermedia y crónica | Disminuyó (corazón) | 100 (30–120) | Bhatia et al. (2004), Bhatia and Garg (2008) |
| CRP (gp160) | iFreund | Ratones BALB/c, C3H (Y) agudo, crónico | Disminuyó (sangre) | 100 (40) | Sepulveda et al. (2000) |
| Tc24 | MPLA | Ratones BALB/c (H1), aguda | Disminuyó (sangre y corazón) | 50 (50) | Martinez-Campos et al. (2015) |
| Gal α 3LN-HSAE | LMPLA | Ratones C57 (Y), aguda | Disminuyó (corazón, pulmones, bazo, músculo esq.) | 80 (32) | Portillo et al. (2019) |
| WT TS, mTS | iFreund | Ratones BALB/C (Tulahuen), aguda | Disminuyó (sangre) | 90 (60) 100 (60) | Fontanella et al (2008) |
| mTS | ISCOMATRIX | Ratones BALB/c (Tulahuen), aguda, crónica | Disminuyó (sangre, corazón) | 100 (90) | Bontempi et al. (2015) |
| mTS, Cz, CPX, TC3 | ISCOMATRIX | Ratones BALB/c (Tulahuen), aguda, crónica | Disminuyó (sangre) | mTS= 100 (90), Cz= 80 (90), CPX= 40 (90), TC3= 60 (90) | Bontempi et al. (2017) |

1.II.4) b.3) Vacunas a ADN contra el *T. cruzi*:

Así como varios investigadores han utilizado un enfoque de inmunización con proteínas otros favorecieron el enfoque de inmunización de ADN debido a la facilidad de construcción y producción de los vectores, la estabilidad del ADN y la capacidad de mejorar la respuesta inmune mediante la entrega conjunta de genes que codifican

citoquinas. La administración de antígenos mediante vacunación con ADN ha demostrado ser eficaz para provocar anticuerpos, citocinas del tipo TH1 y respuestas inmunitarias de células T CD8+ contra los antígenos codificados [90]. Varias proteínas de *T. cruzi* se han probado como vacunas a ADN: miembros de la familia de la Trans-sialidasa y otras proteínas como TcG2, TcG4 [99] (Tabla 3).

1.II.4) b.4) Vacunas basadas en vectores virales y bacterias como sistema de *delivery* contra el *T. cruzi*:

Se han realizado varios estudios para evaluar la capacidad de los virus recombinantes que codifican genes de *T. cruzi* para inducir una inmunidad protectora y duradera contra la infección por este parásito en modelos experimentales [90]. Se han probado vacunas contra *T. cruzi* utilizando como vector viral al adenovirus recombinante tipo 5 codificando para las proteínas ASP2 y TS (Tabla 3). También se ha empleado al virus atenuado de la fiebre amarilla 17D como vector viral codificando para un péptido inmunodominante de TS y de ASP2 [118] (Tabla 3).

Con respecto a la utilización de bacterias como sistema de *delivery* para la generación de vacunas contra el *T. cruzi* se ha empleado *Salmonella enterica* atenuada, que codifica para las proteínas Cz, Tc80 y TC52 administrada de forma oral. Dentro de estos trabajos algunos autores optaron por combinar esquemas de inmunización trabajando con sistemas ADN *prime/proteína boost*. También se ha utilizado al *Lactococcus lactis* como sistema de *delivery* y adyuvante, administrado de forma oral [119]. En dicho trabajo se modificaron las bacterias *L. Lactis* de tal modo de que expresen un fragmento específico de la TS y a la vez la enzima ciclasa *cdaA*, productora del adyuvante c-di- AMP. Recientemente nuestro grupo de trabajo ha publicado la utilización del *M. bovis* recombinante BCG (Bacilo Calmette-Guerin) como plataforma para el desarrollo de vacunas contra el *T. cruzi* codificando una porción específica de la proteína Cz y fracciones de la TS [120] (Tabla 3).

Tabla 3: Revisión de vacunas a ADN y basada en vectores virales y bacterianos desarrolladas contra *T. cruzi*. Se muestra una revisión no exhaustiva de distintas formulaciones (antígeno y adyuvante) evaluadas contra *T. cruzi* y los resultados en carga parasitaria y % de supervivencia (Tabla adaptada de Rios et al., 2019) [90].

| Antígeno | Adyuvante | Modelo experimental (cepa de <i>T. cruzi</i>). Etapa aguda, intermedia, crónica | Carga parasitaria (localización) | % Supervivencia (días post infección) | Referencias |
|---|----------------------|--|--|--|-------------------------------|
| <u>Vacunas de ADN:</u> | | | | | |
| pTS (plásmido codificante para el sitio catalítico de la TS) | | Ratón BALB/c (Y), aguda | Disminuyó (sangre) | 100% (50) | Costa et al. (1998) |
| TcG1, TcG2, TcG4 (DNA prime / DNA boost) | IL-12 / GM-CSF | Canino (Sylvio), aguda, crónica | No hubo cambios en corazón en aguda. Dism. en corazón en crónico | 67 (60–365) | Aparicio-Burgos et al. (2011) |
| TcG2, TcG4 (DNA prime/T. rangeli-boost) | | Ratón C57BL/6 (Sylvio), aguda | Disminuyó (corazón, músculo esq.) | NA | Gupta et al. (2019) |
| <u>Vacunas de vectores virales y bacterias como sistema de delivery:</u> | | | | | |
| Flu-ASP2 (DNA prime / Ad5 boost) | | Ratones C57, C3H (Y) | Disminuyó (sangre) | 80 (50) | Barbosa et al. (2013) |
| Ad5ASP-2 | | Ratones A/Sn (Y), aguda | Disminuyó (hígado) | NA | Ribeiro et al. (2019) |
| rADASP2 + rAD-TS | | Ratones BALB/c (Y), aguda | Disminuyó (sangre) | 100 (160) | Machado et al. (2006) |
| YF17D -ASP2 (péptido inmunodom.) | | Ratones A/J (Y), aguda | | 20 (60) | Nogueira et al. (2011) |
| Tc80 -S. entérica/boost TC80 prot. | CpG-ODN (TC80 prot.) | Ratones BALB/c & C3H (Tulahuen, RA, K98), aguda, crónica | Disminuyó (corazón, músculo esq.) | 80-STc80, 67-Pboost (23) | Bivona et al. (2018) |
| TSNt, TSCT, y Cz-BCG | | Ratones BALB/c (Tulahuen), aguda, crónica | Disminuyó (sangre) | 80 (120, TSNt) 60 (120, TSCT) 40 (120, Cz) | Bontempi et al (2020) |

Objetivos:

Objetivo General:

Evaluar la protección alcanzada por una formulación basada en subunidades de la Trans-sialidasa para controlar la infección por *Trypanosoma cruzi* en las distintas fases de la misma. Esta evaluación implica determinar la capacidad del inmunógeno para; i) prevenir la primoinfección, ii) prevenir las lesiones asociadas a la infección y iii) Actuar como agente terapéutico en la fase crónica de la infección.

Objetivos particulares:

1) Evaluar si las subunidades de la proteína TS formulada con el adyuvante ISPA, o esa formulación junto con nuevos antígenos, administrado como vacuna profiláctica, permite ampliar la protección en la fase aguda de la infección.

2) Evaluar si las subunidades de la proteína TS formuladas con el adyuvante ISPA, o esa formulación junto con nuevos antígenos administrado como vacuna profiláctica, permiten prevenir las lesiones en la fase crónica de la infección. Evaluar dicho efecto en la fase crónica de la infección en el modelo BALB/c-Tulahuen cl2.

3) Evaluar si las subunidades de la proteína TS formuladas con el adyuvante ISPA administrado como vacuna terapéutica en ratones ya infectados permite prevenir las lesiones propias de la infección en el modelo de infección crónica BALB/c-Sylvio X10/4 así como también en el modelo BALB/C-Tulahuen cl2. Comparar la aplicación de esta vacuna como terapia durante la fase crónica de la infección con la terapia habitual utilizada en humanos contra el *T. cruzi* mediante el uso de Bz y ensayar un tratamiento mixto de la formulación vacunal y la droga Bz para evaluar una posible sinergia entre estos dos tratamientos.

Capítulo 1:

Evaluación de la formulación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa- ISPA para su *uso profiláctico* en un modelo murino de infección aguda

1.1) Introducción:

Como ya se expuso anteriormente el desarrollo de una vacuna eficaz, segura y confiable que impida la infección contra *T. cruzi* presentaría muchísimas ventajas, ya que aliviaría los costos que se realizan para el control del vector y de las drogas que se usan para disipar esta infección en países endémicos. También implicarían la reducción de enfermedades gastrointestinales y cardíacas severas, que van asociadas a la disminución de la calidad de vida, al aumento del desempleo y de importantes gastos médicos [100]. Ya en 1912, tres años después de que el Dr. Chagas describiera la infección por *T. cruzi*, Blanchard demostró por primera vez que aquellos animales que sobrevivían a una fase aguda de infección por *T. cruzi* eran resistentes a la reinfección. Desde ese momento diferentes vacunas experimentales han sido evaluadas: parásitos vivos atenuados, tripomastigotes no patogénicos (por ejemplo *T. rangeli*), estadios no infecciosos (epimastigotes), parásitos muertos por métodos químicos o físicos, fracciones celulares, proteína nativas y recombinantes y vacunas de ADN [99].

A pesar de estos antecedentes, existió un largo periodo en el curso del siglo XX durante el cual las vacunas contra la enfermedad de Chagas no fueron promovidas debido a varios reportes que sugirieron que los antígenos de *T. cruzi* generaban reacciones autoinmunes. La teoría autoinmune afirma que respuestas inmunes humorales y celulares, provocadas en respuesta a la infección por *T. cruzi*, reconocen autoantígenos y son potencialmente dañinas para el huésped contribuyendo al desarrollo y/o propagación de lesiones patológicas en la miocarditis chagásica [121], [122]. Posteriormente, quedó claro que si existen reacciones autoinmunes son en consecuencia de la persistencia del parásito por lo que la idea de eliminarlo se convirtió en un aspecto básico.

Una vacuna contra *T. cruzi* se puede dirigir contra dos etapas del parásito: la etapa tripomastigotes y amastigotes. Las vacunas contra los tripomastigotes evitarían el inicio o la persistencia de la infección y limitarían la parasitemia, ya que reconocerían al parásito al ingresar a la célula huésped tras la picadura de un triatomino infectado o tras la

explosión de una célula infectada que libera dicho estadio. Las vacunas contra amastigotes replicativos intracelulares, por su parte, detendrían la propagación de parásitos en el huésped y evitarían que el parásito ingrese a la sangre. Ambos tipos de vacunas detendrían o atenuarían el desarrollo de enfermedades en humanos y en el huésped mamífero reservorio. Además, las vacunas contra cualquiera de las etapas del parásito evitarían la infección por triatomíneos y, por lo tanto, interrumpirían o reducirían la transmisión del parásito en poblaciones humanas y reservorios, así como en insectos [123].

1.1.1) Selección de antígenos de *T. cruzi* :

Un candidato ideal para el desarrollo de una vacuna contra *T. cruzi* debería: a) ser altamente inmunogénico; b) expresarse en todos los estadios del parásito, principalmente en los presentes en el hospedador: amastigote y tripomastigote; c) conservar su secuencia y expresarse en diferentes cepas de *T. cruzi* y d) ser una molécula crucial para el patógeno que podría constituir una diana molecular para los anticuerpos neutralizantes [118].

Desde mediados de la década de los 80, la identificación y aislamiento de proteínas de *T. cruzi* blancos del sistema inmunológico constituyó una importante línea de trabajo. Esta se orientó principalmente a obtener antígenos útiles para optimizar el diagnóstico serológico o antígenos que constituyan marcadores para lograr un mejor seguimiento de los distintos estadios clínicos que presenta la enfermedad [124]. Estos desarrollos han sido impulsados en gran medida con el surgimiento de las tecnologías del ADN recombinante, la que permitió caracterizar diversos antígenos de *T. cruzi* reconocidos por el sistema inmune en forma sistemática y con alto rendimiento. Los primeros estudios utilizaron bibliotecas de expresión de ADNc de *T. cruzi* y realizaron un *screening* inmunológico con sueros de animales infectados o pacientes humanos para detectar los candidatos antigénicos [125]. Posteriormente, se utilizó un *T. cruzi* recombinante que expresaba un antígeno modelo (ovoalbúmina de pollo) en diferentes

compartimentos celulares para demostrar que las proteínas del parásito ancladas a GPI, que se expresan abundantemente en las etapas infecciosa e intracelular de *T. cruzi* y se liberan en el citoplasma de la célula huésped, son la fuente más probable de péptidos para la activación inmunitaria de las células B y T [126]. En consecuencia, varias proteínas de superficie de *T. cruzi* que son los antígenos más expresados, por ejemplo, la superfamilia TS, mucinas, MASPS (proteínas de superficie asociadas a mucina) y glicoproteína 63 (GP63) [127], [128] han sido seleccionadas como candidatos a vacunas. También se han ensayado mucinas y otros antígenos que no pertenecen a la grandes familias de proteínas de *T. cruzi* como Cruzipaína, GP90, TC52, entre otros [90].

1.1.2) Trans-sialidasa como candidato vacunal:

Como se mencionó anteriormente la TS es una proteína que fue ampliamente evaluada como inmunógeno para vacunas contra *T. cruzi* [107], [129] y ha sido indicada por nuestro grupo de trabajo como el antígeno que presenta mejor desempeño entre varios evaluados [130]. Esta TS es una enzima que cataliza la transferencia reversible de ácido siálico (SIA) desde las células del huésped hacia mucinas presentes en la superficie del parásito [131]. Se ha descrito que estas moléculas de SIA son indispensables en el ciclo de vida del *T. cruzi*: cumplen un rol fundamental en el proceso de adherencia e invasión de las células del huésped e intervienen en la protección del mismo frente al ataque de anticuerpos, generando así un mecanismo por el cual el parásito evade la respuesta inmune del huésped [132]. El *T. cruzi* no posee la maquinaria celular necesaria para sintetizar dichos SIAs, por lo que debe tomarlos de las células del huésped, colocando así a la TS como una de las enzimas claves en su metabolismo. Como además esta proteína está ausente en las células de los mamíferos, se la considera un excelente objetivo para el desarrollo y diseño de nuevas drogas y tratamientos [133].

La TS es una de las proteínas más abundantes de *T. cruzi* y es expresada también por otras especies como el *T. brucei* y el *T. rangeli* [134]. Esta proteína puede dividirse en dos grandes dominios: una región en la que se encuentra el sitio catalítico y otra región

que está formada por repeticiones de 12 aminoácidos en tandem llamada SAPA (shed-acute-phase-antigen) [135], [136] (Figura 10). En *T. cruzi* esta enzima forma parte de una super familia de proteínas que está codificada por más de 1400 genes y pseudogenes polimórficos, en donde todos comparten algunos de los motivos característicos de la enzima como ser la caja ASP, que se encuentra en sialidasas bacterianas, un motivo llamado VTV o FLY (VTVxNVxLYNR) y un motivo FRIP (xRxP) [137] (Figura 10). Las moléculas de dicha familia se dividen en ocho grupos, en donde solo el grupo I codifica para TS activas (aTS). Estas aTS cuenta con isoformas inactivas (iTS) las cuales comparten una elevada identidad aminoacídica. En el grupo II se encuentran moléculas con capacidad de unión a polisacáridos y a proteínas de la matriz extracelular que cumplen funciones en la adhesión e invasión celular. En el grupo III se encuentra la CRP que tiene capacidad de inactivar al complemento. En el caso de las moléculas pertenecientes a los grupos IV a VIII, no se conoce aún la función de las mismas [137].

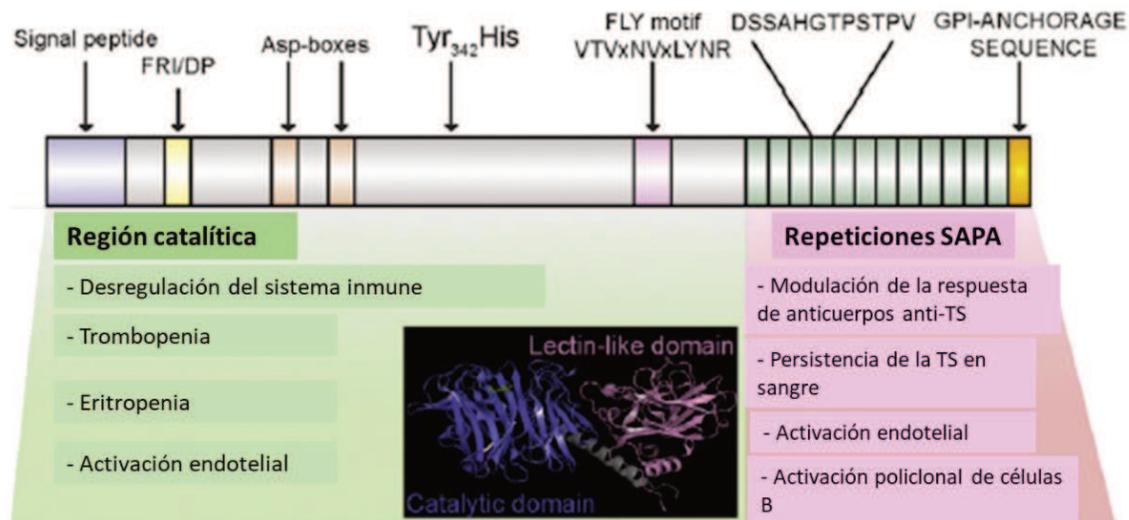


Figura 10: Características estructurales y biológicas de TS pertenecientes al grupo I. Representación esquemática de una molécula de TS expresada por tripomastigotes (aTS y iTS). La identificación del residuo 342 discrimina a las TSs activas (Tyr) e inactivas iTS (His). Se indica la posición del péptido señal, de la secuencia de anclaje a membrana y el típico motivo de sialidasa bacteriana (ASP- box, FRI/DP), la secuencia de adhesión FLY (VTVxNVxLYNR, donde x hace referencia a cualquier aminoácido) y la secuencia repetitiva SAPA. Se indican los mayores efectos biológicos de la región catalítica y de la repetitiva SAPA. La estructura de la región catalítica de la TS muestra la presencia de dos dominios independientes (el catalítico mismo y el de lectina) conectados mediante una α -hélice (Figura adaptada de Campetella et al., 2020) [138].

En relación a las moléculas del grupo I, se ha visto que las iTs presentan una mutación en la Tyr 342 la cual cambian por His (Figura 10), lo que hace que la actividad trans-sialidasa se pierda. Sin embargo, se ha visto que estas iTs conservan actividad lectina, por lo que pueden unir moléculas de ácido siálicos y cumplen un papel muy importante en la patogenicidad del *T. cruzi* [139]. Durante una infección las TSs se pueden encontrar ancladas en la membrana del parásito o libres en el torrente sanguíneo, en donde se ha demostrado que viajan asociadas a micro vesículas [140].

El uso de TS le proporciona al *T. cruzi* un mecanismo a través del cual extrae las moléculas de SIA de las células de los huéspedes y cubre sus propias moléculas de superficie, creando efectivamente una mímica molecular que le permite esconderse del sistema inmune del huésped. Cuando el *T. cruzi* se cubre de moléculas de SIA adquiere carga negativa en su superficie la cual le permite evadir la acción de algunos componentes del suero, lo que demuestra que la acción de la TS impide la remoción del parásito a través del sistema de complemento. Además, se ha evaluado que la presencia de SIA en la superficie del parásito une lectinas en células dendríticas, suprimiendo la producción de citoquinas proinflamatorias como lo es la IL-12 y frenando así la respuesta inmune generada. Por otra parte, se ha visto que la acción de la TS interviene en el escape del parásito dentro de las vacuolas fagocíticas cuando es internalizado y, durante la fase aguda de la infección, se ha demostrado que esta enzima se encuentra envuelta en la activación policlonal de linfocitos B, en donde se producen interesantemente anticuerpos contra la región inmunodominante SAPA y no contra el sitio catalítico de dicha enzima [141]. Como ya se mencionó anteriormente, esta proteína puede ser liberada a la sangre en donde se distribuye en forma sistémica por todo el organismo del huésped y los efectos biológicos que produce en las diferentes células son variados y pueden deberse a la alteración que dicha enzima genera en la superficie sialidada de estas células [133]. Dentro de estos efectos se puede mencionar una depleción de timocitos inmaduros en estadios tempranos de infección [142], [143], trombopenia y eritropenia [144], [145], alteración de la superficie de linfocitos CD8+, lo que perjudica la acción citotóxica y

favorece la presencia del parásito [146], y un sesgo hacia un perfil TH2 de la respuesta inmune generada [147].

Se ha reportado que la respuesta T CD8+ que se genera en ratones y humanos infectados con *T. cruzi* se encuentra concentrada hacia péptidos codificados por genes de la súper familia de la TS [148], en donde se demostró que dos péptidos, TSKB20 y TSK21 codificados por genes de TS, son reconocidos, en el pico de la respuesta inmune, por más del 30% de células T CD8+ circulantes en ratones de la cepa B6 [148]. En otro trabajo se estudió la presencia de epitopes inmunodominantes en ratones de la cepa C57BL/6, en donde encontraron que más del 40% de los LT CD8+ generados durante la infección reconocían al epitope dominante TSKB20 y subdominante TSKB74, ambos codificados por genes de TS [149]. Para el caso de ratones BALB/c se ha observado que la inmunización con una vacuna de ADN generaba células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN- γ y al aislar dichos clones celulares vieron que la mayoría de ellos reconocían a un epitope inmunodominante para células T CD8+ llamado TSKd1 (IYNVGQVSI), también codificado por genes de TS [150]. Para estudiar la protección que genera este epitope frente a un desafío con *T. cruzi*, dicho grupo de trabajo inmunizó ratones BALB/c con ADN de TS entera con el epitope TSKd1 y ADN de TS con el epitope mutado TSKd1 (IGNVGQVSF)y observaron que la supervivencia de los ratones disminuía del 80% al 30% a causa de la mutación en dicho epitope [151], lo que muestra que la respuesta T CD8+ que genera este epitope es sumamente importante para la supervivencia de los ratones BALB/c.

En los últimos años la proteína TS ha sido utilizada como candidato vacunal con resultados muy promisorios [129], [130], [152]–[154]. En nuestro laboratorio hemos trabajado en un proyecto tendiente a lograr una formulación profiláctica contra la infección por *T. cruzi* que sea eficaz pero también segura, para lo que hemos utilizado la capacidad inmunoprotectora de una proteína TS mutada (TSm) junto con el adyuvante ISCOMATRIX (IMX) [155]. Para esto se comparó la capacidad protectora de esta formulación con otros seis antígenos de *T. cruzi* encontrándose que TSm mostraba los mejores parámetros de protección [130], [152]. También hemos descrito que una formulación compuesta por un fragmento de TS formulada con adyuvante ISPA permite

activar el brazo efector de la respuesta inmune pero también el brazo regulador, lo que podría explicar la disminución de las lesiones que se obtiene con dicha formulación luego de la infección aguda [156]. Sin embargo, como ocurre con todas las formulaciones ensayadas hasta la fecha, la protección que se ha logrado no es total ya que igualmente se produce infección.

1.1.3) Adyuvante basado en partículas inmunoestimulantes (ISPA):

Como ya se describió anteriormente los adyuvantes se agregan a las vacunas para mejorar la respuesta inmune generada por los diferentes inmunógenos y redigir dicha respuesta hacia un perfil particular, aumentando así la eficacia de las mismas. Es de gran importancia encontrar nuevos adyuvantes que permitan reducir la cantidad inmunógeno a inocular, que induzcan respuestas tanto del tipo Th1 como Th2, que sean estables y de bajo costo [89].

Los complejos inmunoestimulantes (ISCOM) son partículas esféricas de aproximadamente 49 nm de diámetro y han mostrado ser capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria equilibrada Th1 / Th2, además de aumentar las respuestas citotóxicas [157]–[159]. Los ISCOM, están compuestos por fosfolípidos, colesterol y saponina, pueden retener el antígeno a través de interacciones hidrófobas y se han aplicado al desarrollo de varias vacunas registradas para aplicaciones veterinarias [157], [158]. Como ya se mencionó anteriormente, en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se evaluó el desempeño de la formulación TSm- IMX, obteniéndose resultados de protección muy promisorios [152]. En base a estos resultados nuestro grupo de trabajo desarrolló, en colaboración con la empresa Lipomize®, una formulación de partículas en forma de cajas vacías similar al IMX denominada ISPA [160]. Este adyuvante denominado ISPA (de las siglas en inglés *Immunostimulating Particle*), está formado por dipalmitoil-fosfatidilcolina, colesterol, estearilamina, alfa-tocoferol y saponina Quil A y demostró ser capaz de generar una buena respuesta humoral y celular cuando se inmunizaron ratones BALB/c con albúmina sérica bovina (BSA) [160]. En

particular, ISPA demostró que la vacunación con la proteína TSm, formulada con dicho adyuvante, indujo un aumento de las respuestas inmunitarias humorales y celulares que protegieron a los ratones contra el desafío de parásito de *T. cruzi* Tulahuen cl2 [160]. También se evaluó la eficacia del ISPA junto con una fracción de la TS [156], tal y como se ha descrito anteriormente. Recientemente, se ha publicado que este adyuvante ISPA genera una fuerte respuesta celular y humoral en vacas inmunizadas con una formulación para prevenir la fiebre aftosa y también brindó protección en un modelo murino de infección contra el virus de la fiebre aftosa [161].

En base a todo lo descrito anteriormente, en este trabajo de tesis se buscó profundizar en la evaluación de fracciones de TS, formuladas con el adyuvante ISPA, como vacuna profiláctica y complementar dichas formulaciones con nuevos antígenos de *T. cruzi*. Otro enfoque planteado en este trabajo, y que conforma el siguiente capítulo, es evaluar a nuestra formulación vacunal para su uso terapéutico en un estadio de infección crónica.

1.II) Objetivos específicos:

1) Evaluar si las subunidades de la proteína TS formulada con el adjuvante ISPA, o esa formulación junto con nuevos antígenos, administrado como vacuna profiláctica, permite ampliar la protección en la fase aguda de la infección.

2) Evaluar si las subunidades de la proteína TS formuladas con el adjuvante ISPA, o esa formulación junto con nuevos antígenos administrado como vacuna profiláctica, permiten prevenir las lesiones en la fase crónica de la infección. Evaluar dicho efecto en la fase crónica de la infección en el modelo BALB/c-Tulahuen cl2.

1. III) Materiales y métodos:

Para evaluar el uso profiláctico de la formulación vacunal en estudio se trabajó con un modelo murino de infección aguda en el cual ratones de la cepa BALB/c fueron primero inmunizados con el/los candidatos vacunales y posteriormente desafiados con *T. cruzi*, para poder así evaluar la capacidad protectora de las formulaciones vacunales ensayadas. En principio se trabajó con subunidades de la enzima TS de *T. cruzi*, pero también se ensayó, en diferentes experimentos, la mezcla de estos antígenos con otras proteínas del parásito para buscar así una potenciación de los mismos y obtener una mejor formulación vacunal. Estos antígenos ensayados fueron la proteína quimera CP3 y la proteína ASP2 de *T. cruzi*.

1.III.1) Obtención de los antígenos vacunales:

1.III.1) a) Obtención de los fragmentos de TS:

Como principales antígenos para la elaboración de las formulaciones vacunales se trabajó con dos fragmentos de la proteína Trans-sialidasa: el fragmento amino terminal, denominado TS_{Nt}, y el fragmento carboxilo terminal, llamado TS_f. Estos fragmentos de 35 kDa cada uno fueron clonados durante en un trabajo de tesina de grado previo [162]. Se ha observado que el fragmento TS_{Nt} abarca desde el aminoácido número 63 al 346, y el fragmento TS_f va desde el aminoácido número 335 al 625 cuando se alinearon con la secuencia de referencia GenBank: AJ276679.1, tal como se esquematiza en la Figura 11. Los cebadores utilizados se diseñaron para obtener dos fragmentos de aproximadamente 800-900 pb sin la región SAPA, que no solo sean útiles como candidatos vacunales, sino que además tengan un tamaño accesible para ser clonados en un sistema de expresión procariota.

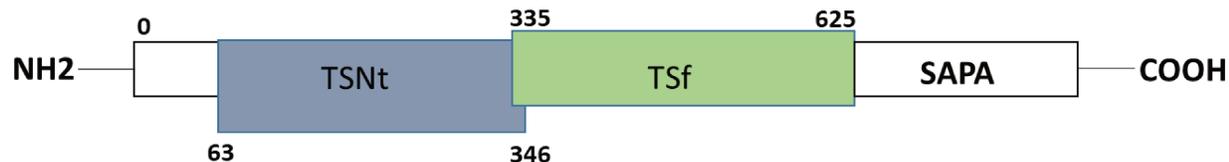


Figura 11: Fragmentos de TS empleados como candidatos vacunales. Esquema representativo de la proteína Trans-sialidasa en donde se visualizan los fragmentos escogidos: TSNt y TSf. Se esquematizan las posiciones de los aminoácidos del comienzo y final de cada fragmento [162].

1.III.1) a.1) Transformación de bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) con las construcciones pET-28a(+)-TSNt o TSf:

Estos fragmentos de TS ya se encontraban clonados en el vector de expresión pET-28a(+) (Novagen™), el cual facilita la posterior purificación de las proteínas al añadir residuos de histidina en la secuencia aminoacídica de los fragmentos. Para la nueva obtención de estas proteínas se comenzó con una transformación de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos clonados con los respectivos fragmentos. Se trabajó con esta cepa de bacterias para la expresión de los antígenos ya que son bacterias deficientes en la expresión de proteasas, lo que disminuye el riesgo de proteólisis de los fragmentos de interés y, además, presentan la secuencia que codifica la T7 ARN polimerasa indispensable para la expresión del vector pET-28a(+)(Novagen™). Estas bacterias, en una primera instancia, se transformaron en células competentes para lo cual se las hizo crecer en caldo Luria Bertani (LB) (ver ANEXO) toda la noche a 37°C y agitación constante. Al día siguiente se realizó una dilución 1/100 de este cultivo de células y se los cultivó durante 2-3 h en las mismas condiciones ya mencionadas, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,4-0,6. Luego, se distribuyó 1 ml de estas bacterias en microtubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 5.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. A continuación se descartó el sobrenadante de los cultivos y se resuspendieron los *pellets* en 500 µl de la solución de transformación 1 (ST1) (ver Anexo). Se centrifugaron los microtubos a 5.000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* se resuspendieron en 100

μl de la solución de transformación 2 (ST2) (ver Anexo) y se incubaron las bacterias en hielo durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se procedió a agregar 1 μl de las mini preparaciones de ADN plasmídico que contenían al vector pET-28a(+) (Novagen™) con el fragmento TSnt o TSf, y se incubaron en hielo durante 40 min. A continuación se realizó un shock térmico, en donde las bacterias se colocaron en baño seco a 42°C durante 45 s y luego se agregó a cada microtubo 1 ml de medio LB fresco. Se incubaron las muestras a 37°C durante 1 h. Pasado este tiempo se centrifugaron los microtubos a 4.200 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 100 μl de medio LB. Por último, se procedió a sembrar las bacterias en medio LB- agar (ver Anexo) en presencia de kanamicina (50 μg/ml) y se las dejó crecer durante toda la noche a 37°C.

1.III.1) a.2) Expresión de los fragmentos proteicos:

Al día siguiente se hicieron subcultivos de los 5 clones obtenidos de las correspondientes transformaciones en 1 ml de medio LB líquido y kanamicina (50 μg/ml). Estos clones se cultivaron toda la noche a 37°C en agitación constante y al día siguiente se procedió a realizar un *screening* de colonias para buscar aquellos clones que mejor expresen a los fragmentos proteicos. Para ello, se diluyeron 1/100 los repiques realizados de las placas y se dejaron crecer durante 2 h a 37°C en agitación constante. A continuación se agregó IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) en una concentración final de 0,1 mM y la expresión de los fragmentos se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante. Una vez expresados los fragmentos se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (ver Anexo) para la visualización de las proteínas en presencia del marcador de peso molecular de proteínas ProteinRuler® II (TransGen Biotech Co). Para ello se tomaron 200 μl de cada cultivo y se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min. Se descartaron los sobrenadantes, se resuspendieron en 20 μl de agua destilada y se añadió 20 μl del buffer de muestra para SDS-PAGE (ver Anexo). Las muestras ya preparadas se hirvieron durante

5 min y luego se sembraron 10 μ l de estas en el gel. Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba BIO-RAD® a 130 V constantes. Finalizada la corrida, los geles fueron teñidos con azul de coomasie (ver Anexo) durante 40 min y luego fueron decolorados por el paso sucesivo de los mismos en dos soluciones decolorantes (ver Anexo).

Luego de verificar la capacidad de expresión de los clones obtenidos de la transformación para cada fragmento de TS, se procedió a escalar el proceso. Para ello se seleccionaron los clones que mostraron la mejor expresión del fragmento correspondiente, se repicaron en 100 ml de medio LB- kanamicina (50 μ g/ml) y se los cultivó por 2 h a 37°C en agitación constante. Luego se agregó IPTG, en una concentración final de 0,1 mM, y se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante toda la noche y en agitación constante. Al día siguiente los cultivos se centrifugaron a 5.000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante.

1.III.1) a.3) Purificación de los fragmentos de TS y cuantificación:

Una vez escalado el proceso de expresión de los antígenos, se resuspendieron los *pellets* de los cultivos en 50 ml de agua destilada y se procedió a lisar las células en sonicador Vibra-Cell (Sonic & Material Inc). Las muestras se colocaron en hielo y se administraron tantos pulsos como fueron necesarios hasta obtener la clarificación de los cultivos. Una vez logrado esto, se centrifugaron durante 12 min a 12.000 rpm y, dado que estos antígenos permanecen insolubles, se descartó el sobrenadante y se continuó trabajando con los *pellets* obtenidos. Estos *pellets* fueron resuspendidos en una solución de PBS-urea 8M y se purificaron mediante una cromatografía de afinidad por ion metal inmovilizado (IMAC) trabajando con una columna de agarosa con Ni²⁺ (Ni-NTA Agarosa R901-15, Invitrogen™). Este metal interacciona con las secuencias de histidinas presentes en las proteínas reteniéndolas de manera específica, permitiendo así la purificación de los fragmentos de interés. La elución de estos fragmentos se realizó con soluciones de imidazol de concentraciones crecientes de 20 mM hasta 500 mM. Las fracciones eluidas

se visualizaron mediante SDS-PAGE, tal como se describió anteriormente, y se juntaron así todas aquellas fracciones que mostraron contener a la proteína de interés. Este *pool* obtenido de la proteína de interés se concentró utilizando filtros Vivaspín® 20 (Sartorius) mediante centrifugaciones sucesivas a 8.000 g por 10 min. Estos tubos concentradores poseen una membrana con un *cut off* de 10.000 Da lo que permite así filtrar el líquido y retener a las proteínas, permitiendo la concentración de las mismas.

El producto final obtenido fue por último cuantificado por el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA). Esta es una técnica de alta sensibilidad que se basa en la oxidación de Cu^{2+} en presencia de proteínas el cual forma un complejo de color violeta con el reactivo BCA, cuya absorbancia se mide a 562 nm. Para la cuantificación de las proteínas se construyó una curva patrón de albúmina sérica bovina con un rango de concentraciones de 0 a 1 mg/ml. De las muestras a cuantificar y de cada punto de la curva patrón se tomaron 100 μl , los cuales se colocaron en tubos de ensayo conteniendo 2 ml del reactivo de trabajo (RST) (ver Anexo). Las muestras fueron incubadas a 60°C durante 30 min y se midieron las absorbancias a 562 nm en espectrofotómetro (Biotraza). La concentración de los fragmentos TSnt y TSf se calcularon por extrapolación de datos con los de la curva patrón.

Todos los procesos descritos para la obtención de proteínas fueron realizados tanto para el fragmento TSnt como para el fragmento TSf.

1.III.1) b) Obtención de los antígenos CP3 y ASP2:

Otros antígenos que se han utilizado en este trabajo de tesis para intentar potenciar las formulaciones vacunales de los fragmentos de TS fueron las proteínas CP3 y ASP2. La proteína CP3 es una quimérica compuesta por las proteínas antigénicas específicas MAP, TcD y TSSA de *T. cruzi* y ha sido desarrollada en nuestro laboratorio para el diagnóstico de Chagas crónico mediante técnica de ELISA [163]. La proteína ASP2 por otra parte, es una Proteína de Superficie expresada en Amastigotes, perteneciente a la

súper familia de la TS. Esta proteína ASP2 se clonó y expresó en nuestro laboratorio en el marco de un trabajo de tesina de grado de la carrera de Licenciatura en Biotecnología [164].

El ADN de proteína CP3 se encontraban clonado dentro del vector de expresión pET28(+)a y fue obtenida en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo las técnicas de expresión y purificación detalladas para la obtención de los fragmentos de la TS. Brevemente: bacterias ya transformadas con las secuencia codificante para esta proteína fueron cultivadas en 100 ml de medio LB en presencia de kanamicina (50 µg/mL) y se utilizó para la inducción de la expresión IPTG, en una concentración final de 0,1 mM. La expresión de CP3 se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación constante y al día siguiente se purificó de la misma manera descrita anteriormente, mediante IMAC trabajando con una columna de agarosa con Ni²⁺ inmovilizado (Ni-NTA Agarosa R901-15, Invitrogen™). La elución de esta proteína se realizó con soluciones de Imidazol de concentraciones crecientes (soluciones de 20 mM hasta 500 mM), en donde las fracciones eluidas se corrieron en SDS-PAGE y se juntaron todas aquellas fracciones que mostraron contener a la CP3. Por último se procedió a cuantificarla por el método colorimétrico del BCA.

La proteína ASP2, por otro lado, ya se encontraba disponible para ser utilizada como candidato vacunal. Su purificación y cuantificación se realizó con las mismas técnicas ya descriptas.

1.III.2) Inmunización de ratones BALB/c con las distintas formulaciones vacunales:

1.III.2) a) Animales

Para todas las evaluaciones se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad adquiridos en el Centro de Medicina Comparada de la Facultad de

Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Estos ratones fueron mantenidos en el bioterio de nuestro laboratorio en condiciones controladas de luz y temperatura, con agua y alimento *ad libitum*.

Todos los protocolos experimentales con respecto al manejo de los animales de experimentación se llevaron a cabo en conformidad con las normas éticas internacionales: “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” del National Research Council de los Estados Unidos y fueron aprobados por el comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

1.III.2) b) Formulación de los antígenos y esquema de inmunización:

Ratones BALB/c se dividieron en distintos grupos de 5 animales, en donde cada grupo recibió 10 µg del antígeno correspondiente más 3 µl del adyuvante ISPA [160], a excepción del grupo control que solo recibió buffer fosfato salino (PBS). El esquema de inmunización para todas las evaluaciones consistió en tres dosis, una cada 15 días, en donde se inocularon 100 µl finales de las formulaciones correspondientes por la vía subcutánea (Figura 12).

1.III.2) b.1) Evaluación de subunidades de TS + CP3:

Para este ensayo se emplearon los siguientes grupos experimentales: grupo TSNt (inmunizado con el fragmento TSNt), grupo TSf (inmunizado con el fragmento TSf), grupo CP3 (inmunizado con la quimera CP3), grupo TSf+CP3 (inmunizado con la mezcla de los dos antígenos) y grupo PBS (grupo control). El grupo mezcla, TSf+CP3, fue inmunizado con 10 µg de cada proteína más 3 µl de ISPA.

1.III.2) b.2) Evaluación de subunidades TS:

Para esta evaluación se trabajó con los siguientes grupos experimentales: grupo TSf (inmunizado con el fragmento TSf), grupo TSnt (inmunizado con el fragmento TSnt), grupo TSnt+TSf (inmunizado con la mezcla de los dos fragmentos) y grupo PBS (grupo control). El grupo mezcla, TSnt+TSf, fue inmunizado con 10 µg de cada fragmento más 3 µl de ISPA.

1.III.2) b.3) Evaluación de las subunidades de TS + ASP2:

En este caso se utilizaron los grupos experimentales que se detallan a continuación: grupo TSnt (inmunizado con el fragmento TSnt), grupo TSf (inmunizado con el fragmento TSf), grupo ASP2 (inmunizado con la proteína ASP2), grupo TSnt+TSf (inmunizado con la mezcla de fragmentos de TS), grupo TSnt+TSf+ASP2 (inmunizado con la mezcla de las tres proteínas) y grupo PBS (grupo control). El grupo mezcla TSnt+TSf+ASP2 fue inmunizado con 10 µg de cada proteína más 3 µl de ISPA.

Cada una de estas evaluaciones se realizó en ensayos independientes.

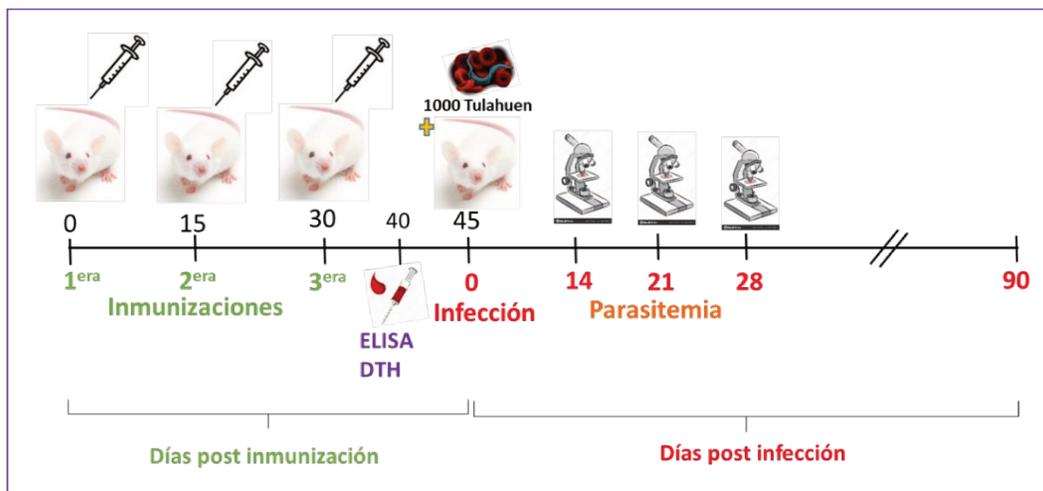


Figura 12: Esquema de trabajo empleado para la evaluación profiláctica de las formulaciones vacunales en un modelo agudo de infección BALB/c-Tulahuen cl2.

1.III.3) Evaluación de la respuesta inmune generada:

1.III.3) a) Evaluación de anticuerpos específicos mediante técnica de ELISA

Para la evaluación de la respuesta humoral se anestesiaron los ratones con una solución de Ketamina (50%) (Holliday- Scott SA)- Xilacina (10%) (PharmaVet) y se sangraron mediante punción retro-orbital con capilares heparinizados a los diez días finalizado el protocolo de inmunización (Figura 12). Estas muestras de sangre se centrifugaron 10 min a 2.000 rpm y se separó el plasma de cada una de ellas, los cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso. La presencia de anticuerpos específicos se evaluó por técnica de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) indirecto empleando los plasmas obtenidos de cada ratón. Para esta técnica de ELISA se trabajó con microplacas de poliestireno, de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One), las cuales se sensibilizaron con 0,5 µg de los antígenos en solución de sensibilización (ver Anexo) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con una solución de lavado (ver Anexo), se bloquearon agregando 200 µl a cada pocillo de una solución de bloqueo (ver Anexo) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Pasado ese tiempo, se lavaron las placas dos veces con la solución de lavado y se sembraron por duplicado los plasmas murinos diluidos 1/100 en solución de incubación (ver Anexo). Se volvieron a incubar las placas durante 1 h a 37°C. Luego, se lavaron los pocillos nuevamente con la solución de lavado y se sembraron los anticuerpos secundarios anti-ratón IgG1 e IgG2a conjugados a HRP (Abcam), diluidos 1/20.000 en solución de incubación. Las placas se llevaron a 37°C durante 1 h, pasado ese tiempo se volvieron a lavar las placas y se procedió a revelar la reacción agregando a cada pocillo una gota del reactivo TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) (Life Technologies™). Tras la aparición de color azul a causa del reactivo se frenó la reacción agregando una gota de solución de frenado (ver Anexo) y por último, se procedió a leer los resultados obtenidos en lector de ELISA (Molecular Device Emax) a 450 nm. Estos resultados se expresaron como DO obtenidas a 450 nm.

1.III.3) b) Evaluación de la respuesta celular: reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

La respuesta celular específica generada tras las inmunizaciones con los diferentes antígenos se evaluó mediante una prueba de hipersensibilidad retardada (DTH), la cual se realizó diez días luego de haber finalizado el protocolo de inmunización (Figura 12). Para ello se inocularon 5 µg del antígeno en cuestión sin adyuvante en almohadilla plantar trasera izquierda de cada ratón. Se midió el grosor de la pata antes de inocular (0 h) y a las 48 hs post inoculación empleando un calibre Vernier. El resultado se expresó como la diferencia entre el grosor de la pata inoculada medida a las 48 hs menos el grosor inicial (0 h) en mm.

1.III.4) Evaluación de la capacidad protectora de las distintas formulaciones vacunales:

1.III.4) a) Parásitos:

Para la infección de los ratones se trabajó con tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen cl2 mantenidos por pasajes sucesivos en ratones de la cepa Cb1. Estos pasajes fueron realizados en el Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER), quienes gentilmente cedieron estos parásitos para cada ensayo. Para la extracción de estos *T. cruzi*, ratones Cb1 infectados fueron anestesiados con una solución de Ketamina (50%) (Holliday- Scott S.A.)- Xilacina (10%) (PharmaVet®) y se extrajo, por punción cardíaca, alrededor de 1 ml de sangre entera, tras lo cual los animales fueron sacrificados. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1.500 rpm por 10 min y se separaron los sobrenadantes. Estos sobrenadantes con parásitos fueron lavados agregando 1 ml de solución fisiológica estéril y tras una nueva centrifugación a 2.500 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la muestra con parásitos en 1 ml de solución fisiológica estéril. Por último, se determinó la concentración de parásitos viables realizando un recuento en cámara de Neubauer.

1.III.4) b) Infección de los ratones:

Quince días después después de la última dosis de inmunización se infectaron los ratones BALB/c con 1.000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen cl2 (Figura 12), obtenidos como se describió anteriormente. Estos parásitos se inocularon por vía intraperitoneal en un volumen final de 100 μ l.

1.III.4) c) Evaluación de la parasitemia, peso, score clínico y supervivencia:

Una vez infectados los ratones se procedió a evaluar la capacidad protectora de cada una de las formulaciones aplicadas, para lo cual se midió la parasitemia, el peso de los ratones, el desarrollo de signos clínicos y la supervivencia.

La parasitemia se registró a los días 14, 21 y 28 post infección (Figura 12). Para ello, se tomaron 5 μ l de sangre obtenidos de la punta de la cola de cada ratón, los cuales se colocaron entre porta y cubre objetos. Estas muestras de sangre se observaron al microscopio óptico en donde se realizó el recuento de parásitos, contándose un total de 25 campos ópticos.

El peso de los ratones, por otro lado, se evaluó semanalmente partiéndose del día de infección (día 0).

El desarrollo de signos clínicos se evaluó dos veces por semana, en donde se examinaron los ratones a fin de buscar la presencia de manifestaciones relacionados con la infección como lo son: la erección del pelaje, el cambio de color del mismo, la presencia de joroba, la dificultad para el movimiento, si permanecen con los ojos cerrados y la presencia diarrea. A cada uno de estos signos se les asignó un puntaje estableciéndose así lo que denominamos “Score clínico” (score adaptado de [165]) (Tabla 4).

El porcentaje de supervivencia de cada grupo experimental se evaluó diariamente durante tres meses luego de la fecha de infección.

Tabla 4: "Score clínico". Score asignado a cada una de las manifestaciones clínicas observadas en los ratones infectados.

| Manifestaciones clínicas | | Score asignado |
|--|---|---|
| Normal |  | 0 |
| Pelaje: erección y cambios en el color |  | Poca piloerección= 0,5 Mucha piloerección= 1 Color amarillo= 2 |
| Presencia de joroba |  | 1,5 |
| Afección ocular |  | Sensibilidad a la luz=1,5 Afección en un ojo= 2 Afección en los dos ojos= 3 |
| Dificultad de movimiento |  | 2,5 |
| Diarrea |  | 4 |

1.III.5) Análisis estadístico:

Para el análisis de los resultados obtenidos se trabajó con el software estadístico Prisma 5.0 (GraphPad). Se aplicó el test estadístico ANOVA One-way o Kruskal-Wallis para el análisis de múltiples grupos, según previo análisis de normalidad de datos. Como pos test para datos paramétricos se aplicó el test de Tukey y como pos test para datos no paramétricos se utilizó el test de Dunn. A las curvas realizadas de score clínico y

parasitemia se les calculó el AUC (área bajo la curva). Todos aquellos valores del p estadístico menores a 0,05 se consideraron significativos (*p< 0,05).

1. IV) Resultados:

1.IV.1) Evaluación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa + CP3:

El eje principal de esta parte del trabajo de tesis fue evaluar formulaciones vacunales que permitan aumentar la protección brindada por las formulaciones previamente ensayadas en el laboratorio. Para ello se evaluó mezclar fracciones de subunidades de la proteína TS como vacuna profiláctica, pero además se planteó la idea de complementar estas formulaciones con otros antígenos del *T. cruzi* disponibles en nuestro laboratorio, como los son la quimera CP3 y el antígeno ASP2. Las fracciones de TS con las que se trabajó son la subunidad amino terminal TSNT y la subunidad carboxilo terminal TSf. Como ya se explicó anteriormente, estos antígenos fueron clonados durante el trabajo de tesina previo, en donde se realizaron evaluaciones preliminares de la capacidad protectora de estos fragmentos [162]. Esta tesina también permitió el estudio de aspectos de la inmunidad regulatoria de la fracción TSf formulada con adyuvante ISPA [156]. En esta nueva etapa se avanzó en el estudio del fragmento de TSNT ya que debido a la insolubilidad de estas proteínas, los rendimientos de obtención de este antígeno habían sido muy bajos en nuestro estudio previo, lo que dificultó su evaluación. Por tanto, se trabajó en mejorar los rendimientos de obtención de estos antígenos.

En los primeros experimentos se evaluó los fragmentos de TS (TSNT y TSf) y la quimera CP3. Esta última es una quimera formada por las proteínas de *T. cruzi* MASP, TcD y TSSA generada en nuestro laboratorio para el diagnóstico de Chagas crónico [163]. Se inmunizaron ratones BALB/c con estas distintas proteínas formuladas con el adyuvante de producción propia ISPA [160] y se complementó al fragmento TSf con el agregado de CP3 (TSf+CP3). En esta oportunidad se utilizó el fragmento TSf de la TS ya que al momento de comenzar este ensayo solo se contaba con los resultados de las evaluaciones realizadas en el curso de la tesina de grado, en donde los mejores resultados se habían obtenido con este fragmento debido a las dificultades que había presentado la obtención de la TSNT en

forma soluble. A los 10 días post inmunización se procedió a evaluar la respuesta inmune generada mediante técnica de ELISA y prueba de DTH. Como puede observarse los grupos inoculados con los fragmentos de TS (Grupos TNT y TSf) produjeron altos niveles de anticuerpos tanto del isotipo IgG1 e IgG2a ($p < 0,05$ vs grupo PBS, ANOVA One-way post *test* de Tukey). La inoculación con CP3 generó los niveles de anticuerpos más elevados si se los compara con los fragmentos de TS ($p < 0,05$ vs grupo PBS, ANOVA One-way post *test* de Tukey). Los sueros provenientes del grupo mezcla TSf+CP3 se enfrentaron por separado con las proteínas CP3 y TSf, en donde se observó que dicho grupo mostró niveles de anticuerpos superiores frente a CP3 TSf ($p < 0,05$ vs grupo PBS, ANOVA One-way post *test* de Tukey) en comparación con el fragmento (Figura 13).

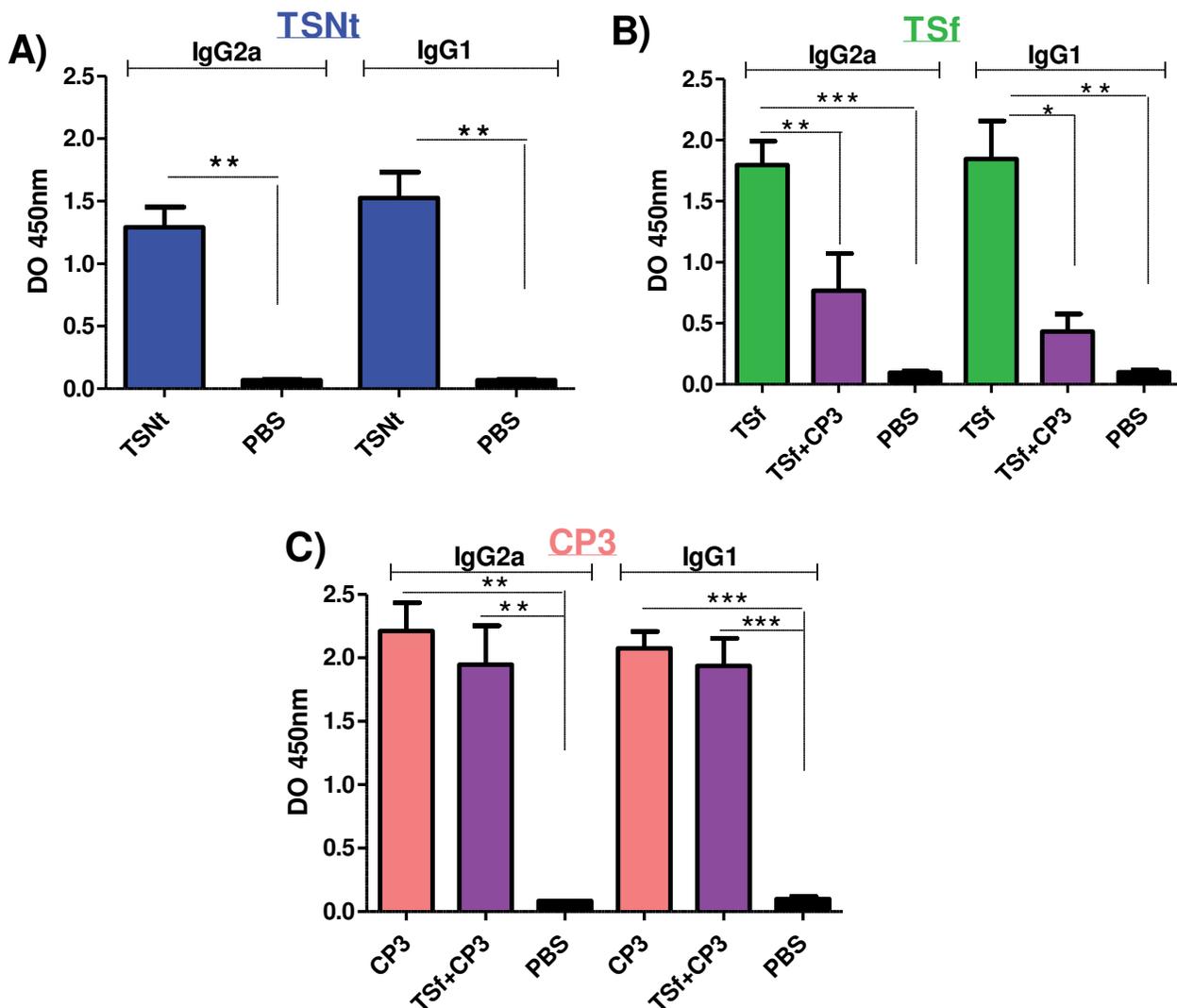


Figura 13: Evaluación de la respuesta inmune humoral generada a los 10 días post inmunización por la inoculación de fragmentos de TS y CP3: Análisis del perfil IgG1 e IgG2a de anticuerpos por técnica de ELISA. Se grafican los resultados obtenidos de la evaluación de anticuerpos de cada grupo experimental enfrentados a los distintos antígenos ensayados. **DO 450nm:** Densidad Óptica obtenida a 450 nm. **A) TSnt:** placa de ELISA sensibilizada con la proteína TSnt (** $p < 0,005$, unpaired t test). **B) TSf:** placa de ELISA sensibilizada con la proteína TSf. **C) CP3:** placa de ELISA sensibilizada con CP3 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ANOVA One-Way, post test de Tukey).

Con respecto a la prueba de DTH se observó que los fragmentos TSnt y TSf fueron los que mostraron los niveles más altos de inflamación local en comparación con el grupo control PBS ($p < 0,05$ ANOVA One-way, post test de Tukey). La quimera CP3, por otra parte, a pesar de haber generado gran cantidad de anticuerpos específicos mostró los niveles

más bajos de DTH. Con respecto al grupo mezcla TSf+CP3 se observó que los ratones inoculados solo con TSf mostraron niveles de DTH mayores, con una media de 0,6 mm, que aquellos ratones inoculados con CP3 que alcanzaron una media de 0,3 mm (Figura 14).

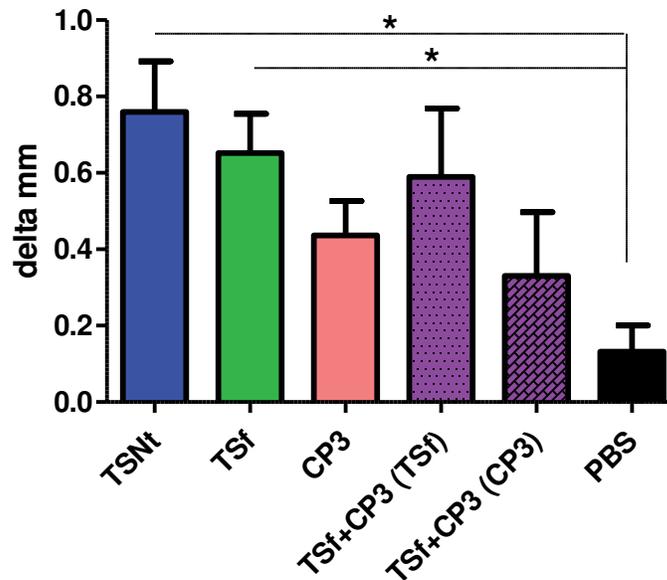


Figura 14: Evaluación de la respuesta inmune celular generada a los 10 días post inmunización por la inoculación de fragmentos de TS y CP3: Prueba de hipersensibilidad retardada (DTH). Los resultados se expresan como **delta mm** que hace referencia a la diferencia en mm de la inflamación observada en la pata inoculada a las 48 post inoculación (* $p < 0,05$, ANOVA One-way, post test de Tukey). **TSf+CP3 (TSf)**: ratones del grupo mezcla inoculados con la proteína TSf. **TSf+ CP3 (CP3)**: ratones del grupo mezcla inoculados con CP3.

A los 15 días finalizado el protocolo de inmunización y tras haber evaluado que los ratones fueron capaces de producir una respuesta inmune muy significativa, se procedió a desafiar estos ratones con 1.000 tripomastigotes *T. cruzi* de la cepa Tulahuen cl2, los cuales fueron inoculados por vía intraperitoneal. Una vez infectados los ratones se evaluó la parasitemia a los días 14, 21 y 28 post infección, el peso de los mismos y la supervivencia. Con respecto a esta última, se observó que en el grupo TSnt la supervivencia fue del 100%, en comparación con los grupos TSf y CP3 en donde solo el 40% de los ratones sobrevivió. Para el caso del grupo TSf+CP3 la supervivencia un poco

más alta, del 50%. El grupo control PBS no mostró supervivencia: todos los ratones de dicho grupo murieron antes del día 21 post infección, indicando que la letalidad del inóculo de *T. cruzi* en esta vuelta experimental fue muy alta ($p < 0,05$, Log-rank (Mantel-Cox test: TSNT vs PBS; TSf vs PBS; CP3 vs PBS; TSf+CP3 vs PBS; TSNT vs TSf; TSNT vs CP3) (Figura 15A).

En relación a la parasitemia se vio que todos los grupos vacunados mostraron un pico al día 21 post infección, sin diferencias en el número de parásitos entre cada uno de ellos, situación que lograron revertir al día 28 post infección. Esto se refleja en los valores obtenidos del área bajo la curva (AUC) para la parasitemia en donde no se observaron diferencias entre los distintos grupos (Figura 15B). En el grupo PBS se realizó solo la determinación de la parasitemia al día 14 post infección ya que los ratones murieron antes del día 21 post infección (Figura 15B y A).

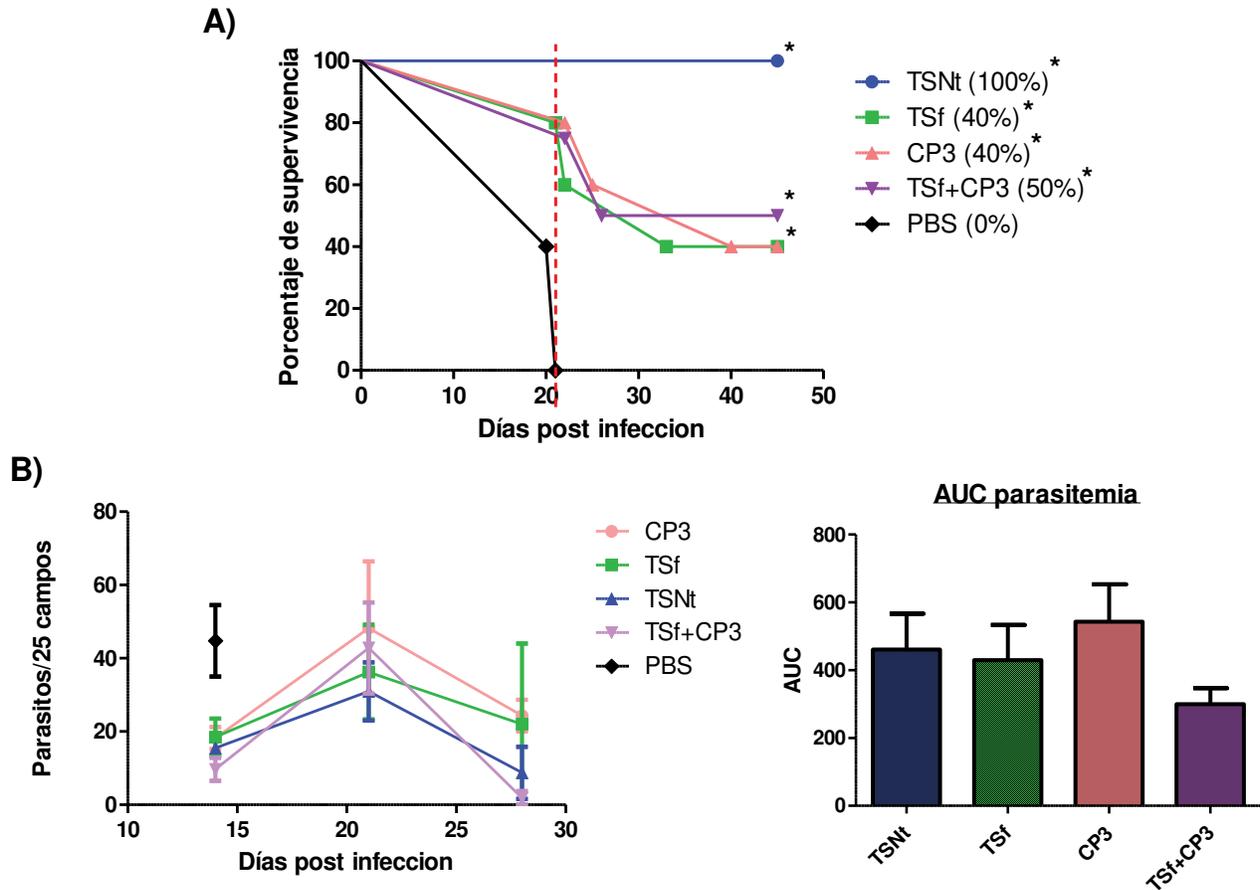


Figura 15: Evaluación de la capacidad protectora de los fragmentos de TS y CP3 ante un desafío con 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2. **A)** Supervivencia de los diferentes grupos experimentales (* $p < 0,05$, comparación entre grupos con Log-rank (Mantel-Cox) test: TSNt vs PBS, TSf vs PBS, CP3 vs PBS, TSf+CP3 vs PBS, TSNt vs TSf, TSNt vs CP3). La línea punteada roja (---) hace referencia al día 21 post infección, cuando ocurre el pico máximo de parasitemia. **B)** Parasitemia evaluada por microscopía directa contando 25 campos ópticos a los días 14, 21 y 28 post infección. **AUC parasitemia:** área bajo la curva de la parasitemia. El área bajo la curva (AUC) del grupo PBS no se muestra ya que la parasitemia de este grupo se registró solo al día 14 post infección. Estos resultados de protección son el promedio de dos experimentos diferentes.

El peso de los ratones fue evaluado semanalmente y los resultados se graficaron como la variación de este parámetro a lo largo de la infección, en donde al peso registrado se le restó el valor del peso registrado el día anterior. Se pudo ver que todos los ratones presentaron una ganancia de peso hasta el día 14 post infección, momento en el cual este parámetro comenzó a descender lo que se correlaciona con el incremento de la parasitemia. El grupo control PBS mostró la menor ganancia de peso a este día 14 post infección y se observó que alrededor del día 27 post infección todos los grupos alcanzaron

un peso similar, acercándose a su el peso original (Figura 16). La variación del peso del grupo PBS se resgistró hasta el día 20 post infección debido a su completa mortalidad registrada al día 21 (Figura 15A).

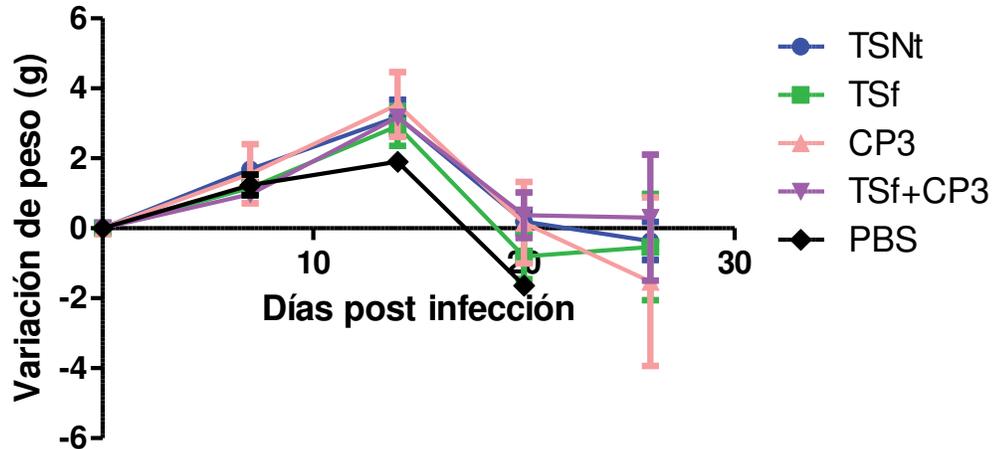


Figura 16: Evaluación de la variación en el peso de los ratones luego de un desafío con 1000 tripomastigotes Tulahuen cl2. La variación del peso se calculó restando el peso medido con el valor del peso registrado el día anterior.

1.IV.2) Evaluación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa:

Una vez expresados, purificados y cuantificados los fragmentos de TS se inmunizaron ratones BALB/c con estos antígenos formulados con el adyuvante ISPA [160]. No solo se ensayaron los fragmentos de manera individual, sino que también se evaluó la mezcla de los dos, inmunizando los ratones con 10 µg de TSNt y de TSf. Esta cantidad de antígeno a inocular en el grupo mezcla TSNt+TSf se ensayó previamente. En experimentos preliminares se probó una dosis de 5 µg de cada proteína en este grupo mezcla en donde no se observó protección de los ratones inmunizados y desafiados (información no mostrada), razón por la cual se decidió aumentar la cantidad de cada antígeno a 10 µg. Se determinó la respuesta inmune generada, tal y como se detalló anteriormente, a los 10 días finalizado el esquema de vacunación. Se pudo observar que los ratones

inmunizados con TSNT y TSf fueron capaces de producir elevados niveles de anticuerpos específicos tanto del perfil IgG1 como IgG2a ($p < 0,05$ vs grupo PBS, ANOVA One-way post test de Tukey). Con respecto a la evaluación del grupo TSNT+TSf frente a los antígenos TSNT y TSf por separado se encontró que dicho grupo fue capaz de generar altos niveles de anticuerpos del isotipo IgG1 e IgG2a contra los dos fragmentos por igual sin diferencias entre ellos ($p < 0,05$ vs grupo PBS, ANOVA One-way post test de Tukey) (Figura 17).

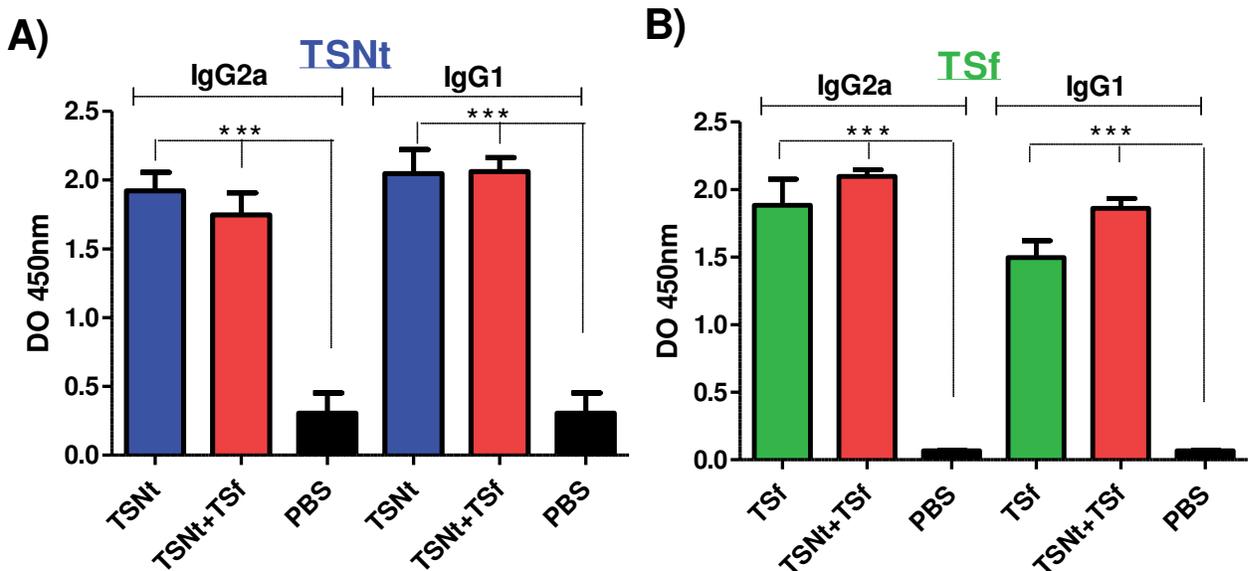


Figura 17: Evaluación de la respuesta inmune humoral generada a los 10 días post inmunización por la inoculación de fragmentos de TS: Análisis del perfil IgG1 e IgG2a de anticuerpos por técnica de ELISA. Se grafican los resultados obtenidos de la evaluación de anticuerpos de cada grupo experimental enfrentados a los distintos antígenos ensayados. **DO 450nm:** Densidad Óptica medida a 450 nm. **A) TSNT:** placa de ELISA sensibilizada con el fragmento TSNT. **B) TSf:** placa de ELISA sensibilizada con el fragmento TSf (** $p < 0,0005$, ANOVA One-Way, post test de Tukey).

En cuanto a la evaluación de la respuesta celular por DTH se obtuvo que los grupos TSNT y TSf fueron los que mayores valores de DTH mostraron con respecto al grupo control PBS ($p < 0,05$, ANOVA One-way, post test de Tukey). El grupo mezcla TSNT+TSf presentó mayores niveles de DTH, con una tendencia significativa, cuando se lo desafió con el fragmento TSNT en comparación con lo ocurrido frente al fragmento TSf ($p = 0,07$, Unpaired t test) (Figura 18).

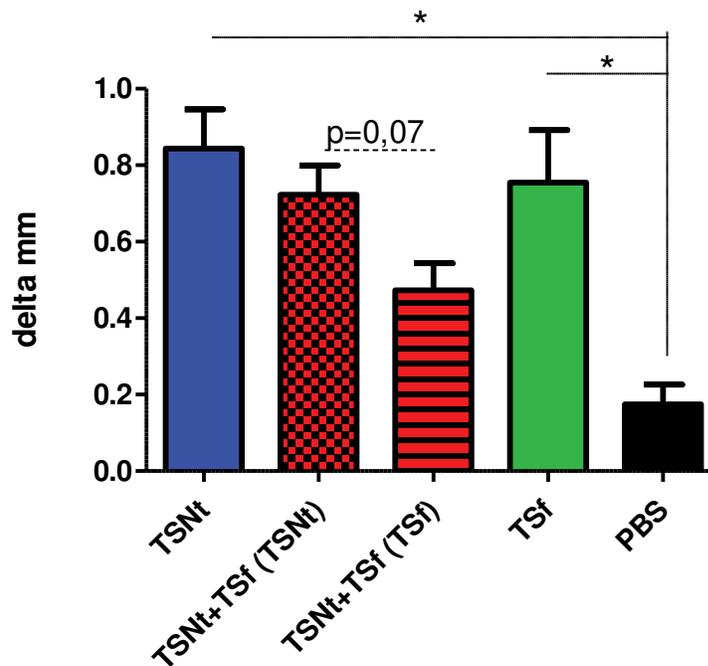


Figura 18: Evaluación de la respuesta inmune celular generada a los 10 días post inmunización por la inoculación de fragmentos de TS: Prueba de hipersensibilidad retardada (DTH). Los resultados se expresan como **delta mm** que hace referencia a la diferencia en mm de la inflamación observada en la pata inoculada a las 48 post inoculación. **TSNt+TSf (TSNt)**: ratones del grupo mezcla inoculados con el fragmento TSNt. **TSNt+ TSf (TSf)**: ratones del grupo mezcla inoculados con el fragmento TSf. (* $p < 0,05$, ANOVA One-way, post test de Tukey).

A los 15 días finalizado el protocolo de inmunización y tras haber evaluado que los ratones fueron capaces de producir una respuesta inmune significativa, se procedió a desafiar estos ratones con 1.000 tripomastigotes *T. cruzi* de la cepa Tulahuen cl2, los cuales fueron inoculados por vía intraperitoneal. En este experimento la infección también resultó en un 0% de supervivencia de los ratones del grupo control PBS al día 21 post infección, lo que muestra que el inóculo empleado fue muy virulento (Figura 19A). Al comparar la supervivencia en los grupos inmunizados, se determinó que en el grupo TSNt+TSf el 80% de los ratones sobrevivió; que en el grupo TSNt esta supervivencia fue del 60% y en el grupo TSf del 20% (* $p < 0,05$ para Log-rank (Mantel-Cox) Test: TSNt vs PBS, TSNt+TSf vs PBS) (Figura 19A).

Con respecto a la evaluación de la parasitemia se pudo observar que el grupo TSNt+TSf fue el que mostró los niveles más bajos de parásitos en sangre en los tres días post infección evaluados con el menor valor del AUC (**p< 0,005, ANOVA One Way, post test de Tukey TSNt+TSf vs TSNt) (Figura 19B). Los grupos TSNt y TSf, en cambio, mostraron un pico de parasitemia al día 21 post infección, el cual lograron reducir al día 28. El grupo TSNt mostró el mayor valor del AUC relacionada con la parasitemia (Figura 19 A). La parasitemia del grupo PBS se encuentra expresado solo al día 14 post infección ya que mostró una mortalidad del 100% al día 21 (Figura 19A y B).

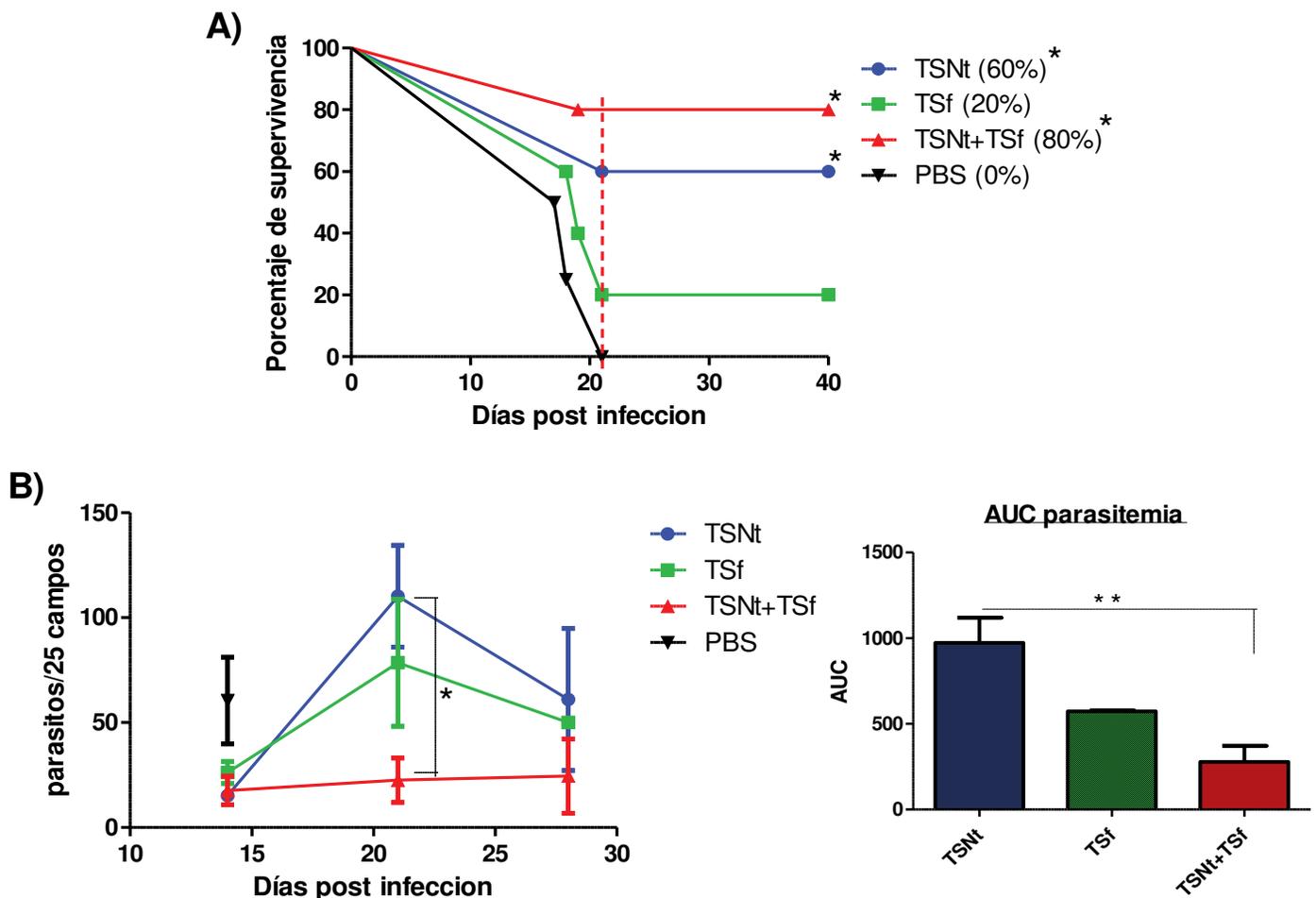


Figura 19: Evaluación de la capacidad protectora de los fragmentos de TS luego de un desafío con 1.000 tripomastigotes Tulahuen. **A)** Sobrevida de los diferentes grupos experimentales (*p< 0,05, comparación entre grupos con Log-rank (Mantel-Cox) Test: TSNt vs PBS, TSNt+TSf vs PBS). La línea punteada roja (---) hace referencia al día 21 post infección, cuando ocurre el pico máximo de parasitemia. **B)** Parasitemia

evaluada por microscopía directa contando 25 campos ópticos a los días 14, 21 y 28 post infección ($*p < 0,05$, Kruskal Wallis post *test* de Dunns: TSnt+TSf vs TSnt al día 21 post infección). **AUC parasitemia:** área bajo la curva de la evaluación de la parasitemia ($**p < 0,005$, ANOVA One Way, post *test* de Tukey). El AUC del grupo PBS no se muestra ya que la parasitemia de este grupo se registró al día 14. Estos resultados de protección son el promedio de dos experimentos diferentes.

El *score* clínico se evaluó dos veces por semana, en donde los ratones fueron examinados a lo largo de la infección en busca de manifestaciones clínicas las cuales fueron asociadas a un puntaje, tal y como se indica en la Tabla 4. Como resultado de este *score* clínico observamos que de todos los grupos tratados el grupo TSf mostró un mayor desarrollo de síntomas a lo largo de la infección con una mayor área bajo la curva (AUC) con respecto a los grupos TSnt y TSnt+TSf ($*p < 0,05$, ANOVA One-way, post *test* Tukey) (Figura 20A). Por otra parte, el grupo TSnt+TSf, exhibió los valores más bajos y constantes a lo largo del experimento, con un valor máximo de *score* de 5, a diferencia del grupo TSf el cual mostró un pico en este puntaje al día 21 post infección, con un valor promedio de 11,5. Para el caso del grupo TSnt su situación fue intermedia, en donde a pesar de haber mostrado un gran pico en el número de parásitos al día 21 post infección, el *score* registrado percibió niveles más bajos y constantes ($*p < 0,05$, ANOVA One-way post *test* de Tukey: TSnt+TSf vs TSf; TSnt vs TSf al día 21 post infección) (Figura 20A).

Por último, con respecto a la evaluación del peso se pudo observar que todos los grupos inmunizados mostraron una situación similar, con una ganancia de peso hasta el día 14 post infección y luego una disminución del mismo, lo que está asociado a un aumento en la parasitemia y en el *score* clínico. Al día 30 post infección se observó que todos los grupos tuvieron una misma variación de peso acercándose a sus valores originales (Figura 20B).

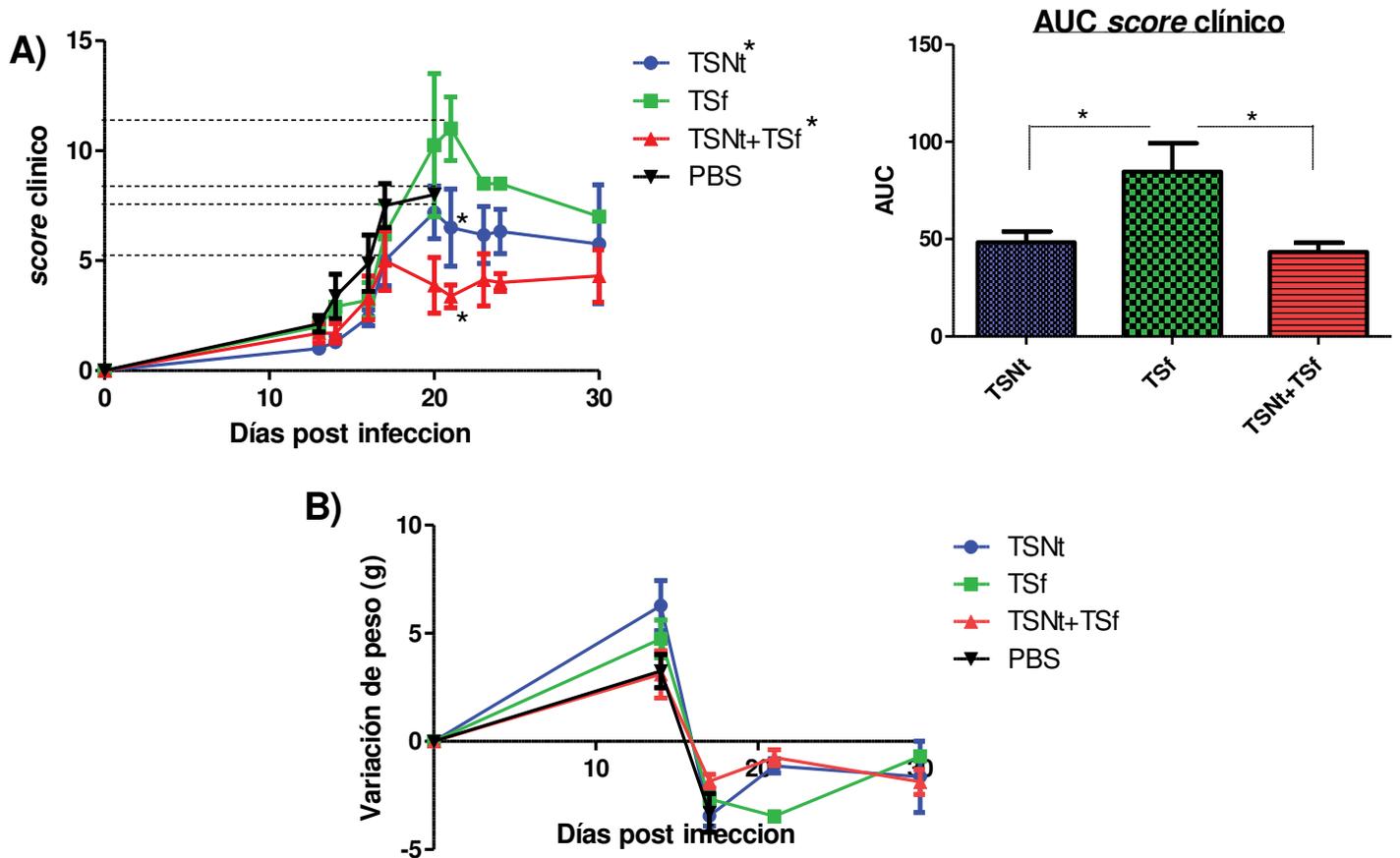


Figura 20: Evaluación de parámetros corporales luego de la infección con 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2. A) Score clínico relacionado a la aparición de síntomas en los ratones infectados (* $p < 0,05$, ANOVA One-way post test de Tukey: TSNt+TSf vs TSf y TSNt vs TSf al día 21 post infección). Las líneas punteadas negras (---) hacen referencia a los puntajes máximos de cada grupo. **AUC score clínico:** Área bajo la curva correspondiente al score clínico evaluado (* $p < 0,05$ ANOVA One- Way, post test de Tukey). No se muestra el valor del AUC del grupo PBS ya que el score del mismo se registró hasta el día 20 post infección. **B)** Evaluación de la variación en el peso de los ratones a distintos días post infección. Esta variación del peso se calculó restando el peso medido con el valor del peso anterior obtenido.

1.IV.3) Evaluación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa + ASP2:

Con el fin de encontrar candidatos vacunales que potencien la acción de los fragmentos de TS también se evaluó la inmunización con la proteína ASP2. Esta proteína, llamada "Proteína de Superficie expresada en Amastigotes 2" (ASP2) de *T. cruzi*, pertenece a la súper familia de la TS y solo se expresa en el estadio amastigote. Se inmunizaron ratones BALB/c con las diferentes formulaciones, como ya se venía

trabajando, y se evaluó un grupo mezcla de los tres antígenos TSNT+TSf+ASP2. Se decidió utilizar la proteína ASP2 para complementar la mezcla TSNT+TSf ya que esta fue la mejor formulación obtenida hasta ese momento. A los 10 días post inmunización se procedió a evaluar la respuesta inmune mediante ELISA, en donde se evaluó el isotipo IgG2a de los distintos grupos enfrentados a los antígenos individuales, y también se realizó una prueba de DTH, de la misma forma que se ha detallado en los otros experimentos realizados. De esta evaluación se observó que los grupos inmunizados con los antígenos particulares TSNT, TSf o ASP2 generaron un alto nivel de anticuerpos con diferencias significativas en comparación al grupo PBS (* $p < 0,05$, ANOVA One-way, post *test* de Tukey) (Figura 21 A, B y C). Con respecto a las mezclas de antígenos ensayados se observó que el grupo TSNT+TSf evidenció elevados niveles de anticuerpos tanto frente al fragmento TSNT como al fragmento TSf en relación al PBS (* $p < 0,05$, ANOVA One-way, post *test* de Tukey), sin diferencias entre cada antígeno (Figura 21 A y B), tal y como se ha observado en la vuelta anterior. Para el grupo TSNT+TSf+ASP2 se obtuvo que los niveles de anticuerpos más altos se registraron en presencia de la proteína ASP2 con valores promedio de DO de 1,4 en comparación con lo registrado con TSNT y TSf que mostraron valores de DO de 0,7 y 0,8 respectivamente (Figura 21C).

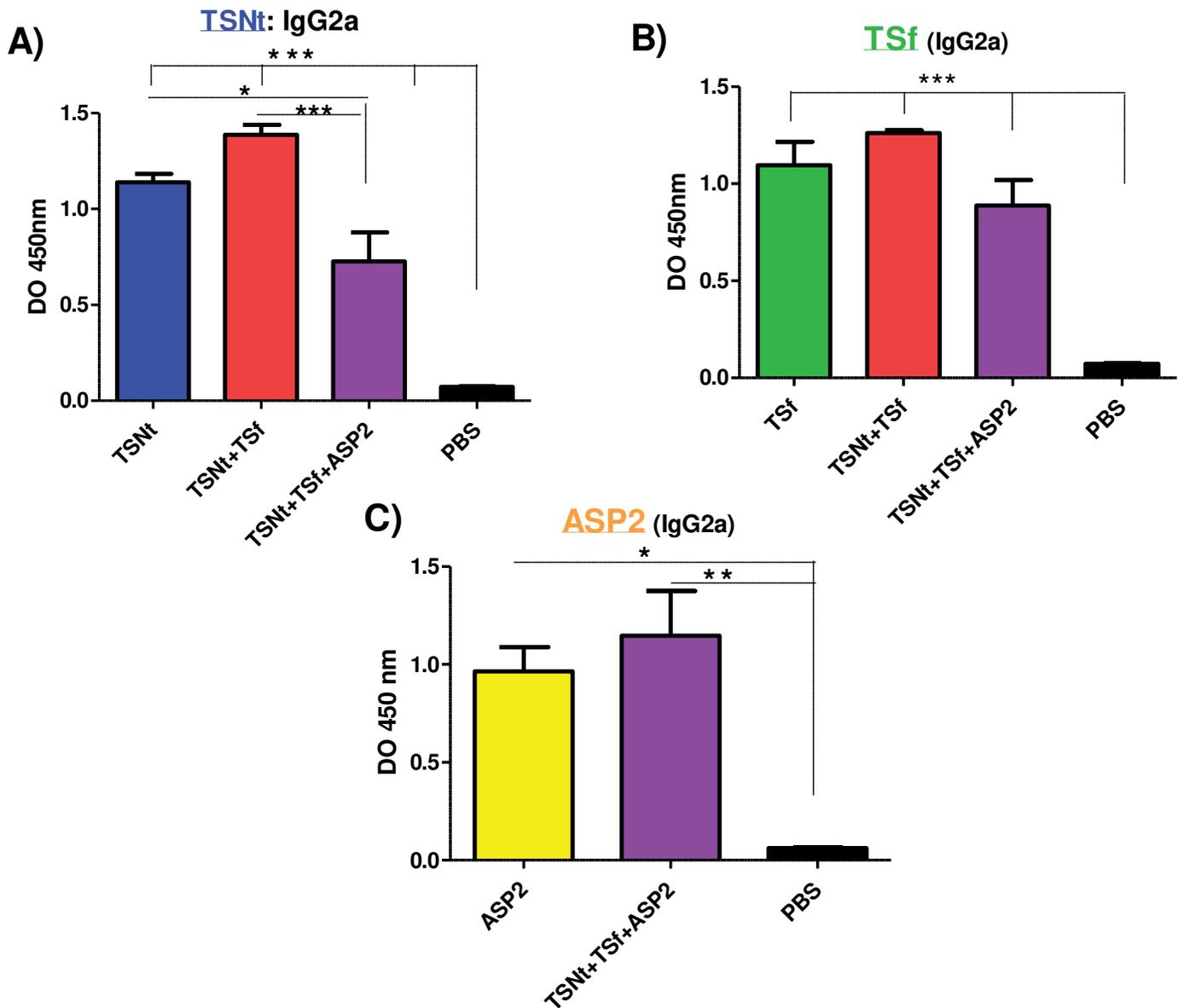


Figura 21: Evaluación de la respuesta inmune humoral generada a los 10 días post inmunización por la inoculación de fragmentos de TS y ASP2: Análisis de anticuerpos específicos del isotipo IgG2a por técnica de ELISA. Se grafican los resultados obtenidos de la evaluación de anticuerpos de cada grupo experimental enfrentados a los distintos antígenos ensayados. **DO 450nm:** Densidad Óptica medida a 450 nm. **A) TSNt:** placa de ELISA sensibilizada con el fragmento TSNt. **B) TSf:** placa de ELISA sensibilizada con el fragmento TSf. **C) ASP2:** placa de ELISA sensibilizada con el antígeno ASP2 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ ANOVA One-Way, post test de Tukey)

De la evaluación de la respuesta celular *in vivo* por DTH se observó que la inoculación con las distintas preteínas por separado (TSNt, TSf y ASP2) generó una buena

respuesta inflamatoria frente al estímulo con los antígenos específicos en comparación con el grupo PBS, siendo similar para todas las formulaciones ($***p < 0,0005$, $**p < 0,005$, ANOVA One-way, post test de Tukey). Para el caso del grupo que recibió la mezcla de los tres antígenos, TSNT+TSf+ASP2, se lo inoculó con las proteínas ASP2 y TSNT por separado, en donde se observó que los niveles de DTH fueron similares para cada antígeno, pero aquellos ratones del grupo mezcla desafiados con TSNT alcanzaron diferencias significativas respecto al grupo control PBS ($*p < 0,05$, ANOVA One-way, post test de Tukey) (Figura 22).

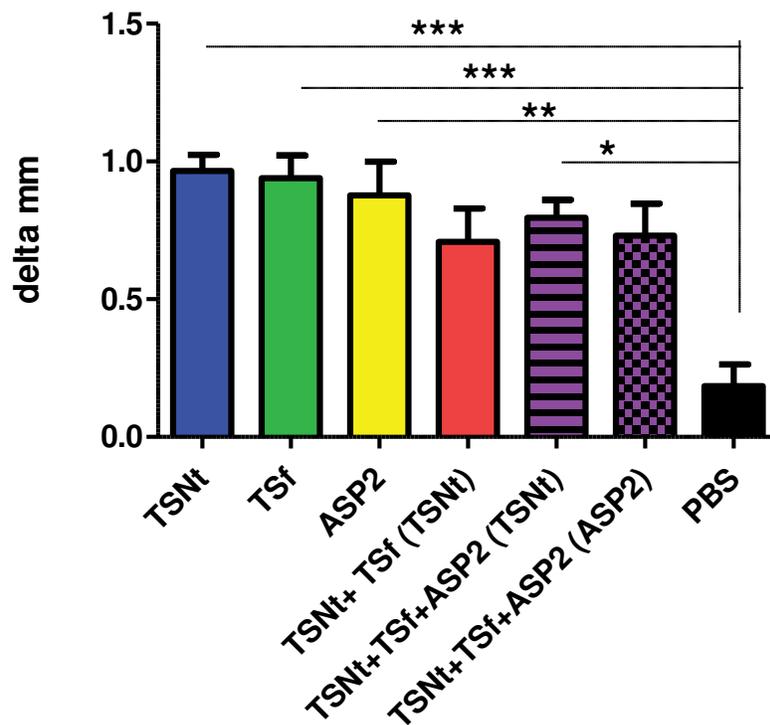


Figura 22: Evaluación de la respuesta inmune celular generada a los 10 días post inmunización por la inoculación de fragmentos de TS y ASP2: Prueba de hipersensibilidad retardada (DTH). Los resultados se expresan como la diferencia en mm de la inflamación observada a las 48 post inmunización. ($*p < 0,05$, $**p < 0,005$, $***p < 0,0005$ ANOVA One-way, post test de Tukey) **TSNT+TSf+ASP2 (TSNT):** ratones del grupo mezcla inoculados para DTH con TSNT. **TSNT+TSf+ASP2 (ASP2):** ratones del grupo mezcla inoculados para DTH con ASP2. (Debido al reducido número de ratones experimentales que se utilizan por vuelta, no se ha realizado una prueba de DTH contra el fragmento TSf).

Tal como se procedió en los anteriores ensayos, los ratones fueron desafiados con 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2 15 días post infección. Para evaluar la capacidad protectora de las distintas formulaciones vacunales se realizó un pesaje semanal de los ratones, evaluación del *score* clínico, parasitemia a los días 14, 21 y 28 post infección y un seguimiento de la supervivencia. Con respecto al análisis de supervivencia se observó que el grupo TSnt+TSf mostró los valores más altos, siendo este del 80%, seguido del grupo TSnt que presentó una sobrevida del 60% (* $p < 0,05$, comparación entre grupos con Log-rank (Mantel-Cox) *Test*: TSnt vs PBS, TSnt+TSf vs PBS) (Figura 23A). Estos resultados de supervivencia se correlacionan con lo obtenido en experimentos anteriores, en donde el grupo mezcla de los fragmentos mostraba los mayores valores seguido del grupo TSnt. Los grupos TSf y ASP2 solo tuvieron una supervivencia del 20% y el grupo control PBS del 0% al día 25 post infección (resultado similar también a lo obtenido en el experimento anterior) (Figura 23A). El agregado de ASP2 a la mezcla de fragmentos de la TS no mejoró el parámetro de supervivencia, sino que tuvo un efecto contrario, ya que la sobrevida fue solo del 20% (Figura 23A).

La evaluación del nivel de parásitos en sangre mostró que el grupo TSnt+TSf alcanzó los niveles más bajos y constantes a lo largo de los distintos días post infección con la menor AUC obtenida (ANOVA One Way, post *test* de Tukey, * $p < 0,05$: TSnt+TSf vs TSnt, ** $p < 0,005$: TSnt+TSf vs TSnt+TSf+ASP2) (Figura 23B). Los grupos inmunizados restantes mostraron un pico de parasitemia al día 21 post infección que luego lograron disminuir al día 28 (Figura 23B). En este pico de parasitemia al día 21 post infección se observó que el grupo TSnt+TSf+ASP2 presentó los mayores valores y la mayor AUC (Figura 23B). El grupo control PBS al día 21 post infección presentó, con una supervivencia del 20%, un nivel intermedio de parasitemia (Figura 23B) mientras que no existen valores de parasitemia al día 28 ya que no mostró supervivencia para esa fecha (Figura 23A).

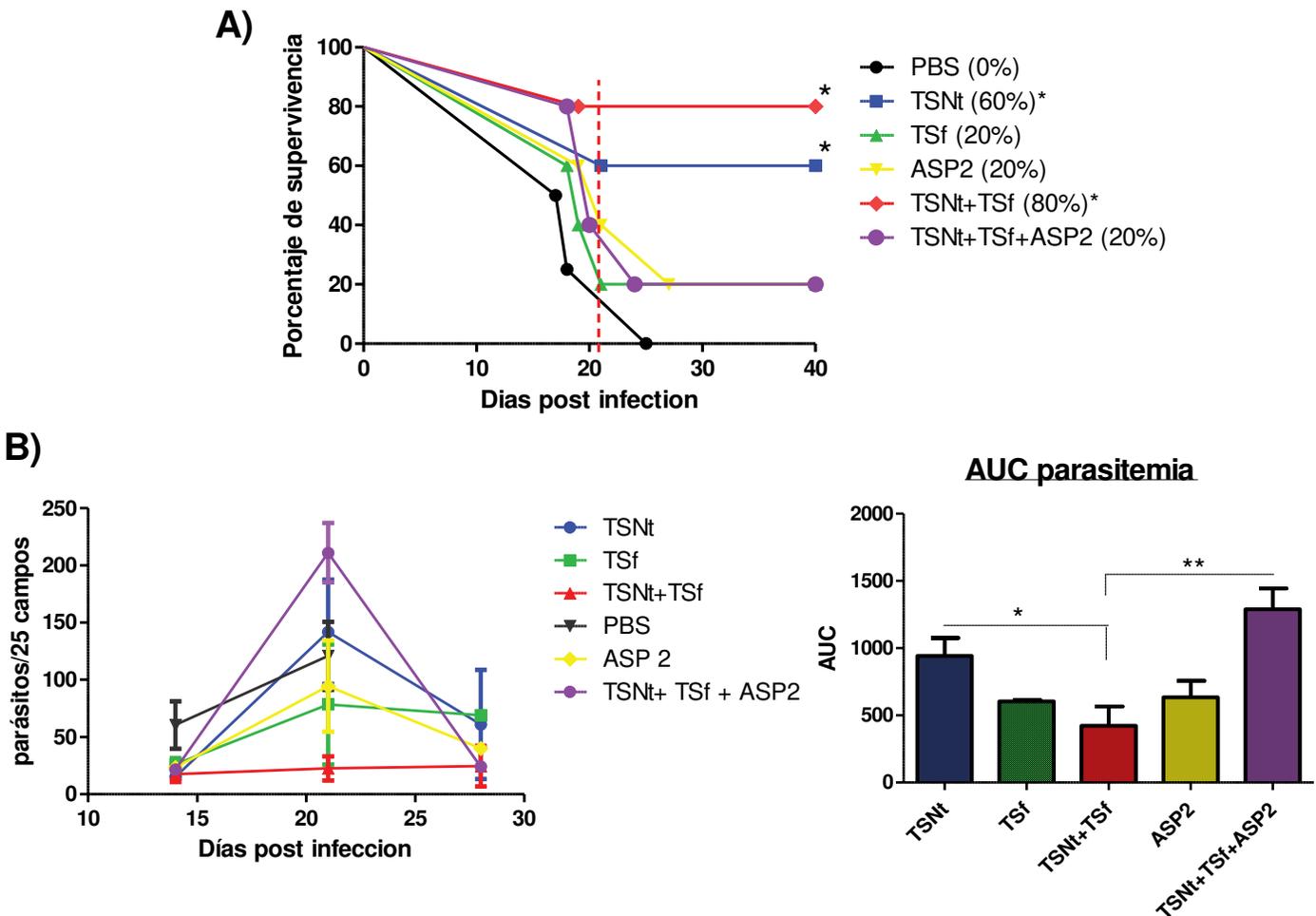


Figura 23: Evaluación de la capacidad protectora de los fragmentos de TS + ASP2 luego de un desafío con 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2. **A)** Supervivencia de los diferentes grupos experimentales (* $p < 0,05$, comparación entre grupos con Log-rank (Mantel-Cox) Test: TSNt vs PBS, TSNt+TSf vs PBS). La línea punteada roja (---) hace referencia al día 21 post infección, cuando ocurre el pico máximo de parasitemia. **B)** Parasitemia evaluada por microscopía directa contando 25 campos ópticos a los días 14, 21 y 28 post infección. **AUC parasitemia:** área bajo la curva de la evaluación de parasitemia. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ANOVA One-way, post test de Tukey). El área bajo la curva del grupo PBS no muestra ya que la parasitemia solo se midió hasta el día 21 post infección. Estos resultados de protección son el promedio de dos experimentos diferentes.

Del análisis del *score* clínico se pudo observar una situación similar a la de la parasitemia, en donde el grupo TSNt+TSf presentó los menores valores a lo largo de la infección, con un valor promedio máximo de *score* de 5 puntos (Figura 24A). Del resto de los grupos inmunizados el grupo TSNt mostró los valores más bajos, con un pico máximo de 7,5 puntos, y se observó que alcanzó valores similares al grupo TSNt+TSf al día 30 post

infección (Figura 24A). Los grupos ASP2, TSf y TSNt+TSf+ASP2 presentaron un pico en los valores de *score* al día 21 post infección, en donde el grupo ASP2 registró un puntaje máximo promedio de 8,75 y los otros grupos de 11 (* $p < 0,05$, ANOVA One-way post test de Tukey: TSNt+TSf vs TSf y TSNt+TSf vs TSNt+TSf+ASP2 al día 21 post infección). A partir de esa fecha se observó que el grupo ASP2 disminuyó este puntaje asociado a la presencia de signos clínico, pero los grupos TSf y TSNt+TSf+ASP2 se mantuvieron en el mismo nivel (Figura 24A). Esto se representa en la gráfica del AUC del *score* clínico en donde se observó que el grupo TSf fue le que mostró una mayor área total y que los grupos TSNt, TSNt+TSf y ASP2 lograron disminuir dicha área (ANOVA One- Way, post test de Tukey: * $p < 0,05$, TSNt vs TSf y ASP2 vs TSf; ** $p < 0,005$, TSNt+TSf vs TSf) (Figura 24A). Los valores de *score* clínico del grupo PBS se expresaron hasta el día 24 post infección ya que al día 28 la mortalidad del 100% (Figura 23A).

En cuanto a la evaluación del peso de los ratones a lo largo de la infección se observó que todos los grupos presentaron una ganancia de peso hasta el día 14 post infección y luego una disminución del mismo, lo que está asociado a un aumento en la parasitemia y al *score* clínico. Al día 30 post infección se observó que todos los grupos mostraron un aumento del peso acercándose a sus valores originales (Figura 24B).

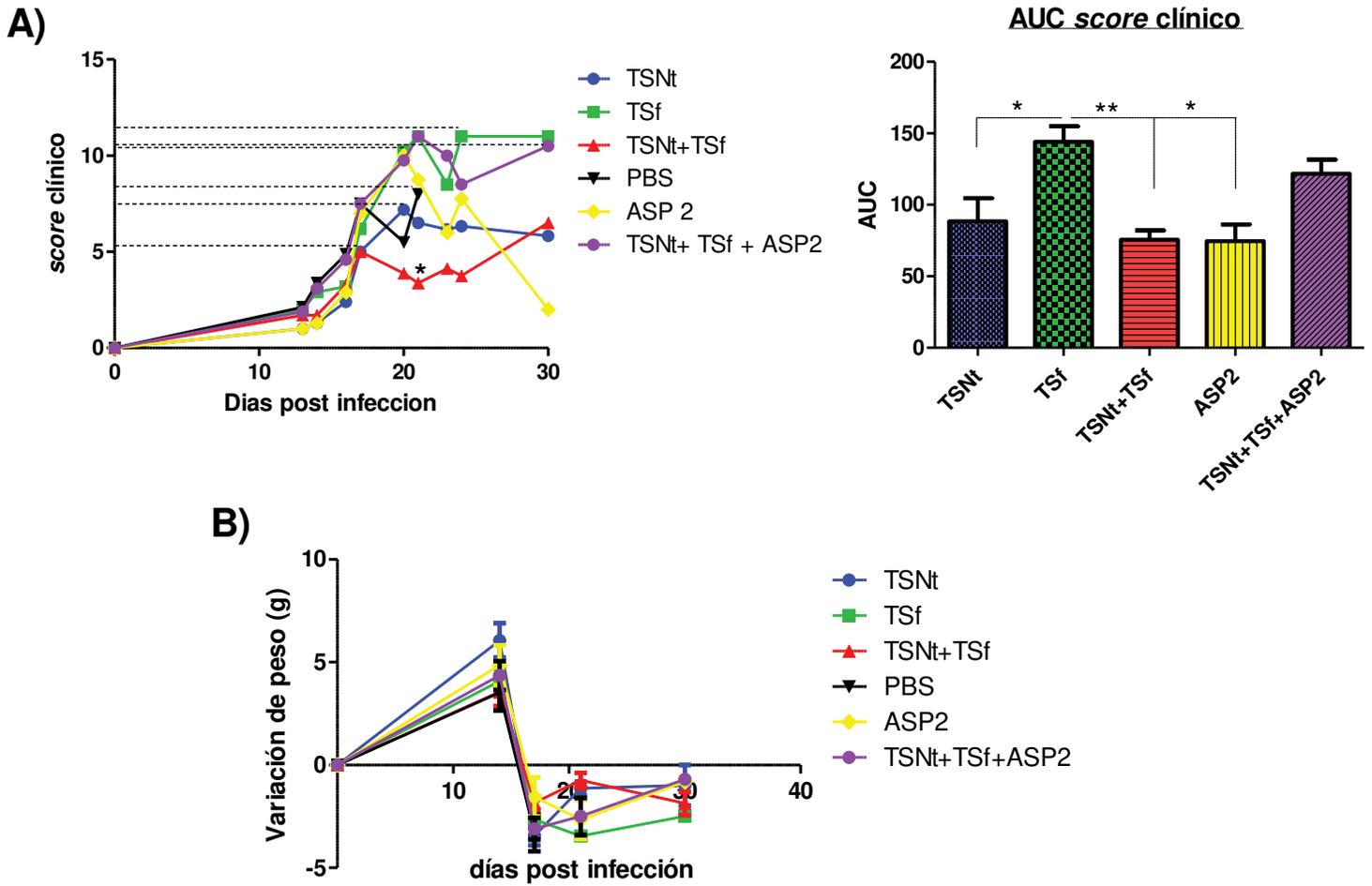


Figura 24: Evaluación de parámetros corporales luego de la infección con 1000 tripomastigotes Tulahuen cl2. A) Score clínico relacionado a la aparición de síntomas en los ratones infectados (* $p < 0,05$, ANOVA One-way post test de Tukey: TSNt+TSf vs TSf y TSNt+TSf vs TSNt+TSf+ASP2 al día 21 post infección) **AUC score clínico**: Área bajo la curva correspondiente al score clínico evaluado hasta el día 30 post infección (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ANOVA One-way, post test de Tukey). No se muestra el valor del AUC del grupo PBS ya que el score del mismo se registró hasta el día 23 post infección. Las líneas punteadas negras (---) hacen referencia a los puntajes máximos de cada grupo. **B) Evaluación de la variación en el peso de los ratones** a distintos días post infección. Esta variación del peso se calculó restando el peso medido con el valor del peso anterior obtenido.

1.V)Discusión:

Aunque la enfermedad causada por el parásito *T. cruzi* fue descrita por el Dr. Chagas hace más de cien años, aún no se ha logrado desarrollar un tratamiento efectivo para las personas en la fase crónica de la enfermedad, ni una vacuna que sea esterilizante para el parásito e impida la infección. Como ya se ha descrito anteriormente, en la actualidad se dispone de dos drogas parasiticidas Bz y Nx, las cuales son muy efectivas para el tratamiento de la etapa aguda de la infección pero no han mostrado ser efectivas cuando se aplican en la etapa crónica de la misma [82], [84]. Estos tratamientos, además de no haber demostrado beneficios, implican regímenes de administración de 60 días para el Bz y de 60-90 días para el caso del Nx, requieren un importante gasto económico y de logística para lograr que los pacientes acudan al hospital, generan numerosos efectos adversos y no pueden ser aplicados en embarazadas ni personas con enfermedades renales o hepáticas [106]. Además, como la fase aguda de la enfermedad en la mayoría de los casos es asintomática y solo se detecta en el estadio crónico, cuando ya los tratamientos disponibles no son efectivos, el desarrollo de alternativas profilácticas representaría un gran avance hacia el control efectivo de la infección por *T. cruzi* y prevenir así el desarrollo de lesiones crónicas que esta infección causa [113]. Dentro de estas posibilidades, y con una importante perspectiva a futuro, se encuentra la utilización de vacunas. El desarrollo de una vacuna profiláctica contra el *T. cruzi* sería clave para evitar la infección en zonas endémicas en donde la transmisión vectorial no se ha logrado aún contener. Este enfoque particular sobre el uso de vacunas recién comenzó a cobrar protagonismo en los últimos 30 años, ya que durante gran parte del siglo pasado prevaleció la hipótesis de que la enfermedad de Chagas era una progresión autoinmune, desencadenada por la infección con el parásitos [166]. Actualmente se sostiene la idea de que la magnitud de las lesiones que se desarrollan en la infección por *T. cruzi* son directamente proporcionales a la presencia del parásito y al daño causado por el mismo [73], [74]. Esto implica que la eliminación de dicho parásito resultaría en la reducción o

eliminación de las lesiones observadas en la fase crónica de la infección [57]. En este sentido, el mayor conocimiento disponible sobre la respuesta inmune generada y la utilización de adyuvantes de última generación, han llevado al resurgimiento de la búsqueda de vacunas contra la infección por este parásito [100].

En nuestro laboratorio se han obtenido resultados muy promisorios con una vacuna profiláctica en base a la utilización de una TS mutada inactiva expresada en levaduras (T_{Sm}), formulada con el adyuvante ISCOMATRIX™ [130], [152]. De acuerdo a estos antecedentes, en el trabajo de tesina de grado de quien suscribe, se obtuvieron dos fragmentos de la proteína TS para continuar con el estudio de estos candidatos vacunales [162]. El sentido de obtener estos nuevos fragmentos se debió a que la T_{Sm}, provenía de un laboratorio extranjero que luego vendió los derechos sobre la proteína a una empresa, por lo cual no se ha podido continuar utilizándola, y es por esta razón que se comenzó con la producción propia de estos antígenos. Se decidió obtener dos porciones de la TS ya que fragmentos de un menor tamaño son más apropiados para ser amplificados por PCR, subclonados y expresados en bacterias. Estos fragmentos proteicos de TS han sido utilizados por nuestro grupo de trabajo para clonarse en *M. Bovis* de la recombinante BCG y se han ensayado como una plataforma promisoriosa para el desarrollo de vacunas profilácticas contra *T. cruzi*. En dicho trabajo se evaluaron fracciones de las proteínas Cz y TS, en donde se obtuvo que TS clonada dentro de BCG mostró los mejores resultados de protección: aumento de la sobrevivencia, disminución del grado de lesiones en corazón y la generación de una respuesta inmune caracterizada por el aumento de células T CD4+ y CD8+ productoras de INF γ [120].

Estos fragmentos de TS utilizados en este trabajo de tesis, que hemos denominado TS_{Nt} y TS_f, tienen un peso molecular de 35 kDa aproximadamente, en donde el fragmento TS_{Nt} abarca desde el aa 63 al 346 de la proteína TS entera, mientras que el fragmento TS_f va desde el aa 335 al 625, tal como se esquematiza en la Figura 11. En el diseño de estos fragmentos de TS no se incluyó la secuencia repetitiva SAPA, ubicada en el extremo carboxilo terminal de la proteína, ya que existe evidencia que la función de esta sería distraer al sistema inmune [135], [142], [167].

En todos los experimentos realizados a lo largo de este trabajo de tesis las diferentes proteínas fueron formuladas con el adyuvante ISPA. Como ya se explicado en el capítulo introductorio, este adyuvante está compuesto por Quil-A, fosfatidilcolina, colesterol, esterilamina y tocoferol, posee forma de cajas lipídicas y es un desarrollo de nuestro laboratorio en conjunto con la empresa Lipomize SRL. Es un adyuvante que ha demostrado estabilidad a lo largo del tiempo y ser capaz de generar una respuesta de anticuerpos balanceada TH1/TH2 cuando se inmunizaron ratones con BSA-ISPA [160]. Recientemente, se ha publicado que este adyuvante ISPA es capaz de generar una fuerte respuesta humoral cuando se inmunizan vacas con una formulación para prevenir la fiebre aftosa [161]. En un trabajo previo hemos evaluado la capacidad protectora de este adyuvante ISPA sin antígenos específicos frente a un desafío por *T. cruzi*, en donde se observó que el adyuvante por sí solo no es capaz de generar anticuerpos específicos ni de aumentar la sobrevivencia de los ratones infectados [156]. Es por esta razón que en este trabajo de tesis no se ensayaron grupos de ratones con el adyuvante ISPA solo.

Se comenzó este trabajo evaluando los fragmentos TSNT y TSf en conjunto con la quimera CP3. Esta proteína, como ya se ha explicado anteriormente, ha sido desarrollada en nuestro laboratorio para el diagnóstico de Chagas crónico mediante técnica de ELISA y está conformada por las proteínas antigénicas de *T. cruzi*: MAP, TcD y TSSA [163]. Las proteínas MAP y TcD son antígenos inmunodominantes del *Trypanosoma cruzi* con secuencias repetitivas que han sido ampliamente ensayados como proteínas de diagnóstico [124], [168], y la proteína TSSA, por otra parte, es una mucina de superficie de tripomastigotes que se ha visto que genera una fuerte respuesta de anticuerpos en humanos y animales infectados [169]. La idea de utilizar esta nueva quimera como antígeno vacunal se debe a que las proteínas que la conforman han sido descritas como inmunogénicas [170]–[172] y nunca han sido evaluadas como candidatos vacunales a pesar de generar una importante respuesta inmune humoral en las personas infectadas.

En un primer análisis se evaluaron las dos fracciones de TS, TSf y TSNT, y la proteína CP3. Ya se disponía de resultados previos en relación a TSf que indicaban que generaba protección frente al desafío contra *T. cruzi* y la generación de una fuerte

respuesta inmune [156]. En relación a TSNT, las evaluaciones previas no habían arrojado resultados favorables debido a que, según nuestra hipótesis, su proceso de obtención hasta el momento no había sido satisfactorio. Dado que en esta oportunidad se logró optimizar la obtención de dicho antígeno se proyectó nuevamente su evaluación. En esta etapa no se realizó la evaluación de la mezcla TSf+TSNT ya que se evaluó primero si la fracción TSNT como antígeno vacunal era satisfactoria. En relación a CP3, se planteó evaluarla como antígeno vacunal que mejorara el desempeño de TSf. Por eso se la evaluó en conjunto con TSf pero también sola para tener un control de la protección que dicho antígeno porta de modo individual.

De este análisis se observó que la quimera CP3 fue el antígeno que produjo los niveles más elevados de anticuerpos específicos, especialmente del perfil IgG2a (Figura 13), hecho que era de esperarse ya que esta quimera fue originalmente diseñada para ser aplicado en el diagnóstico de Chagas crónico por ELISA [163] por lo que está conformada por proteínas altamente productoras de anticuerpos [169], [171], [172]. Con respecto a la evaluación de la respuesta celular *in vivo* por medio de la prueba de DTH se vio, en cambio, que la inmunización con CP3 generó bajos niveles de inflamación local específica sin diferencias significativas con respecto al grupo control PBS (Figura 14). Este hecho coincide con lo observado en trabajos en donde utilizaron a los antígenos recombinantes repetitivos de citoplasma (CRA) y flagelar (FRA) para inmunizar ratones BALB/c y C57BL/6 en donde se observó que estas proteínas repetitivas eran capaces de generar altos niveles de anticuerpos pero baja respuesta celular [173], [174]. La inmunización con los fragmentos proteicos de TS (TSNT y TSf) mostró elevados niveles de anticuerpos específicos y de DTH (Figura 13 y 14). En acuerdo con estos resultados, ambas fracciones antigénicas ya habían mostrado generar una buena respuesta inmune celular cuando se ensayaron dentro del sistema de *delivery* BCG [120]. En relación a la mezcla TSf+CP3 se observó que esta formulación produjo altos niveles de anticuerpos contra la quimera CP3 en comparación con lo ocurrido con el fragmento TSf, en donde los niveles de anticuerpos contra dicho fragmento de TS se redujeron a la mitad (* $p < 0,05$ t test) (Figura 13). Esto nos indica que al inmunizar con las dos proteínas la quimera CP3 conservó la

capacidad de generar anticuerpos contra ella misma pero disminuyó significativamente la capacidad de respuesta contra el antígeno TSf que acompaña la mezcla. Con respecto a la evaluación de la respuesta *in vivo* por DTH se encontró que esta mezcla produjo los mayores niveles de inflamación local contra el fragmento TSf en contraste con lo ocurrido con la quimera CP3 en donde los niveles disminuyeron a la mitad (Figura 14).

En la evaluación de las distintas formulaciones vacunales se ha considerado que los parámetros clínicos de parasitemia y la supervivencia constituyen los indicadores más confiables de protección cuando se puede disponer de un modelo de infección adecuado, ya que estos parámetros integran toda la respuesta inmune para finalmente terminar indicando protección o falta de protección [88], [175]. El desafío con *T. cruzi* fue realizado a los quince días luego de la última inmunización en donde se empleó una dosis de 1000 tripomastigotes Tulahuen cl2 inoculados por vía intraperitoneal, ya que según experiencias previas en nuestro laboratorio la misma permite obtener una letalidad del 50% del grupo control PBS, siendo este un parámetro que permite sensibilidad para evaluar protección en los grupos tratados [130], [152], [156]. Sin embargo, cabe aclarar que al ser un modelo experimental *in vivo* la letalidad que genera el inóculo de *T. cruzi* en los ratones infectados puede variar entre los distintos experimentos, como ocurrió en esta vuelta experimental en donde se produjo el 100% de mortalidad en el grupo control PBS al día 21 post infección, lo que indica que la letalidad del inóculo de parásito fue alta. A pesar de esta gran mortalidad del grupo control a tempranos días post infección, se observó que el 100% de los ratones del grupo TSNT sobrevivió. El grupo TSf, al igual que el grupo CP3, mostraron una supervivencia del 40% y para el caso del grupo TSf+CP3 este parámetro alcanzó un valor del 50% (Figura 15A). La medición de parasitemia se realizó de los 14, 21 y 28 días post infección, en donde se observó que si bien todos los grupos vacunados presentaron un nivel bajo de parasitemia al día 14 post infección y similar entre ellos, fue el grupo TSNT el que mostró los niveles más bajos y estables a lo largo de las distintas determinaciones. Los grupos TSf, TSf+CP3 y CP3 mostraron un elevado pico de parasitemia al día 21 post infección y solo el grupo mezcla, TSf+CP3, disminuyó esta parasitemia al día 28 (Figura 15B).

Con respecto al análisis de los parámetros de protección evaluados se puede observar que el empleo de la quimera CP3 como antígeno vacunal no permitió una mejor protección que los fragmentos de TS, en donde si bien la respuesta de anticuerpos obtenida fue muy elevada, la respuesta celular evaluada por DTH fue baja. La proteína CP3 presentó un desempeño similar al del fragmento TSf, pero al mezclar ambos antígenos (TSf+CP3) no se observó cambio en los parámetros de supervivencia y parasitemia, lo que nos indica que no hubo una complementación de los antígenos ni sinergia entre los mismos. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio ya se habían probado como inmunógenos diferentes antígenos usados con fines de diagnóstico clínico, pero no habían sido evaluados los que conforman a CP3 [130]. En dicho trabajo se evaluaron como candidatos vacunales proteínas altamente inmunogénicas que contienen repeticiones en tándem, como lo son FRA, Tc3 y Tc6, las cuales han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico de Chagas [130]. Lo que se obtuvo como resultado es que estas proteínas fueron capaces de generar una elevada respuesta de anticuerpos específicos que justamente no se correlacionó con el nivel de protección, ya que los ratones no superaron un porcentaje de supervivencia del 50% cuando el grupo control PBS alcanzó un nivel del 33% [130]. A diferencia de lo observado en dicho trabajo [130], la evaluación de la proteína CP3, la cual está formada por dos antígenos con repeticiones en tándem como lo es MASP y TcD, mostró un valor de supervivencia del 40% cuando la letalidad del inóculo de *T. cruzi* provocó la muerte del 100% del grupo control PBS, mostrando un nivel de protección similar al fragmento TSf. Esta protección alcanzada, debido a lo ya observado con las proteínas con repeticiones en tándem, podría atribuirse a la presencia de la proteína TSSA, la cual nunca ha sido ensayada como candidato vacunal.

Esta proteína TSSA (*Trypomastigote Small Surface Antigen*) es una molécula pequeña perteneciente a la familia de las mucinas la cual se encuentra anclada a la membrana por un motivo GPI y solo se expresa en la superficie de tripomastigotes [169]. Se ha visto que es una proteína linaje dependiente y se han descrito dos isoformas principales expresadas por los linajes TcI (TSSA I) y TcVI (TSSA VI) de *T. cruzi* [169], [176].

Se ha observado que esta TSSA, en especial la TSSA VI, es una proteína altamente inmunogénica capaz de producir elevados niveles de anticuerpos y, como es linaje dependiente, se ha propuesto como el primer marcador inmunológico de los subgrupos genéticos de *T. cruzi* [169], [170], [177]. También se demostró que esta proteína interviene en el proceso de invasión celular, que regula la infectividad y diferenciación del *T. cruzi* y que es capaz de producir anticuerpos neutralizantes de la infección [171], [178], lo que la convierte en un candidato promisorio para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, para corroborar esta acción de la TSSA como candidato vacunal habría que probarla sola, actividad que ya hemos planteado como perspectiva a realizar a futuro.

De la evaluación de los fragmentos de TS se observó que a pesar de que las dos proteínas, TSNt y TSf, mostraron ser capaces de montar una buena respuesta de anticuerpos y de DTH, el fragmento TSNt fue el que evidenció una notable mejora en los parámetros de protección, con los menores niveles de parásito en sangre y una supervivencia del 100% en comparación con el grupo TSf que presentó un valor del 40%. Esta mejor capacidad protectora del extremo amino terminal de la TS (TSNt) en comparación con el carboxilo terminal (TSf) coincide con lo que ya hemos reportado en la evaluación de dichos fragmentos utilizando BCG recombinante como sistema de *delivery* para la vacunación [120]. En dicho trabajo observamos que si bien la respuesta humoral generada luego de la inmunización de ratones BALB/c con dichas BCG recombinantes fue muy baja, se consiguió una fuerte respuesta de DTH con ambos fragmentos, aspectos compatibles con la respuesta inmune generada por BCG. Sin embargo, cuando se desafiaron los ratones inmunizados con tripomastigotes Tulahuen cl2 los mayores niveles de supervivencia se obtuvieron con el fragmento amino terminal, que mostró niveles de protección del 60% y 80%, en contraste con el fragmento carboxilo terminal, que alcanzó niveles de protección del 20% y 60% [120]. Esta elevada capacidad protectora del extremo amino terminal frente al carboxilo, en donde se observan respuestas inmunes humorales y celulares similares, podría explicarse por la presencia del epítipo inmunodominante para células TCD8+ llamado TSKd1 (IYNVGQVSI) [150], [179]. Este epítipo, tal y como se ha mencionado anteriormente, ha demostrado ser

crítico para alcanzar la protección de ratones BALB/c frente a un desafío letal por *T. cruzi*, en donde se ha observado que una mutación en dicho epítopo disminuye del 80% al 30% la supervivencia de ratones inmunizados con ADN de TS [151]. Lamentablemente, la evaluación de la respuesta inmune celular generada por las distintas formulaciones vacunales ensayadas, que podría arrojar luz sobre este resultado, es una actividad que quedó pausada a causa del ASPO (aislamiento social, preventivo y obligatorio) originado por la pandemia generada por el virus SARS-CoV-2.

Por otra parte, al analizar la secuencia del fragmento TSNT puede verificarse que los aminoácidos que son claves para la función catalítica están conservados en dicha fracción obtenida. Previamente se ha descripto cuales son los aminoácidos involucrados en la actividad enzimática de la TS, en base a análisis cristalográficos de dicha enzima (Tabla 5) [135] y se observó que los mismos están distribuidos a lo largo de la estructura tridimensional de la proteína (Figura 25). La mayoría de estos aminoácidos (salvo la Arg 35 y Pro 283) se encuentran en el fragmento TSNT y la conservación de los mismos nos permite inferir que anticuerpos neutralizantes formados contra distintas regiones del antígeno puedan inhibir la actividad enzimática favoreciendo la sobrevida observada en los ensayos. Sin embargo, un ensayo de neutralización de anticuerpos debería realizarse para corroborar esto.

Tabla 5: Aminoácidos involucrados en la actividad enzimática de la proteína TS [135]. Se indica la posición de los aa, su función y su conservación en la fracción TSnt.

| Aminoácidos Clave | Función | Presencia y conservación en el fragmento N terminal |
|--|--|---|
| Arginina 35, 245 y 314 | Unen grupos carboxilos presentes presente en ac siálico | Presentes y conservados los aa 245 y 314. No se encuentra el aa 35 ya que el fragmento comienza en el 63. |
| Aspartico 59 | Esencial para la catálisis por ser dador de protones | No presente, ya que el fragmento comienza en el aa 63. |
| Valina 95, leucina 176 y triptófano 312 | Definen al bolsillo hidrofóbico que une al grupo N-acetil del ácido siálico; | Presentes y conservados |
| Aspartico 96 | Ubicado en el fondo del bolsillo interacciona con el sustrato (SIA y gal); | Presentes y conservados |
| Tirosna 119 junto con tirosina 248 y triptófano 120, valina 203 y triptófano 312 | Definen un microambiente hidrofóbico que contribuyen a extraer el agua del centro de reacción para favorecer la transglucosilacion | Presentes y conservados |
| Ac glutámico 230 junto con Tirosina 342 | Presentes en el piso del sitio activo y estabilizan el estado de transición | Presentes y conservados |
| Prolina 283 | Ayuda al triptófano 312 a estar más cerca del sitio catalítico | Presentes y conservados |

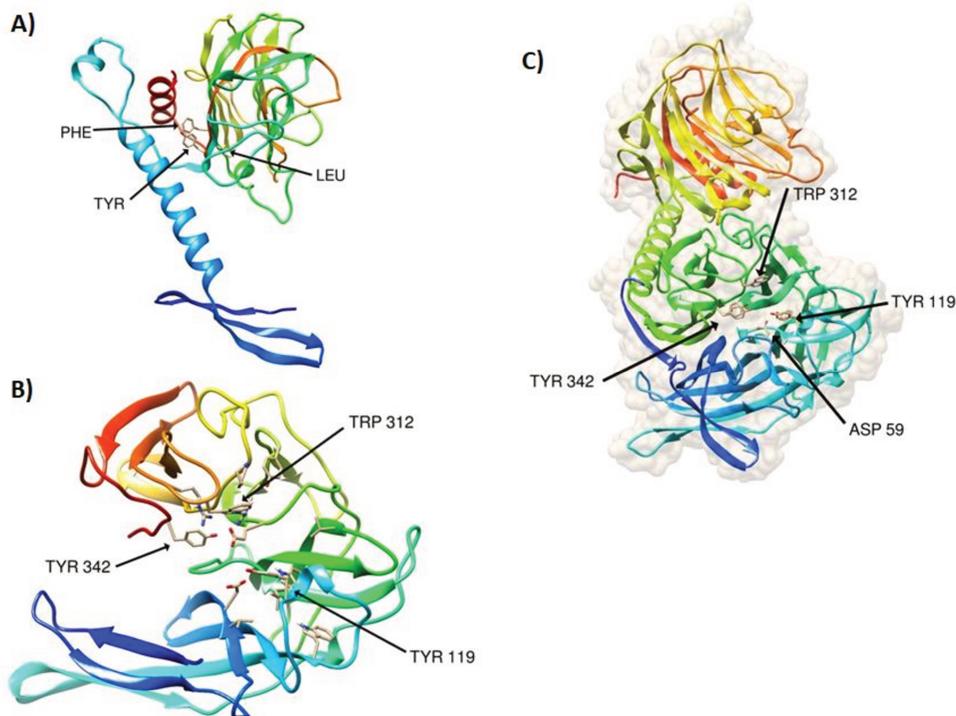


Figura 25: Modelos de las proteínas TSf, TSnt y TS completa: Predicción de estructuras a partir de Secuencias con los programas HHpred y swissmodel. **A)** Fracción TSf. **B)** Fracción TSnt. **C)** modelo de la

trans-sialidasa reportados por [135]. Se indica en azul la región amino terminal, en verde y amarillo regiones intermedias y en rojo la carboxilo terminal. Los aminoácidos clave están marcados con “stiks” en gris y los esenciales se indican como texto.

En el extremo carboxilo terminal de la proteína TS se encuentra el péptido FLY el cual ha demostrado ser clave para la adhesión e invasión celular del *T. cruzi* [180]. Se ha observado que dicho péptido es capaz de unir citokeratina 18 presente en la superficie de células epiteliales y que su presencia aumenta significativamente la parasitemia dentro de dichas células [180], [181]. En un modelo experimental de infección con ratones BALB/c se vio que la administración de este péptido FLY en conjunto con tripomastigotes de *T. cruzi* incrementó la parasitemia y el tropismo de dicho parásito por el corazón, así como también la tasa de mortalidad de los ratones, lo que lo convierte en un importante factor de virulencia [182]. La generación de anticuerpos específicos contra dicho péptido bloquearían la entrada del parásito a las células [183], por lo que la evaluación de la presencia de anticuerpos neutralizantes por parte de este fragmento TSf es una tarea pendiente a realizar. Si bien la respuesta celular generada por la inmunización con dicho fragmento no se ha evaluado en este trabajo de tesis, tal y como se explicó anteriormente, en un trabajo previo realizado se analizó esta respuesta celular por citometría de flujo [156]. Se observó que el fragmento TSf era capaz de generar una respuesta celular caracterizada por la presencia de células T CD8+ productoras de IFN- γ y además, que los anticuerpos específicos generados poseían actividad tripanolítica. Los porcentajes de supervivencia registrados en este trabajo eran mayores tanto para el grupo PBS como para el TSf, con valores del 40% y 80% respectivamente [156], indicando que la inoculación de 1.000 tripomastigotes Tulahuen por vía intraperitoneal se acercaba a una dosis letal 50%, hecho que no se ha repetido en los experimentos presentados en este trabajo de tesis.

Como la evaluación de la proteína CP3 no mostró mejorar al fragmento TSf y se comprobó el buen desempeño del fragmento TSNT, se continuó con la evaluación de los mismos de manera individual y de manera conjunta (TSNT+TSf) como formulaciones vacunales profilácticas contra la infección por *T. cruzi*. Se inmunizaron ratones BALB/c con

los distintos fragmentos formulados con ISPA y se evaluó la respuesta inmune generada mediante ELISA y DTH. Se observó que ambos fragmentos fueron capaces de producir elevados niveles de anticuerpos, tanto del perfil IgG1 como IgG2a, así como también elevados niveles de DTH. La inmunización de los ratones con la mezcla TSnt+TSf también mostró el desarrollo de una fuerte respuesta inmune de anticuerpos contra los dos fragmentos por separados (Figura 17) y una respuesta celular evaluada por DTH con valores mayores para el extremo TSnt (Figura 18).

De la misma manera que lo descrito anteriormente, los ratones inmunizados fueron desafiados con 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2 y se evaluaron los parámetros de protección de supervivencia y parasitemia. Además, se implementó la evaluación de un *score* clínico para evaluar el progreso y severidad de la enfermedad en los distintos grupos infectados. Para este *score* los ratones infectados fueron revisados en busca de signos relacionados con el progreso de la enfermedad como lo son: la piloerección, el cambio de color en el pelaje, la presencia de joroba, la dificultad para el movimiento, si permanecen con los ojos cerrados y la presencia de diarrea; y a cada uno de estos síntomas se les asignó un puntaje según lo descrito en la Tabla 4. De la evaluación de supervivencia se observó que la inmunización con el fragmento TSnt logró un porcentaje del 60%, en comparación con el fragmento TSf que solo registró una supervivencia del 20%. La mezcla de estos dos antígenos (TSnt+TSf) en cambio, alcanzó niveles de supervivencia del 80% en contraste con el grupo control PBS que presentó una mortalidad del 100% al día 21 post infección infectados (Figura 19A). Cabe aclarar, que este resultados de elevada supervivencia y protección obtenidos con el grupo TSnt+TSf se alcanzó con una dosis de 10 µg de cada antígeno. En un principio se ensayaron dosis de 5 µg de cada fragmento, para inocular una cantidad final de 10 µg en todos los grupos, pero se observó que está cantidad no era suficiente ya que el grupo inmunizado con la mezcla mostraba una mortalidad del 100% (información no mostrada). Con respecto a la evaluación de la parasitemia se observó que el grupo TSnt+TSf fue el único en registrar los niveles más bajos y constantes de parasitemia, a diferencia de los otros grupos inmunizados que mostraron un pico al día 21 post infección (Figura 19B). Esta elevada

supervivencia y baja parasitemia registrada por el grupo TSNT+TSf se correlaciona con el *score* clínico evaluado, en donde dicho grupo presentó los puntajes más bajos y constantes a lo largo de la infección (Figura 20A). Esto nos indica que los ratones inmunizados con la mezcla TSf+TSnt fueron capaces de controlar la infección con un mínimo desarrollo de manifestaciones clínicas en comparación con el resto de los grupos. Si bien el modelo experimental que empleamos basado en *T. cruzi* Tulahuen cl2 y ratones BALB/c presenta parámetros fáciles y rápidos de evaluar en el punto final del experimento, como lo es la mortalidad/supervivencia de los ratones, no ocurre lo mismo en todos los modelos experimentales, por lo que el uso de puntajes o *scores* adaptados a la sintomatología de los animales son ampliamente utilizados para evaluar la eficacia de un tratamiento o vacuna [165], [184], [185]. La utilización de un *score* en este trabajo nos permitió analizar de forma rápida la evolución de la enfermedad en cada grupo y la capacidad de recuperación de estos.

Estos resultados obtenidos en los parámetros de protección con la mezcla de los fragmentos de TS formulados con el adyuvante de cajas lipídicas ISPA (TSnt+TSf-ISP) reproducen lo obtenido en un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio con la proteína TS entera mutada inoculada con el adyuvante liposomal ISCOMATRIX™ (mTS-IMX) [152]. En dicho trabajo, la supervivencia del grupo mTS-IMX fue del 100% en comparación con la del grupo PBS que fue del 40%. Como puede observarse, la letalidad del grupo control PBS utilizando una dosis de 1000 tripomastigotes Tulahuen cl2 inoculados por vía intraperitoneal no era del 100% como lo obtenido en este trabajo de tesis, lo que indica que un nuevo ajuste en el modelo agudo de infección debería realizarse para poder volver a trabajar con una dosis letal 50 del parásito. Este cambio en la letalidad del inóculo se dio inevitablemente, a pesar de emplear los mismos protocolos y cepas de *T. cruzi* y ratón, ya que se trata de un modelo experimental *in vivo*. Este resultado promisorio conseguido con la mezcla de los dos fragmentos que emula lo obtenido con la TS entera en Bontempi et al., 2015, se podría deber a la complementación de los epitopes TSKd1, los aminoácidos clave para la función enzimática y el péptido FLY ya descritos, presentes en los fragmentos TSnt y TSf respectivamente. Como se ha

mencionado previamente, se ha estudiado que la distribución sistemática de la TS está asociada a diversas patologías observadas en estadios tempranos de infección como la depleción de timocitos [142], [143], trombopenia y eritropenia [144], [145], efectos que se han visto contrarrestados por la administración de anticuerpos neutralizantes de esta TS [186], [187]. La evaluación de la generación de anticuerpos neutralizantes de la TS por parte de la formulación TSNT+TSf-ISPA es una actividad pendiente a realizar.

Dados los resultados obtenidos con la mezcla TSNT+TSf, se decidió seguir trabajando con dicha mezcla a la cual se proyectó complementar con un nuevo antígeno que potenciara la protección lograda. Para eso se ensayó la capacidad protectora de la proteína ASP2 y se la formuló junto con los fragmentos de TS. Esta proteína ASP2, de aproximadamente 83 kDa, pertenece a la súper familia de las TS y se encuentra presente únicamente en el estadio amastigote [188], [189]. Se ha visto que humanos crónicamente infectados con *T. cruzi* presentan anticuerpos y células T CD8+ específicas para ASP2 (Low et al., 1998). Esto también se ha observado en modelos murinos de infección en donde la inmunización con esta proteína generó una respuesta inmune TCD4+ y TCD8+ específica, lo que lo convierte en un candidato promisorio para el desarrollo de vacunas [191]. Hasta el momento del diseño de este experimento, todas las vacunas ensayadas para ASP2 habían sido vacunas ADN basadas en Adenovirus, las cuales permitieron obtener una mayor sobrevivencia en los animales de experimentación vacunados frente a un desafío por *T. cruzi* [192], [193]. Dentro de estos ensayos se ha probado también una vacuna de Adenovirus recombinante compuesta por TS y ASP2 en dos modelos murinos diferentes, BALB/c y C57BL/6, cuyos resultados fueron muy promisorios con un aumento del 100% de sobrevivencia para el grupo que recibió la vacuna mixta en ambos modelos, en comparación con los grupos inmunizados con las proteínas de forma individual [194]. Este antecedente de vacuna basada en virus recombinante que emplea TS y ASP2 nos ha llevado a pensar que la inmunización con ambas proteínas, como vacuna de subunidades, podría presentar sinergia y potenciar así la formulación ensayada en nuestro laboratorio ya que, al emplear dos proteínas que se expresan en los estadios que se producen en el

huésped (TS en el estadio tripomastigote y ASP2 en amastigotes), se podría obtener una respuesta inmune completa hacia todo el ciclo del *T. cruzi* en su huésped.

De la misma manera a lo ya descrito con anterioridad, se inmunizaron ratones BALB/c con las distintas proteínas formuladas con el adyuvante ISPA con un grupo de ratones fue inmunizado con la mezcla de los tres antígenos en cuestión: TSnt+TSf+ASP2. Se observó que el antígeno ASP2 fue capaz de generar una fuerte respuesta de anticuerpos y de DTH, similar a lo obtenido con los fragmentos TSnt y TSf (Figura 21 y 22). Cuando se evaluó la respuesta inmune generada por el grupo TSnt+TSf+ASP2, frente a cada antígeno de forma individual, se observó que el mayor nivel de anticuerpos se produjeron contra la proteína ASP2 en comparación con lo obtenido con los fragmentos TSnt y TSf (Figura 21), lo que nos demuestra la inmunogenicidad predominante de ASP2 en dicha mezcla de antígenos. Un fenómeno similar se produjo en cuando se mezclaron las proteínas CP3 y TSf, en donde el mayor nivel de anticuerpos se produjo contra CP3. Sin embargo, este hecho en donde en una mezcla de antígenos uno muestra predominancia en la producción de anticuerpos sobre el otro, no se produjo en la mezcla de los fragmentos de TS, lo que nos indica que este redireccionamiento de la respuesta humoral podría tener consecuencias en la protección obtenida. En cuanto a la evaluación de la respuesta inmune celular mediante prueba de DTH se observó que el grupo TSnt+TSf+ASP2 produjo niveles de DTH similares frente a los antígenos ASP2 y TSnt, sin diferencias significativas en este caso (Figura 22).

Quince días post inmunización, los ratones fueron infectados con 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2. Se encontró que la incorporación de la proteína ASP2 a la mejor formulación vacunal obtenida en este trabajo (TSnt+TSf) no mostró potenciar su desempeño sino que tuvo un efecto contrario, en donde se revirtieron todos los parámetros evaluados: disminuyó la supervivencia (del 80% para el grupo TSnt+TSf al 20% para TSnt+TSf+ASP2) (Figura 23A), aumentó la parasitemia (Figura 23B) y mostró valores de *score* clínico más elevados (Figura 24A), comportándose de la misma manera que el grupo ASP2. Estos resultados obtenidos resultan desconcertantes ya que lo expuesto en la bibliografía demostraba que la unión de ASP2 y TS permitía obtener los mejores

resultados en los diferentes parámetros de protección analizados [194]. Pero cabe aclarar que lo evaluado en dicho trabajo se basaba en la inoculación del ADN de estas proteínas ASP2 y TS mediante una vacuna de adenovirus en comparación a lo realizado en este trabajo de tesis, en donde se emplearon las proteínas como vacunas de subunidades. En el trabajo previo de Bontempi et al., 2015 [152] en donde se empleó la formulación mTS-IMX se ha demostrado que dicha vacuna de subunidad logró una respuesta inmune celular comparable con la obtenida con las vacunas de ADN, pero en este trabajo de tesis, en donde restan realizar ensayos para terminar de caracterizar la respuesta inmune generada, no se puede descartar que la plataforma de vacunación haya influido en esto. Este comportamiento del grupo TSnt+TSf+ASP2 similar al grupo ASP2, en donde se observa una disminución en la capacidad protectora, podría deberse a que la presencia de la proteína ASP2 en la mezcla provocó un redireccionamiento de la respuesta inmune hacia dicha proteína, ya que se observó que si bien ASP2 es altamente inmunogénica no protege a los ratones inmunizados. Como ya se comentó, en la evaluación de la respuesta humoral de la mezcla de los tres antígenos ya se observó que la proteína ASP2 genera un mayor nivel de anticuerpos en comparación con las otras proteínas evaluadas (Figura 21), pero para confirmar si la respuesta inmune de este grupo fue modificada por la incorporación de ASP2 estudios de la respuesta celular por citometría de flujo deberían realizarse. Estos resultados podrían explicar la disminución de la capacidad protectora de la formulación debido al agregado de ASP2. Este ensayo que estaba previsto realizarse para complementar los resultados de esta tesis ha sido imposibilitado por el aislamiento preventivo y suspensión de actividades originado por la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2.

La generación de vacunas multivalentes en donde se emplea más de un antígeno es un completo desafío ya que es complejo determinar la combinación correcta de antígenos y la dosis a inocular. Existen trabajos de desarrollo de vacunas de subunidades en donde se han empleado más de una proteína recombinante siendo los resultados de los mismos muy dispares. En un ensayo de vacunas de subunidades contra *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), por ejemplo, se ha observado que el agregado de dos o más proteínas

no generaban un aumento de la protección comparado con el desempeño de las proteínas administradas individualmente, a pesar de generar una buena respuesta inmune [195]. Sin embargo, en otro trabajo se ha reportado que la utilización de dos proteínas de *T. gondii* presentan una protección parcial de la infección comparado cuando se agrega una tercer proteína, demostrando que la vacuna trivalente presenta mejores resultados que la bivalente [196], [197]. En este trabajo de tesis observamos que el agregado de proteínas, como lo fue CP3 y ASP2, a fragmentos de la TS no presentó sinergia e incluso mostró empeorar la capacidad protectora de la misma, a pesar de que cada formulación mostró altos niveles de anticuerpos específicos y de DTH. Sin embargo, la utilización de la mezcla de los fragmentos TSnt y TSf permitió una mejora muy significativa aumentando la supervivencia de las fracciones evaluadas de manera individual. A partir de estos resultados, nuestro desafío es hallar nuevos antígenos que logren complementar y dar sinergia a esta formulación constituida por TSnt+TSf-ISPA. Hasta el momento, en nuestro laboratorio se han ensayado un gran número de antígenos teniendo en cuenta el trabajo previo [160] y el realizado en el curso de esta tesis. De todos los candidatos evaluados, solo CP3, ensayado en esta tesis, ha permitido resultados de protección similares a los obtenidos con la fracción TSf, sin embargo dicho antígeno no ha potenciado el desempeño de TSf al ser utilizado en forma de mezcla. Cabe aclarar que muchos son los factores que se deben tener en cuenta para lograr una formulación que proteja contra un parásito como *T. cruzi* que presenta numerosas vías de invasión celular así como de evasión de la respuesta inmune. De hecho ninguna de las formulaciones reportadas en la bibliografía ha logrado una inmunización esterilizante que es lo que permitiría controlar las nuevas infecciones en zonas endémicas. Uno de los factores que es necesario abordar para dar continuidad a este trabajo es conocer la variabilidad que presentan las moléculas de TS que se expresan en *T. cruzi*. Esto es así ya que *T. cruzi* presenta, según el linaje, entre 2 y 150 genes codificantes de la enzima TS, los cuales presentan variaciones dentro de cada cepa y entre cepas, que en este último caso pueden alcanzar hasta un 17% de las bases [198]. No se conoce hasta el momento el impacto que tiene dicha variabilidad inter e intra cepa en el reconocimiento por parte del sistema

inmune pero su variabilidad podría ser un factor que disminuya la efectividad de este antígeno [199].

1.VI) Conclusiones parciales:

- ✓ De los fragmentos de TS evaluados, si bien ambos desarrollaron una fuerte respuesta de anticuerpos específicos y de DTH, el fragmento amino terminal de la proteína (TSNt) fue el que mostró una mayor capacidad protectora, aumentando la supervivencia (del 100%-60% para TSNt vs 40%-20% para TSf) y disminuyendo el desarrollo de manifestaciones clínicas evaluados mediante el *score*.
- ✓ La formulación de los fragmentos TSNt+TSf mejoró el desempeño que estos antígenos mostraron de forma individual, obteniéndose los mayores porcentajes de supervivencia en todos los ensayos (80%), la menor parasitemia en sangre y los valores más bajos de *score* clínico.
- ✓ La inmunización de ratones con la quimera CP3 mostró que es capaz de generar elevados niveles de anticuerpos específicos, pero con los valores de DTH más bajos. En relación a la capacidad protectora de esta proteína CP3 sola se observaron valores de supervivencia y parasitemia similares a los del fragmento TSf y vimos que su incorporación a la formulación vacunal no mejoró la protección.
- ✓ Con respecto a la evaluación de ASP2, se observó que este antígeno solo es capaz de generar una fuerte respuesta inmune de anticuerpos y de DTH, pero su capacidad protectora fue baja (un 20% de supervivencia). El agregado de esta proteína en la formulación TSNt+TSf no presentó complementación ni sinergia, sino que tuvo un efecto contrario, disminuyendo la supervivencia del 80% para TSNt+TSf al 20% para TSNt+TSf+ASP2 y mostrando los valores más altos de parasitemia y *score* clínico.

Capítulo 2:

Evaluación de la formulación de subunidades proteicas de Trans-sialidasa-ISPA para su *uso terapéutico* en un modelo murino de infección crónica

2.1) Introducción:

Los seres humanos controlan la infección aguda mediante una eficiente respuesta inmune contra el *T. cruzi* que, sin embargo, no permite su eliminación y es por esa razón que en la fase crónica se establecen mecanismos para controlarlo de por vida [200]. Esta convivencia lleva, luego de años o décadas, a afecciones cardíacas, gastrointestinales y/o del sistema nervioso. Como ya se describió en el capítulo introductorio, en la etapa crónica de la enfermedad se puede presentar la muerte, principalmente debido a la disfunción cardíaca. En este órgano la infección crónica genera infiltración inflamatoria, necrosis, remodelado fibrótico que afecta la conducción determinando que el individuo desarrolle arritmias, congestión e hipertrofia [201]. Frente a este problema se ha propuesto al tratamiento de pacientes crónicos con los parasiticidas Bz o Nx como alternativa para disminuir la sintomatología de la enfermedad crónica. Para confirmar la eficacia de dichos tratamientos en humanos, se ha desarrollado un estudio multicéntrico BENEFIT en donde se estudió la administración de Bz en pacientes sintomáticos con cardiopatías establecidas y se les realizó un seguimiento por un promedio de 5 años. Se observó que dicho tripanocida generaba una reducción en la carga parasitaria que no se pudo relacionar con una disminución de lesiones en corazón [82]. Estos resultados plantean la necesidad de investigar nuevas alternativas para el tratamiento del Chagas crónico. En ese sentido, el uso de vacunas terapéuticas que generen una inmunomodulación adecuada es un área que se está desarrollando para otras enfermedades crónicas [202], [203] y podría aplicarse para el Chagas crónico. El desarrollo de una inmunoprofilaxis para el control de la enfermedad, tendría ventajas comparativas debido al costo, seguridad y el control epidemiológico de la infección que la vacunación permite.

Algunos antecedentes bibliográficos ya han reportado la factibilidad de utilizar vacunas terapéuticas para disminuir los daños asociados a la evolución de la infección crónica por *T. cruzi*. En un trabajo precursor se describió la disminución de la carga

parasitaria y la reducción de la inflamación que se lograba en el corazón mediante la aplicación terapéutica de una vacuna de ADN en un modelo murino de infección [107]. Dicha disminución fue confirmada por el mismo grupo de trabajo en distintos modelos de infección [109], [110]. Otro trabajo que ha hecho aportes en el desarrollo de vacunas terapéuticas se basó en el desarrollo de una vacuna ADN- *prime/proteína- boost* en el que se inmunizaron ratones C57BL/6 infectados con la cepa Silvio de *T. cruzi* a los 45 días post infección [108]. A los 150 días post infección, se observó que este tratamiento ha permitido disminuir significativamente la carga de parásitos en sangre, músculo estriado y corazón, así como el infiltrado inflamatorio y fibrosis en dichos tejidos. También describieron un aumento de la capacidad antioxidante del tejido cardíaco en los animales infectados y vacunados en relación a los infectados no tratados [108]. En otro trabajo publicado se ha evaluado la utilidad de una vacuna basada en adenovirus para ser usada en forma terapéutica. Estos autores han utilizado un modelo de murino de infección C57BL/6-*T. cruzi* Colombiano y han realizado el tratamiento a los 120 días post infección, cuando los animales presentaban CCC. Observaron que los ratones tratados mostraban menos anomalías eléctricas que los no tratados y preservaban la inmunidad mediada por IFN- γ , reduciendo a su vez la frecuencia de células T CD8+ CD107a+ y el nivel de óxido nítrico en plasma, los cuales fueron indicativos de un control de la respuesta inflamatoria [173]. Recientemente, se ha publicado la utilización de una proteína recombinante Tc24, formulada con el adyuvante E6020, como vacuna terapéutica, en donde se infectaron ratones de la cepa ICR con *T. cruzi* de la cepa H1 y se aplicó la formulación vacunal a partir del día 70 post infección. Al finalizar el experimento, al día 180 post infección, los autores hallaron que el grupo tratado con la formulación vacunal disminuyó la carga parasitaria en sangre y redujo la fibrosis en el tejido cardíaco [204]. Todos estos trabajos citados presentan grandes evidencias que indican que el uso de una vacuna en la fase crónica de la enfermedad permite una re-programación de la respuesta inmune que resulta favorable para el huésped. En base a lo antes mencionado, en este trabajo se evaluó si es factible disminuir o revertir las lesiones observadas en esta etapa de la enfermedad

mediante el uso de la formulación vacunal que hemos desarrollado aplicada como tratamiento en la fase crónica.

Otro aspecto que nos interesó evaluar es un esquema de tratamiento que combine el antiparasitario Bz con nuestra formulación vacunal que permita mejorar la acción terapéutica en relación a ambos tratamientos individuales. Esta propuesta se basó en los efectos descritos para el tratamiento con Bz que podrían confluír en una complementación o sinergia entre la vacuna y la droga. En primer lugar, ha sido estudiado en detalle como el tratamiento con Bz en una infección crónica en ratones promueve el aumento de una población estable de células TCD8+ con características de memoria central, con reducida capacidad citotóxica, pero que se expanden rápidamente y permiten amplia protección frente a un desafío en comparación con aquellas células de los ratones no tratados [205], [206]. Dicho efecto también fue observado en humanos tratados [207], en donde se vio que el tratamiento con Bz en pacientes crónicos asintomáticos aumenta además las células TCD8+ efectoras, permitiendo mejorar la calidad de dicha respuesta [208]. Por lo tanto en este trabajo hemos hipotetizado que la potenciación de dicha respuesta inmune y el direccionamiento de la misma hacia un antígeno altamente protector, podría resultar en un tratamiento más efectivo. En segundo lugar, la estrategia de usar vacunas terapéuticas asociadas a drogas que permiten disminuir la carga antigénica, ya está siendo evaluada para el caso de otras infecciones crónicas, como por ejemplo, la hepatitis B [202], [209].

Por todo lo expuesto, resulta muy factible pensar que la administración de una formulación adecuada en el curso de la infección crónica por *T. cruzi* permitiría reprogramar la respuesta inmune de modo de atenuar las lesiones producidas en dicha etapa de la infección. Además, dado que el tratamiento con Bz genera un incremento de las células T de memoria, dicho efecto podría ser potenciado mediante la inmunoterapia, logrando así una sinergia entre un tratamiento inmunológico y uno quimioterapéutico.

2.II) Objetivos específicos:

- Evaluar si las subunidades de la proteína TS formuladas con el adyuvante ISPA administradas como vacuna terapéutica en ratones ya infectados permite prevenir las lesiones propias de la infección en el modelo de infección crónica BALB/c-Sylvio X10/4 así como también en el modelo BALB/C-Tulahuen cl2. Comparar la aplicación de esta vacuna terapéutica durante la fase crónica de la infección con la terapia habitual utilizada en humanos contra el *T. cruzi* mediante el uso de Bz y ensayar un tratamiento mixto de la formulación vacunal y la droga Bz para evaluar una posible sinergia entre ambos tratamientos.

2. III) Materiales y métodos:

2.III.1) Evaluación terapéutica de la formulación vacunal en un modelo de infección crónica BALB/c- Sylvio X10/4.

2.III.1) a) Animales:

Para todas las evaluaciones en modelo crónico se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad adquiridos en el Centro de Medicina Comparada de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Estos ratones fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* en condiciones controladas de luz y temperatura, siendo alojados en el bioterio de nuestro laboratorio ubicado en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe).

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo en conformidad con las normas éticas internacionales para animales de experimentación ("Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" del National Research Council de los EEUU, año 2011) y fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación (CAESI) de la Facultad de Bioquímica y Ciencias biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

2.III.1) b) Parásitos:

Para la infección de los ratones y el establecimiento del modelo crónico se trabajó con la cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*. Estos parásitos fueron cedidos por la Dra. Miriam Postan del Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén" y se obtuvieron mediante el cultivo de células VERO en medio RPMI 1640 (Gibco™) y suero equino (Internegocios SA) al 10%. Estas células se cultivaron a 37 °C en estufa de CO₂ y cuando se obtuvo la cantidad de parásitos deseada (1×10^6 *T. cruzi*/ratón), se procedió a lavar estos tripomastigotes Sylvio X10/4 del sobrenadante de los cultivos celulares. Para ello, se

centrifugaron estos sobrenadantes a 2.500 rpm por 10 min y se conservó el *pellet* de parásitos. Estos parásitos se resuspendieron en 2 ml de solución fisiológica estéril y se volvieron a centrifugar a 2500 rpm por 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de solución fisiológica estéril y se realizó un recuento en cámara de Neubauer.

2.III.1) c) Infección de los ratones:

Ratones BALB/c, separados en grupos de cinco, se infectaron al iniciar el experimento con 1×10^6 tripomastigotes Sylvio X10/4 por la vía intraperitoneal en un volumen final de 100 μ l [210]–[212] (Figura 26).

2.III.1) d) Tratamiento de los diferentes grupos experimentales:

Los ratones infectados fueron separados en distintos grupos (n=5 por grupo): grupo TSnt (tratado con la formulación vacunal), grupo Bz (tratado con el Benznidazol), Grupo TSnt+BZ (recibió el tratamiento mixto), grupo PBS (sin tratar) y grupo No Infectado (NI) (grupo sin infectar y sin tratar). Aquellos grupos que fueron tratados con la formulación vacunal, grupos TSnt y TSnt+Bz, recibieron 3 dosis por la vía subcutánea en donde se inoculó 10 μ g del antígeno TSnt más 3 μ l del adyuvante ISPA en un volumen final de 100 μ l. Estas inmunizaciones fueron realizadas los días 120, 130 y 140 post infección (Figura 26). El tratamiento con Bz (Abrax[®] Benznidazol 100 mg, ELEA) de los grupos correspondientes, grupos Bz y TSnt+Bz, comenzó el día 140 post infección y consistió en un tratamiento diario durante 30 días, en los cuales se administraron 20 μ l de forma oral de una solución de 100 mg Bz/ kg de ratón (Figura 26). Esta solución de Bz se preparó triturando pastillas de Bz (Abarax[®] Benznidazol 100 mg, ELEA) con un mortero, luego se pesó la cantidad necesaria de la droga para los 30 días de tratamiento y se diluyó en agua. Esta solución acuosa de Bz se distribuyó en tubos eppendorfs y se almacenó a -20°C hasta su uso.

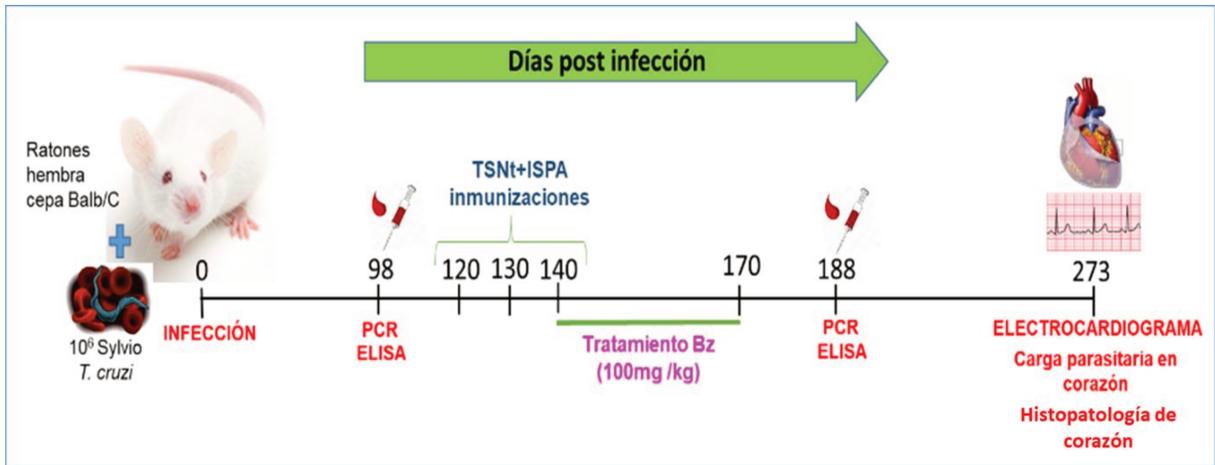


Figura 26: Esquema de trabajo empleado para la evaluación terapéutica de la formulación TSnt+ISPA y Bz en un modelo de infección BALB/c- Sylvio X10/4.

2.III.1) e) Evaluación de la infección:

Debido a que el *T. cruzi* Sylvio X10/4 no genera parasitemia visible en sangre, la infección de los ratones se evaluó por las técnicas de PCR y ELISA, a fin de determinar la presencia de ADN de *T. cruzi* y la producción de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*, respectivamente. Para ello a los ratones infectados se les extrajo por punción retro-orbital, previamente anestesiados con Isoflurano (Rhodia), al día 98 (antes de comenzar con los tratamientos), 188 (después de los tratamientos) y 273 post infección (punto final del experimento) (Figura 26).

2.III.1) e.1) PCR convencional para la detección de *T. cruzi*:

Para la detección de ADN de *T. cruzi* por PCR las muestras de sangre se recolectaron con capilares sin heparina y se mezcló inmediatamente 50 µl de cada muestra con 100 µl de una solución de Guanidina-EDTA (GE) (ver ANEXO) y se almacenaron a 4°C hasta el momento de purificarlas. La purificación de ADN se realizó por una extracción con fenol-cloroformo-isoamílico seguida por una precipitación etanólica. Las muestras de sangre en GE se mezclaron con 150 µl de fenol-cloroformo-

isoamílico (50/48/2) y se centrifugaron durante 30 min a 13000 rpm. Se separó la fase acuosa de cada tubo y se le agregó 150 µl de una solución de cloroformo- isoamílico (96/4). Se centrifugaron las muestras por 5 min a 13.000 rpm y se separó nuevamente la fase acuosa, a la que se les agregó 15 µl de una solución de acetato de sodio 5M (pH= 5) y 300 µl de etanol frío (4°C) para la precipitación del ADN. Las muestras se incubaron a -20°C durante 2 h. Transcurrido este tiempo se centrifugaron los tubos durante 15 min a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregó a cada muestra 150 µl de etanol al 70% frío (4°C). Se centrifugaron las muestras nuevamente por 15 min a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se dejaron los tubos abiertos a temperatura ambiente durante 15 min para la evaporación del etanol. Por último, los precipitados de ADN se resuspendieron en 100 µl de agua miliQ. Una vez purificadas las muestras se procedió a cuantificarlas en NanoDrop™ Lite (ThermoFisher Scientific™) y evaluar así la pureza de estas muestras mediante la relación de absorbancias 260/280 que calcula este equipo. En la evaluación de pureza de ADN un ratio de 1,8 indica que la purificación del ADN fue buena, valores menores, en cambio, indican la presencia de contaminantes como proteínas, fenol u otros compuestos.

Una vez obtenidas las muestras de ADN se realizaron las reacciones de PCR trabajando con los *primers* S121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') y S122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') que amplifican un fragmento de 330 pb del kinetoplasto del *T. cruzi*, tal y como se describe en [15]. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen de reacción de 50 µL el cual contenía: 250 µM de dNTPs (TransGen Biotech Co), 0,25 µM de cada primer (Invitrogen, USA), 3 mM de MgCl₂, 1,25 U de GoTaq® DNA polimerasa (Promega) y ADN molde. La amplificación de las muestras se realizó en el termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™) con un programa de desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido por 32 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 59°C y 1 min a 72°C, y con una extensión final de 3 min a 72°C [15]. En todas las reacciones de PCR se realizaron controles negativos, sin ADN molde, y controles positivos, con ADN genómico de *T. cruzi* de la cepa CL-Brenner. Los resultados finales de las distintas PCR se

visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de GelStain (TransGen Biotech Co).

2.III.1) e.2) ELISA para la verificación de la infección de los ratones:

Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* por ELISA se recolectaron las muestras de sangre a los distintos días post infección empleando capilares heparinizados y se centrifugaron a 2.000 rpm por 10 min. Se separó el plasma de cada muestra y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La técnica de ELISA se desarrolló tal como se describe en el capítulo anterior “2.II.3) a) *Evaluación de anticuerpos específicos mediante técnica de ELISA*”, en donde se evaluaron también los isotipos IgG1 e IgG2a (Abcam). En este caso las placas fueron sensibilizadas con homogenato de parásito Sylvio X10/4 diluido 1/100 y los resultados de los distintos ELISAs se expresaron en un índice *DO/cut off* ya que las determinaciones no se realizaron en simultáneo (*DO/cut off*= Densidad óptica a 450 nm/ (promedio de las DO de los No infectados + 2 desvíos estándar de las DO de los No infectados). También se realizó una evaluación de anticuerpos anti-TSnt en donde se inmovilizó 0,5 µg del fragmento TSnt por pocillo y se procedió con la técnica de ELISA según lo descrito.

2.III.1) f) Evaluación de los diferentes tratamientos:

A los 273 días post infección los ratones se anestesiaron con una solución de Ketamina (50%) (Holliday- Scott S.A.)- Xilacina (10%) (PharmaVet) y se les realizó un electrocardiograma (ECG) a cada uno de ellos. Luego se recolectaron muestras de sangre por punción cardíaca y se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Se les extrajo el corazón y se dividió a la mitad, en donde una parte se almacenó a -80°C para medir carga parasitaria y la otra mitad se colocó en formalina al 4% para posterior análisis histopatológico. Una alícuota de la sangre extraída, 50 µl, se colocó en 100 µl de la solución GE (Ver Anexo) y se utilizó para la medición de parásitos en sangre por PCR

convencional. La otra parte de sangre extraída se centrifugó a 2000 rpm por 10 min, se separó el plasma y se utilizó para medición de anticuerpos por ELISA.

2.III.1) f.1) Electrocardiogramas (ECG):

El registro de los ECG se llevó a cabo empleando un electrocardiograma adaptado para ratón (Cardiocom), para lo cual se anestesiaron los ratones con una solución de Ketamina (50%) (Holliday- Scott S.A.)- Xilacina (10%) (PharmaVet) (Figura 27). Las mediciones realizadas fueron analizadas en el software específico CC7DerS-Vet, suministrado por el fabricante del equipo, en donde se evaluó la frecuencia cardíaca (Fc) de cada ratón y parámetros de onda como: onda P, intervalo PR, segmento PR, complejo QRS e intervalo QT, tal y como se muestra en la Figura 28. Como el valor del intervalo QT varía con la FC registrada (disminuye a FC altas y aumenta a FC bajas) se corrigió aplicando la fórmula descrita en Mitchell et al., 1998 [213] y se obtuvo así el QTc (intervalo QT corregido). También se analizó si los ECG de los diferentes ratones mostraban alteraciones en sus formas. En tal caso se los consideró dentro del grupo de arritmias.

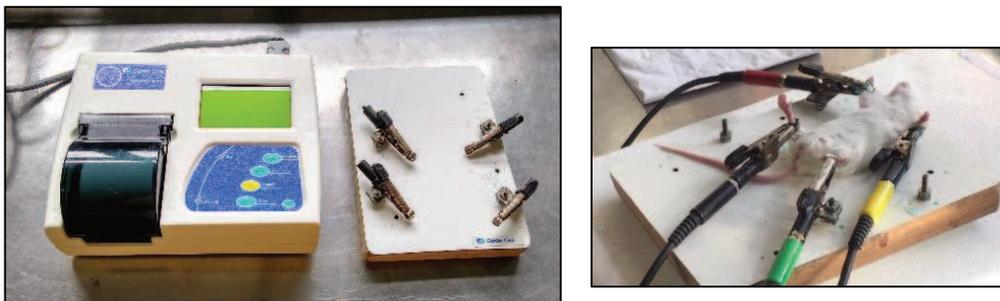


Figura 27: equipo de electrocardiograma adaptado para ratón (Cardiocom).



Figura 28: Imagen extraída del software para el análisis de los ECG en donde se muestran los diferentes parámetros de ondas evaluados: onda P, segmento PR, intervalo PR, complejo QRS e intervalo QT.

2.III.1) f.2) Evaluación de carga parasitaria en corazón:

La mitad de los corazones almacenados a -80°C se utilizó para medir carga parasitaria mediante PCR en tiempo real (qPCR). Estos corazones se mezclaron con 5 volúmenes de buffer de lisis (ver Anexo) y se incubaron a 55°C durante 2 hs. Una vez que se disgregaron estos corazones se procedió a purificar el ADN por extracción con fenol-cloroformo- isoamílico seguido por una precipitación etanólica, tal y como se describió en la sección “2.II.1) d.1) PCR convencional para la detección de *T. cruzi*”. Una vez purificadas las muestras se procedió a cuantificarlas en NanoDrop™ Lite (ThermoFisher Scientific™) y evaluar la pureza de las mismas mediante la relación de absorbancias a 260/280.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo empleando los *primers* específicos para *T. cruzi*: TCZ-F (5'-GCTCTTGCCACAAAGGGTGC-3') y TCZ-R (5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'), que reconocen una secuencia satélite de 182 pb (pares de bases) presente en el genoma del parásito, y los *primers* específicos para ratón: TNF-

5242 (5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3') y TNF-5411 (5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3'), que reconocen la secuencia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) murino [214]. Para la cuantificación de las muestras se construyeron curvas patrones de ADN de *T. cruzi* y de ADN de ratón. Para la curva de *T. cruzi* se partió de tejido cardíaco de ratones no infectados al que se le agregó 1×10^7 tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa CL-Brenner. Este tejido con parásitos agregado fue tratado y purificado como ya se ha descrito anteriormente. Una vez resuspendido el ADN fue cuantificado en NanoDrop™ Lite (ThermoFisher Scientific™) y se construyó así una curva patrón con los puntos 100- 10- 1- 0,1-0,01 *T. cruzi*, diluidos con una solución de 50 ng de ADN de tejido normal de corazón. También se generó una curva patrón de ADN de ratón utilizando corazones de ratones no infectados, los cuales se procesaron y purificaron, y con esto se construyó una curva que abarcaba los siguientes puntos: 100- 50- 25- 12,5 ng ADN total de ratón. Con las curvas patrones construidas se determinó, para cada muestra, la cantidad de ADN de *T. cruzi* y de ratón de manera separada. Cada tubo de qPCR contenía 2 μ l de 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), 0,5 μ M de *primers* específicos para *T. cruzi* o ratón según corresponda, 2 μ l de ADN molde y agua miliQ a un volumen final de 10 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOne™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) trabajando con un programa de tres fases: desnaturalización, amplificación y curva de *melting*. En la desnaturalización inicial las muestras se calentaron a 95°C durante 15 min. Durante la fase de amplificación se llevaron a cabo 50 ciclos cada uno con cuatro pasos: 95°C durante 10 seg, seguido de 55°C por 20 seg, luego un paso a 72°C durante 20 seg y por último a 81°C por 10 seg, en donde se adquirió la señal de fluorescencia. La fase final de curva de *melting* comenzó a 95°C por 10 seg, luego pasó a 60°C por 30 seg y finalmente las muestras volvieron a calentarse a 95°C con una rampa de aumento de temperatura de 1,2°C [214]. La fluorescencia en esta fase se midió durante este paso final de aumento de temperatura. Toda la información fue adquirida y analizada con el StepOne™ Software v2.3. La cantidad de *T. cruzi* presente en cada muestra se expresó en relación a 50 ng de ADN de tejido cardíaco de ratón [214].

2.III.1) f.3) Análisis histológico de corazón:

Aquellas porciones de corazón guardadas en formalina al 4% se utilizaron para análisis histopatológico. Los cortes histológicos fueron realizados en la Cátedra de Morfología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario, en concepto de servicio a tercero y las muestras fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E), para visualizar infiltrados inflamatorios, y con rojo de picrosirius, para observar fibrosis del tejido. El análisis de estos cortes histológicos lo realizó la Dra. Mónica Pérez Gianceselli de la Cátedra de Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste Corrientes, como parte del equipo colaborador de este trabajo. A cada muestra según el nivel de daño observado y comparado con el grupo sin infectar se le asignó un puntaje para cada tinción y el resultado final se expresó como “*Score* de daño histológico”, el cual surgió del producto del *score* obtenido con la tinción H&E con el obtenido por la tinción de Rojo de Picrosirius.

2.III.2) Evaluación terapéutica de la formulación vacunal en un modelo de infección crónica BALB/c- Tulahuen cl2.

2.III.2) a) Animales:

Tal y como se explicó anteriormente, se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/cmedc de 6 a 8 semanas de edad adquiridos en el Centro de Medicina Comparada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa fe). Estos ratones fueron mantenidos en el bioterio de nuestro laboratorio ubicado en Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Santa fe), en condiciones controladas de luz y temperatura, con agua y alimento *ad libitum*.

2.III.2) b) Parásitos:

Para este modelo de infección crónica se trabajó con tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen cl2 mantenidos por pasajes sucesivos en ratones de la cepa Cb1. Estos pasajes fueron realizados en el Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER) quienes gentilmente cedieron estos parásitos para cada ensayo. La extracción de estos parásitos Tulahuen cl2 se realizó de la misma forma que lo descrito en el apartado "1.II.4) a) *Parásitos*" en las evaluaciones del modelo agudo de infección.

2.III.2) c) Infección de los ratones:

Ratones BALB/c, separados en grupos de a cinco, fueron infectados con 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2 por vía intradérmica, en un volumen final de 10 µl. Para ello los ratones fueron anestesiados con una solución Ketamina (50%) (Holliday- Scott S.A.)- Xilacina (10%) (PharmaVet) y se inocularon los parásitos en la almohadilla plantar izquierda de cada ratón. Se utilizó esta vía intradérmica de infección para aumentar la supervivencia de los ratones infectados y poder establecer un modelo de infección

crónica. En un ensayos previos se ha visto que los ratones infectados por esta vía sobreviven en mayor proporción que cuando son infectados por la vía intraperitoneal (información no mostrada).

2.III.2) d) Evaluación de la infección:

La infección de los ratones se evaluó a través de un recuento de parásitos en sangre por microscopía directa en la etapa aguda de infección, ya que estos tripomastigotes Tulahuen cl2 generan un alto nivel de parásitos en sangre, a diferencia de lo que ocurrió en el modelo crónico de infección que empleaba *T. cruzi* Sylvio X10/4. Para esta evaluación de parasitemia se tomó 5 µl de sangre de la punta de la cola de cada ratón y se contó el número de parásitos por microscopía directa, contando un total de 25 campos ópticos. Esto se realizó a los días 14, 21 y 28 post infección tal y como se describió en la sección “2.II.4) c) *Evaluación de la parasitemia, peso, score clínico y supervivencia*” (Figura 29). Además, como este parasito genera elevada mortalidad en la fase aguda de infección se evaluó la supervivencia de estos ratones infectados.

2.III.2) e) Tratamiento de los diferentes grupos experimentales:

Los ratones que sobrevivieron a la fase aguda de infección fueron redistribuidos para comenzar con los tratamientos en los siguientes grupos de 5 ratones: grupo TSNT (tratado con la formulación vacunal), grupo Bz (tratado con Benznidazol), Grupo TSNT+Bz (que recibió el tratamiento mixto) y grupo PBS (sin tratar). También se contó con un grupo control de la infección: grupo NI (no infectado y no tratado). Al igual que lo descrito anteriormente los grupos que recibieron la vacuna terapéutica, grupos TSNT y TSNT+Bz, fueron tratados con 3 dosis subcutáneas aplicadas los días 100, 110 y 120 post infección (Figura 29). En cada inoculación se administraron 10 µg de la proteína TSNT más 3 µl del adyuvante ISPA, tal y como se venía trabajando. El tratamiento con Bz (Abrax® Benznidazol 100 mg, ELEA) de los grupos correspondientes, grupos BZ y TSNT+BZ, se

realizó desde el día 135 post infección hasta el día 165 (Figura 29), en donde se administró diariamente 20 µl en forma oral de una solución de 100 mg Bz/ kg de ratón. El preparado de estas dosis se realizó de la misma forma que lo explicado en “2.II.1) d) Tratamiento de los diferentes grupos experimentales”.

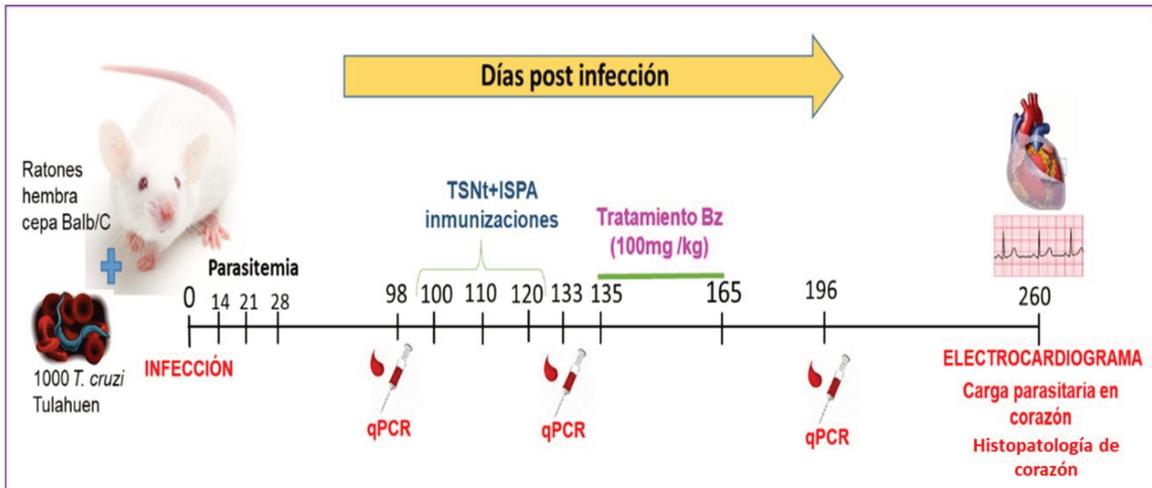


Figura 29: Esquema de trabajo empleado para la evaluación terapéutica de la formulación TSnt+ISPA y del Bz en un modelo de infección BALB/c-Tulahuen cl2.

2.III.2) f) Evaluación de los diferentes tratamientos:

Para la evaluación de los diferentes tratamientos empleados se realizó una medición de carga parasitaria en sangre en la fase crónica de infección mediante qPCR, ECG de los distintos grupos experimentales y una evaluación de carga parasitaria en corazón por qPCR. Para la evaluación de carga parasitaria en sangre los ratones fueron sangrados al día 98 post infección (antes de comenzar con los tratamientos), al día 133 post infección (después de las inmunizaciones con la formulación vacunal y antes del tratamiento con Bz), al día 196 post infección (finalizado el tratamiento con Bz) y al día 260 post infección (punto final) (Figura 28). Se finalizó con este experimento al día 260 post infección en donde los ratones fueron anestesiados con una solución de Ketamina (50%) (Holliday- Scott S.A.)- Xilacina (10%) (PharmaVet) y se les realizó a cada uno de ellos un ECG (Cardiocom). Luego fueron sangrados por punción cardíaca y sacrificados por

dislocación cervical. Se le extrajo el corazón a cada uno de ellos y se almacenó a -80°C para medir carga parasitaria por qPCR (Figura 29).

2.III.2) f.1) Medición de carga parasitaria en sangre:

Para esta medición de carga parasitaria se desarrolló una técnica de qPCR para poder cuantificar la presencia de *T. cruzi* en sangre a distintos días post infección. Para la recolección de las muestras de sangre los ratones fueron previamente anestesiados con Isoflurano (Rhodia). Luego se les extrajo sangre por punción retro-orbital que se mezcló inmediatamente con solución GE a razón de 50 µl esta sangre entera con 100 µl de solución GE (ver ANEXO). Las muestras preparadas se almacenaron a 4°C hasta su uso. Se recolectaron muestras de sangre al día 98, 133, 196 y 260 post infección, como ya se mencionó anteriormente.

Las reacciones de qPCR para evaluar parasitemia en sangre se llevaron a cabo partiendo de lo descrito en Duffy et al., 2009 [215], en donde las muestras se contaminan con un estándar interno para la cuantificación. En este caso se utilizó como estándar interno al plásmido pGEM®-T (Promega) y, antes iniciar con el proceso de purificación, se contaminaron las muestras de sangre en GE con 1 pg de este. La purificación de ADN se llevó a cabo de la misma manera descrita anteriormente en el apartado “2.III.1) d.1) PCR convencional para la detección de *T. cruzi*”. Esta cantidad de estándar interno que se agregó a cada muestra se ensayó previamente, en donde se obtuvo que la concentración de 1 pg arrojaba un número de ciclo o Ct igual a 20, lo que se considera un Ct medio para las curvas de qPCR. Se trabajó con los primers T7 (5'-GGGTAATACGACTCACTATAGGG- 3') y SP6 (5'-GGGATTTAGGTGACACTATAGAAT-3') específicos para el vector pGEM®-T (Promega), que amplifican un producto de 180 pb aproximadamente, y con los primers TCZ-F y TCZ-R específicos para *T. cruzi*, ya descritos anteriormente en la sección “2.III.1) f.2) Medición de carga parasitaria en corazón”. Se construyeron curvas patrones tanto para el estándar interno como para *T. cruzi* y por cada muestra se determinó la cantidad de ADN de cada uno de ellos de manera separada. La

curva patrón de *T. cruzi* se construyó partiendo de una muestra de sangre de ratón no infectado (150 µl sangre-GE) a la cual se le agregó 1×10^7 tripomastigotes de *T. cruzi* y se purificó el ADN. Con esta muestra se construyó una curva que abarcó los puntos 10- 1- 0,1- 0,01-0,001 *T. cruzi* en donde las diluciones se realizaron con una solución de ADN proveniente de sangre de ratón sin infectar (solución diluyente). Para la construcción de la curva patrón del estándar interno pGEM®-T (Promega) se partió de una solución madre de 1.000 pg de ADN, la cual se diluyó en los puntos 100- 10- 1- 0,1- 0,01 pg de ADN del estándar interno empleando la solución diluyente. Cada reacción de qPCR contenía 2 µl de 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), 0,5 µM de *primers* específicos para *T. cruzi* o del estándar interno según corresponda, 2 µl de ADN molde y agua miliQ a un volumen final de 10 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOne™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) trabajando con el mismo programa de ciclado detallado en “2.III.1) f.2) Medición de carga parasitaria en corazón”, en donde se modificó la temperatura de *annealing* la cual fue de 50°C en vez de 55°C. Toda la información fue adquirida y analizada trabajando con el software StepOne™ v2.3. Los resultados finales se expresaron como el número de parásitos por ml de sangre siguiendo la siguiente fórmula [215]:

$$Ntc/ml = \frac{Ntc}{\frac{w}{UA}} / V \left(\frac{ml}{w} \right)$$

En donde:

- **Ntc/ml:** número *T. cruzi* detectado por ml.
- **Ntc/w:** Número de *T. cruzi* detectado por reacción (*well*).
- **UA:** Unidades arbitrarias del estándar interno detectado por reacción (1 pg de pGEM®-T = 1 UA).
- **V:** volumen de muestra empleada en la reacción (ml/*well*).

2.III.2) f.2) Electrocardiogramas (ECG):

El registro de los ECG se realizó al día 260 post infección y se procedió de la misma manera descrita en la sección anterior “2.III.1) f.1) *Electrocardiogramas (ECG)*”. Se analizó la FC de cada ratón y los parámetros de onda como: onda P, intervalo PR, segmento PR, complejo QRS e intervalo QT, tal y como se muestra en Figura 27. El intervalo QT se corrigió en base a la FC [213] y se analizó si los diferentes ECG mostraban alteraciones morfológicas, las que se agruparon dentro de arritmias.

2.III.2) f.3) Medición de carga parasitaria en corazón:

La carga de *T. cruzi* en corazón se evaluó trabajando de la misma forma que se ha detallado en la sección anterior “2.III.1) f.2) *Medición de carga parasitaria en corazón*” empleando los mismos *primers*, curvas patrones y programa de ciclado para las reacciones de qPCR. Los corazones almacenados a -80°C se trataron con buffer de lisis, se purificó su ADN y se realizó una qPCR según lo ya indicado.

2.III.3) Análisis estadístico:

Para el análisis de todos los resultados obtenidos se trabajó con el software estadístico Prisma 5.0 (GraphPad). Se aplicó el *test* estadístico ANOVA One-way o Kruskal-Wallis para el análisis de múltiples grupos. Como post *test* para datos paramétricos se aplicó el test de Tukey y como post test para datos no paramétricos se utilizó el test de Dunn. Para la comparación de dos grupos se utilizó el *test* de Man Whitney o t *test* según corresponda. Todos aquellos valores del p estadístico menores a 0,05 se consideraron significativos (*p< 0,05).

2.IV) Resultados:

2.IV.1) Evaluación terapéutica de la formulación vacunal en un modelo de infección crónica BALB/c- Sylvio X10/4

Para evaluar la acción terapéutica de nuestra formulación vacunal se estableció, en una primera vuelta experimental, un modelo de infección crónica empleando parásitos de la cepa Sylvio X10/4. Esta cepa, de DTU I, ha sido muy utilizada en modelos murino de infección crónica ya que no ocasiona una fuerte fase aguda de infección por lo que es considerada de baja virulencia, pero sí induce lesiones cardíacas crónicas que reproducen varias características patológicas de la enfermedad de Chagas en humanos [216], [217].

Se infectaron ratones de la cepa BALB/c al iniciar el experimento con 1×10^6 tripomastigotes Sylvio X10/4 inoculados por vía intraperitoneal [210]–[212] y como esta cepa de parásitos no genera una parasitemia visible se evaluó la infección mediante PCR convencional, para visualizar la presencia de ADN de *T. cruzi*, y ELISA, para evaluar la presencia de anticuerpos específicos (Figura 26). A los 120 días post infección se comenzó con aplicación de la formulación vacunal TSNT-ISPA, la cual se administró de manera subcutánea a los días 120, 130 y 140 post infección (Figura 26). Al día 140 post infección se inició el tratamiento diario de Bz, el cual se suministró por vía oral durante 30 días consecutivos (del día 140 al día 170 post infección), en una dosis de 100 mg/Kg de ratón (Figura 26). Esta vuelta experimental concluyó al día 273 post infección, momento en el cual los ratones fueron anestesiados y sometidos a ECG. Luego, estos animales de experimentación fueron sangrados por punción cardíaca y sacrificados por dislocación cervical. También se les extrajo el corazón para evaluar carga parasitaria por qPCR y para realizar un análisis histológico. De cada ECG registrado se analizó la FC y parámetros de onda como onda P, intervalo PR, segmento PR, complejo QRS e intervalo QTc. Se evaluó además la presencia de alteraciones morfológicas en estos ECG las cuales se agruparon dentro de arritmias.

Para la evaluación de la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante ELISA se inmovilizaron las placas con homogenato de *T. cruzi*, se trabajó con muestras de plasma de todos los grupos a los distintos días post infección y se evaluaron los isotipos IgG1 e IgG2a para conocer la naturaleza de la respuesta inmune generada por la infección. Como puede observarse, los ratones infectados generaron una cantidad significativa de anticuerpos específicos anti- *T. cruzi*, especialmente del isotipo IgG2a, cuyos niveles aumentaron a lo largo del tiempo (Figura 30). Los niveles de IgG1, por otra parte, se mantuvieron bajos a lo largo de la infección (Figura 30). Antes de comenzar con los tratamientos (día 98 post infección) todos los grupos mostraron el mismo nivel de anticuerpos IgG2a, pero se observó que, una vez concluidos estos (día 188 post infección), el grupo que recibió la formulación vacunal (grupo TSnt) fue el que mostró el mayor nivel de anticuerpos específicos (ANOVA One-way post test de Tukey, ** $p < 0,005$: TSnt vs Bz y TSnt vs PBS; *** $p < 0,0005$: TSnt vs TSnt+Bz al día 188 post infección) (Figura 31). El grupo que recibió el tratamiento con Bz (grupo Bz) también presentó un aumento de anticuerpos post tratamiento (día 188 post infección) aunque con menor intensidad que el grupo TSnt (Figura 30). No ocurrió lo mismo con el grupo que recibió el tratamiento mixto, TSnt+BZ, el cual se comportó de manera similar al grupo sin tratar PBS en donde el nivel de anticuerpos IgG2a aumenta poco luego de la infección (Figura 30). Al finalizar el experimento, el día 273 post infección, se observó que los niveles de anticuerpos IgG2a se mantuvieron e incluso aumentaron en algunos grupos (Figura 30). Se evaluó también la generación de anticuerpos anti-TSnt al finalizar con los diferentes tratamientos el día 188 post infección, en el cual se encontró que los grupos TSnt y TSnt+Bz, que habían recibido la formulación vacunal, presentaban elevados niveles de anticuerpos contra dicha proteína, sin diferencias entre grupos ($*p < 0,05$, ANOVA One-way, post test de Tukey) (Figura 31). Estos dos grupos fueron capaces de desarrollar una respuesta de anticuerpos balanceada tanto del isotipo IgG2a como IgG1 contra el antígeno recombinante de la TS, pero no contra homogenato de *T. cruzi*, para el cual el isotipo predominante fue IgG2a (Figura 31).

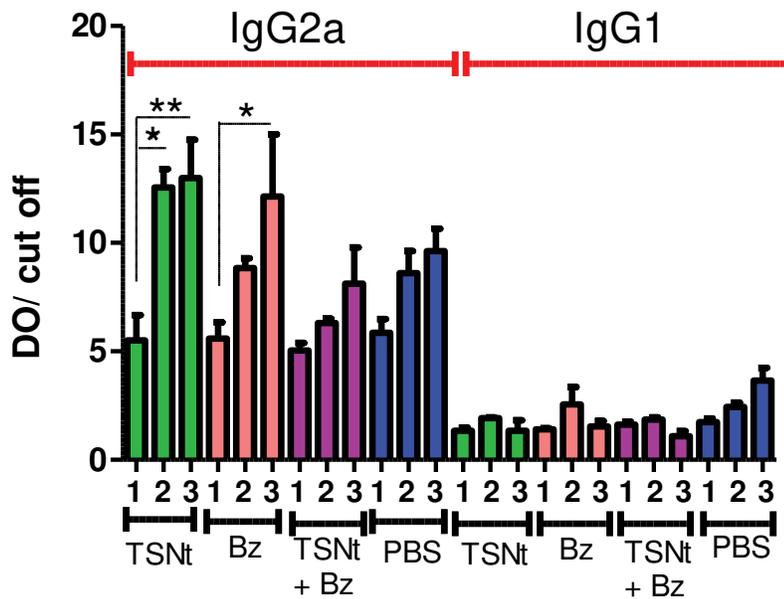


Figura 30: Evaluación de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante técnica de ELISA en un modelo murino de infección crónica BALB/c- Sylvio X10/4. **1:** Día 98 post infección (antes de aplicar ambos tratamientos). **2:** Día 188 post infección (después de aplicar ambos tratamientos). **3:** Día 273 post infección (punto final del experimento). **Índice DO/cut off:** DO leída a 450 nm/ (promedio de las DO de los No infectados + 2x desvíos estándar de las DO de los No infectados) (*p< 0,05, **p< 0,005 ANOVA One-way, post test de Tukey). Estos resultados provienen de un único experimento.

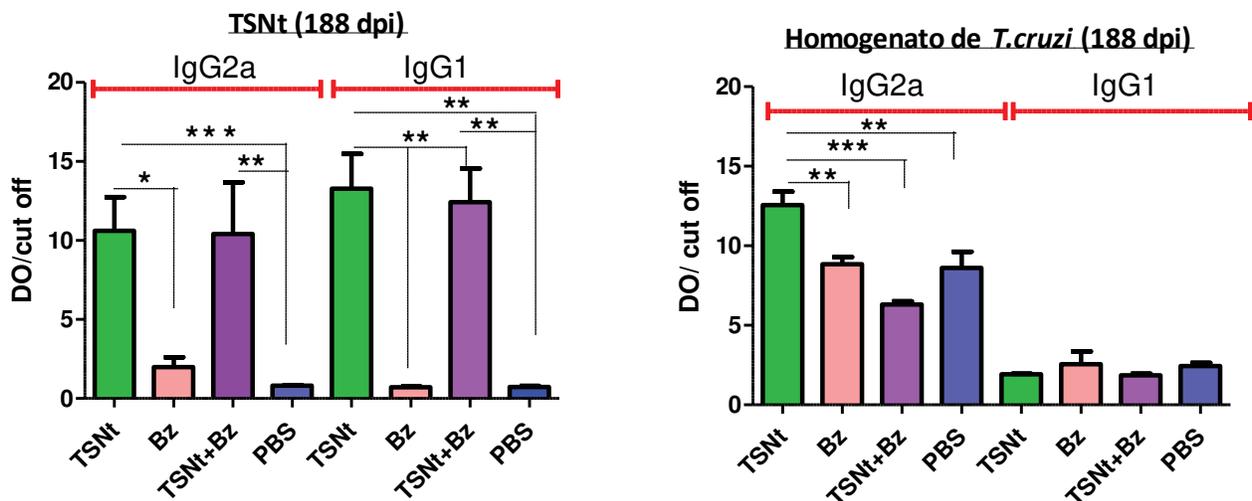


Figura 31: Evaluación de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante técnica de ELISA al día 188 post infección en un modelo de infección crónica BALB/c-Sylvio X10/4. Los resultados que se muestran son los índices de DO obtenidos por los grupos tratados enfrentados al antígeno TSNT y a homogenato de *T. cruzi*. **TSNT:** placa inmobilizada con el fragmento TSNT. **Homogenato de *T. cruzi*:** placa inmobilizada con homogenato de *T.*

cruzi. Índice DO/cut off: Densidad óptica leída a 450 nm/ (promedio de las DO de los No infectados/ 2x desvíos estándar de las DO de los No infectados) (*p< 0,05, **p< 0,005, ***p< 0,0005, ANOVA One-way, post test de Tukey). Estos resultados provienen de un único experimento.

Con respecto a la evaluación de la infección mediante PCR convencional, se purificaron las muestras de sangre tomadas a los distintos días post infección, se realizó una PCR según lo ya detallado y se visualizaron los resultados en electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. De estos resultados de PCR se obtuvo que todos los grupos mostraron un 100% de muestras positivas al día 98 post infección (antes de comenzar con los tratamientos) y que solo los grupos que recibieron la formulación vacunal lograron disminuir este porcentaje de positividad al día 188 post infección (punto posterior a los tratamientos), en donde el grupo TSNT mostró un porcentaje de positividad del 80% y el grupo TSNT+BZ del 66,7% (Tabla 6). El grupo Bz, en cambio, mostró un porcentaje del 100% de muestras positivas a este día post infección, lo mismo que ocurrió con el grupo sin tratar PBS (Tabla 6). Al día 273 post infección se observó que todos los grupos experimentales volvieron a tener un porcentaje de positividad del 100% (Tabla 6).

Tabla 6: Evaluación de la infección de ratones BALB/c con *T. cruzi* Sylvio X10/4 por PCR convencional. Se muestran los porcentajes de muestras positivas para cada grupo en cada día post infección. **98:** Día 98 post infección (antes de tratar). **188:** Día 188 post infección (después de tratar). **273:** Día 273 post infección (punto final del experimento). Estos resultados provienen de un único experimento.

| Grupo | 98 | 188 | 273 |
|-----------------|-----------|------------|------------|
| TSNT | 100% | 80% | 100% |
| BZ | 100% | 100% | 100% |
| PBS | 100% | 100% | 100% |
| TSNT +BZ | 100% | 66,70% | 100% |

De la evaluación de los ECG de cada ratón se observó que no hubo diferencias estadísticas en los parámetros de onda analizados (onda P, intervalo PR, segmento PR, complejo QRS e intervalo QT) (información no mostrada), pero sí se hallaron diferencias

en la proporción de animales con arritmias. En este análisis se encontró que: dentro del grupo PBS, el 100% de los ratones mostró algún tipo de alteración en sus ECG, el 75% de los ratones del grupo Bz presentó arritmias, dentro del grupo TSnt solo el 33% de los ratones exhibió variaciones en sus ECG y que en el grupo TSnt+Bz el 50% de los ratones mostró algún tipo de arritmia (Figura 32A). Dentro de estas alteraciones halladas en los ECG se pueden mencionar extrasístoles supraventriculares, bloqueo atrioventriculares de segundo grado y bradicardia (Figura 32B).

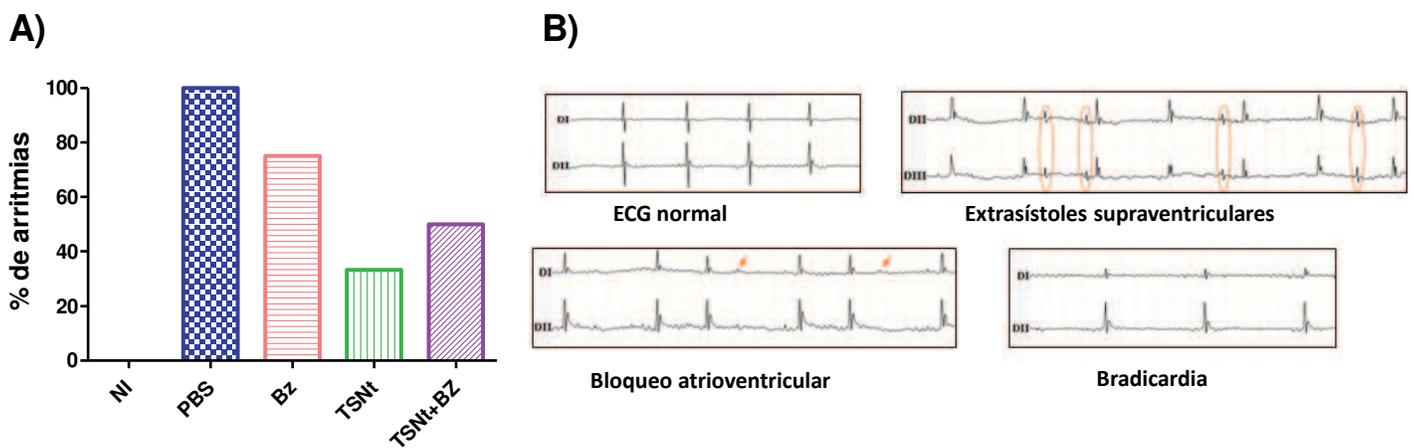


Figura 32: Evaluación de los ECG realizados al día 273 post infección. **A)** Porcentajes de arritmias encontradas en los distintos grupos a partir del análisis de los ECG. **B)** imágenes representativas de distintas arritmias encontradas durante el análisis de los ECG. Estos resultados provienen de un único experimento.

En cuanto al análisis histopatológico de corazón, se encontró que el *score* de daño obtenido fue elevado y similar para el grupo PBS y Bz, con un valor de 7, y que el grupo TSnt mostró una tendencia a disminuirlo significativamente, cuyo valor fue de 4,5 ($p=0,07$ para PBS vs TSnt y Bz vs TSnt, t test). El grupo que recibió el tratamiento mixto TSnt+Bz presentó un valor de *score* intermedio de 6 (Figura 33A). En la Figura 33B se observan imágenes de cortes histológicos teñidos con rojo de picrosirius (P) y hematoxilina-eosina (H&E) del grupo no infectado NI, del grupo PBS y del grupo TSnt. La tinción de rojo de picrosirius nos permite visualizar si el tejido presenta fibrosis miocárdica ya que tiñe de color rojo a las fibras de colágenos. Estas fibras de colágenos son determinantes en los procesos fisiológicos de reparación tisular y son características

de la mayoría de las cardiopatías crónicas en donde hay una acumulación exagerada focal o difusa de estas, tal como ocurre en la CCC [218]. La tinción de hematoxilina- eosina, por otra parte, permite percibir la presencia de infiltrados inflamatorios en el tejido, los cuales aparecen dependiendo de la magnitud del daño. Como puede apreciarse en las imágenes de los cortes histológicos, el grupo PBS (sin tratar), mostró regiones de gran acumulación de fibras de colágeno e infiltrados inflamatorios en comparación con el grupo sin infectar y sin tratar (Figura 33B). El grupo TSnt mostró la presencia de fibras de colágeno e infiltrados inflamatorios pero en menor cantidad que el grupo PBS (Figura 33B).

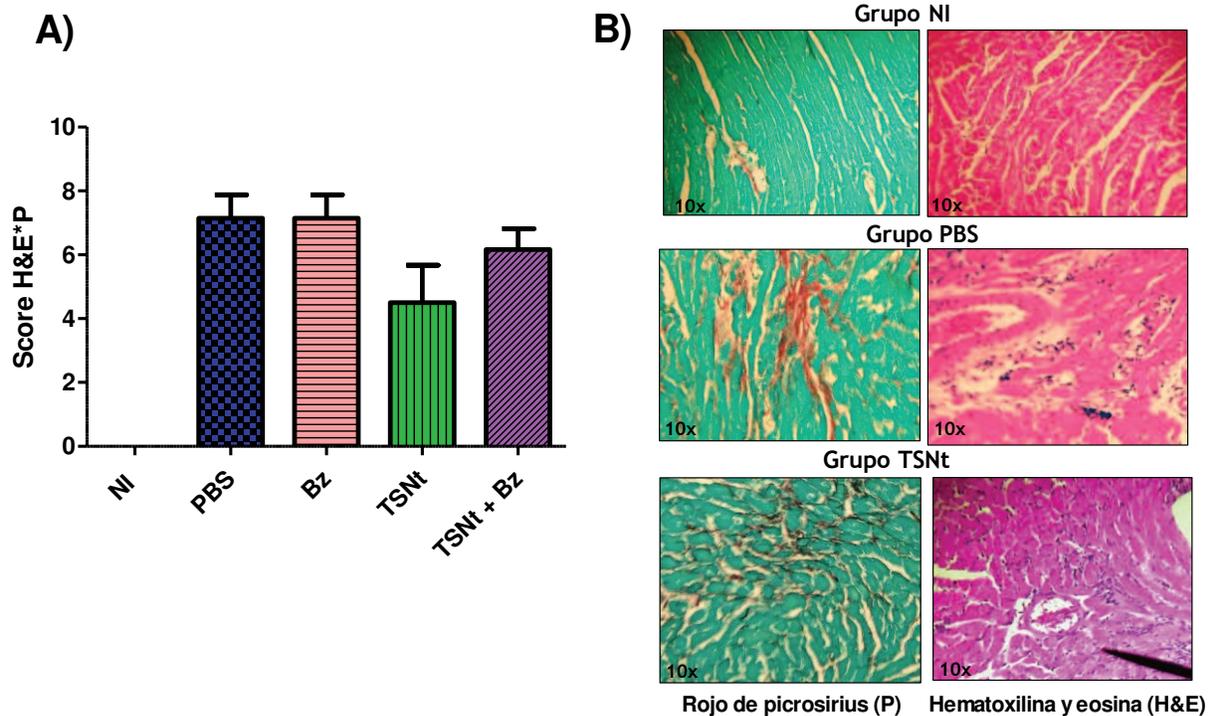


Figura 33: Análisis histopatológico de corazón. A) Score de daño histológico de corazón. El resultado “Score H&E*P” es el producto entre el puntaje de daño obtenido en la tinción hematoxilina-eosina (H&E) y el puntaje obtenido con la tinción de rojo de picosirius (P) ($p= 0,07$ para PBS vs TSnt y BZ vs TSnt, T test). B) Imágenes 10x de cortes histológicos de corazón con las tinciones de P y H&E (en la tinción P: verde= citoplasma muscular, rojo= fibras de colágeno; en la tinción H&E: azul= tinción nuclear, rosado= citoplasma celular). Estos resultados provienen de un único experimento.

Para la cuantificación de parásitos en corazón se construyeron curvas patrones para *T. cruzi* y para ADN de ratón (Figura 34 AyB), las cuales se optimizaron para poder

realizar una correcta normalización en donde los resultados finales se expresaron como parásitos equivalentes en 50 pg de ADN de ratón. Los valores obtenidos de eficiencia (Eff%) fueron de 122% para la curva de ADN de ratón y de 114% para la de *T. cruzi*, mientras que los valores del R^2 de ajuste fueron de 0,99 para ambas curvas (Figura 34 AyB).

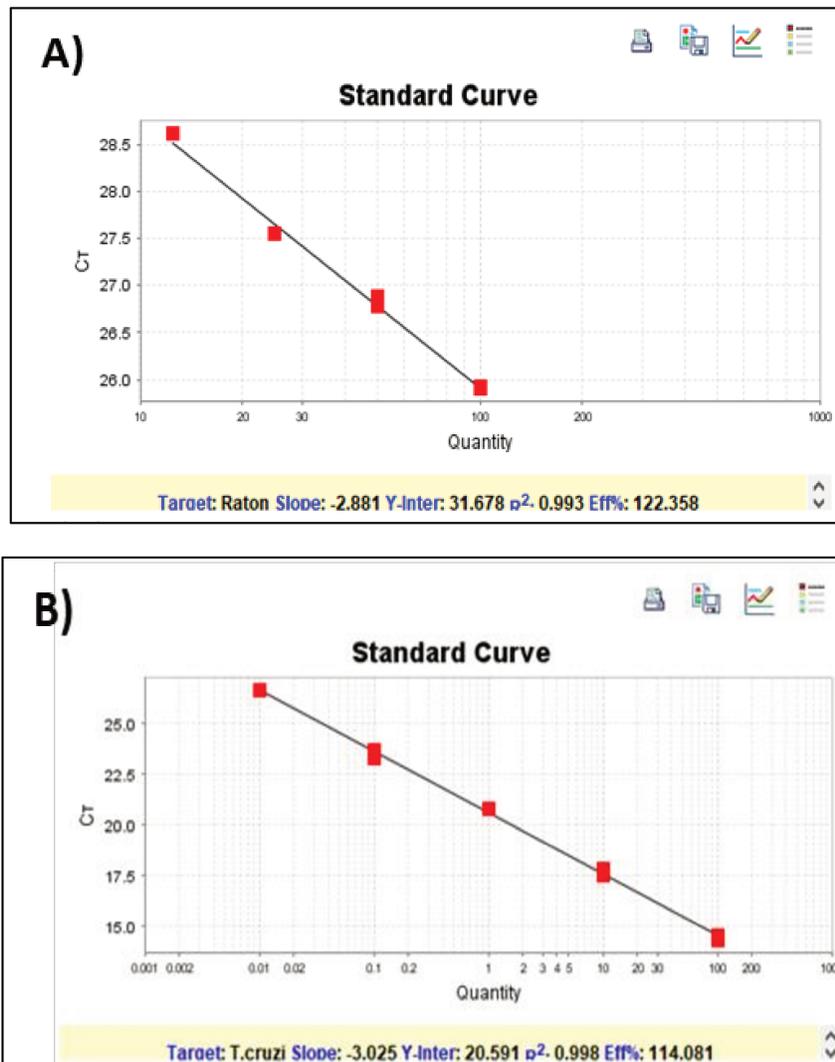


Figura 34: Curvas patrones utilizadas para la evaluación de carga parasitaria en corazón al día 273 post infección. **A)** Curva patrón de ratón: 100- 50-15-12,5 ng ADN de ratón ($R^2= 0,987$, eficiencia relacionada con la pendiente= 119,7%). **B)** Curva patrón de *T. cruzi*: 100-10-1-0,1-0,01 *T. cruzi* ($R^2= 0,998$ y eficiencia relacionada con la pendiente= 114%).

Con respecto a la evaluación de carga parasitaria en corazón por qPCR, se observó que la misma fue muy baja a un estadio crónico de infección tan largo como lo es el día

273 post infección, en donde el número de *T. cruzi* por 50 pg de ADN equivalente de ratón fue muy bajo inclusive en el grupo control PBS (Figura 35). A pesar de la baja cantidad de parásitos detectados, se pudo observar que de los grupos tratados el grupo TSnt mostró una tendencia estadística a reducir dicha la carga parasitaria ($p= 0,09$, *t test* PBS vs TSnt).

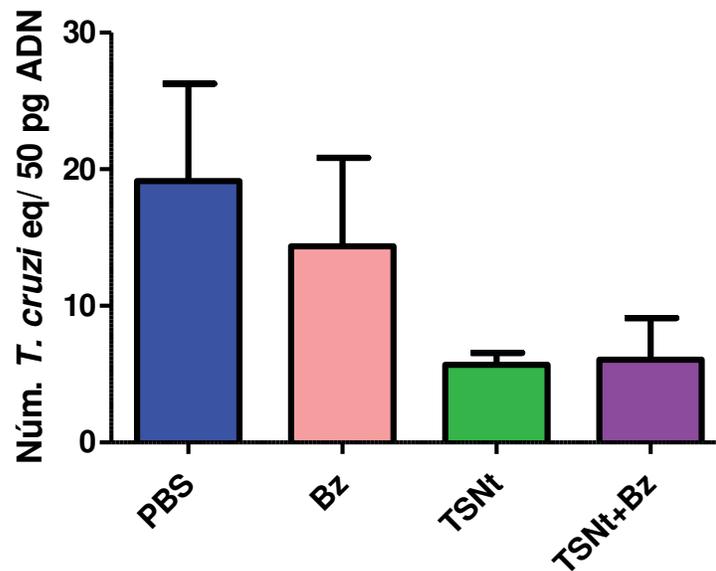


Figura 35: Cuantificación de *T. cruzi* en tejido cardíaco por qPCR evaluado al día 273 post infección. Resultados expresados como el número de *T. cruzi* equivalente en 50 pg de ADN de tejido cardíaco de ratón. Estos resultados provienen de un único experimento.

2.IV.2) Evaluación terapéutica de la formulación vacunal en un modelo de infección crónica BALB/c- Tulahuen cl2

Para ampliar el análisis de efectividad de los tratamientos se buscó establecer otro modelo de infección crónica que permita maximizar las lesiones características de la enfermedad de Chagas. Para ello, se decidió trabajar con una cepa más virulenta como lo

es Tulahuen cl2. Esta cepa, que pertenece al linaje DTU VI, es altamente virulenta y es la que hemos empleado en el estudio de vacuna profiláctica en este trabajo de tesis y en trabajos previos en nuestro laboratorio para trabajar con modelos agudos de infección [120], [130], [152], [156], ya que en dosis adecuadas, produce una gran mortalidad de los ratones, elevada parasitemia y lesiones en corazón a los 90 días post infección. Debido a la elevada mortalidad que genera esta cepa de *T. cruzi* en los grupos controles cuando se aplica en una dosis de 1.000 tripomastigotes por vía intraperitoneal, se ensayó la vía intradérmica como nueva vía de infección para tratar de reducir dicha mortalidad.

De esta manera, ratones BALB/c fueron infectados al iniciar el experimento con 1.000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen cl2 inoculados en la almohadilla plantar de cada ratón. La infección de los ratones se evaluó mediante un seguimiento de la parasitemia, a los días 14, 21 y 28 post infección y un análisis de la supervivencia. Se observó que todos los ratones infectados evidenciaron elevados niveles de parásitos en sangre y que solo el 47% sobrevivió (información no mostrada). Estos ratones sobrevivientes fueron redistribuidos en diferentes grupos (n=5 ratones por grupo) y a los 100 días post infección se comenzó con la aplicación de la formulación vacunal TSNT-ISPA; la cual se administró en tres dosis subcutáneas a los días 100, 110 y 120 post infección (Figura 29). Al día 135 post infección se comenzó con el tratamiento diario de Bz a los grupos correspondientes, el cual se administró durante 30 días consecutivos, del día 135 al 165 post infección, en una dosis de 100 mg de Bz/Kg de ratón (Figura 29). Se monitoreó la carga parasitaria en sangre durante la fase crónica de infección por qPCR, para lo cual se tomaron muestras de todos los ratones al día 98 (antes de tratar), 133 (después de aplicar la formulación vacunal), al día 196 (post tratamiento con Bz) y al día 260 post infección (punto final) (Figura 29). Al día 260 post infección se concluyó esta vuelta experimental, en donde se anestesiaron los ratones y se les realizó un ECG. Luego los animales fueron sangrados por punción cardíaca y sacrificados por dislocación cervical. Se les extrajo el corazón para evaluar carga parasitaria por qPCR. De cada ECG registrado se analizó la frecuencia cardíaca y parámetros de onda como onda P, intervalo PR,

segmento PR, complejo QRS e intervalo QT corregido. Se evaluó además la presencia de alteraciones morfológicas en estos ECG las cuales se agruparon dentro de arritmias.

Para la evaluación de carga parasitaria en sangre por qPCR se realizaron curvas estándar: una para *T. cruzi* y otra para pGEM[®]-T (Figura 36 AyB). Estas curvas se optimizaron, no solo para tener una elevada eficiencia (Eff%) y R², sino para poder hacer una correcta normalización. Las eficiencias para las curvas del estándar interno pGEM[®]-T y de *T. cruzi* fueron del 109% y 125% respectivamente y los R² de ajuste fueron de 0.99 para ambas curvas (Figura 36 AyB).

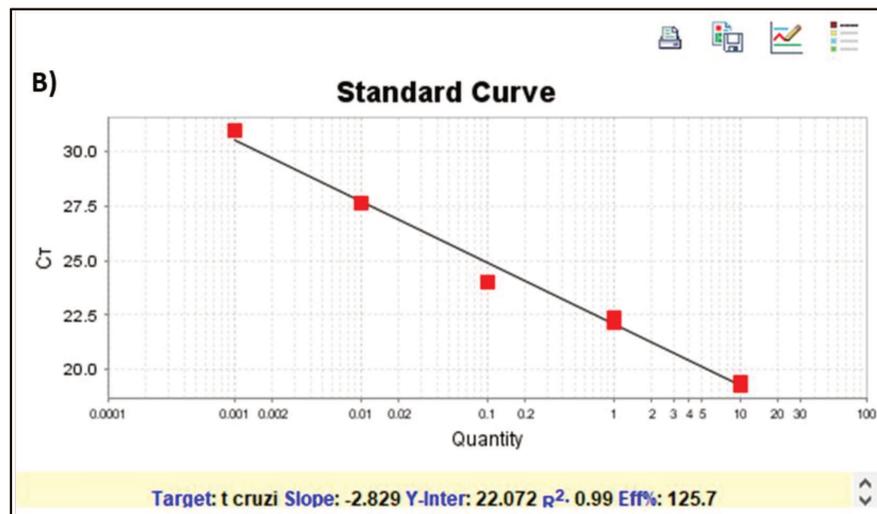
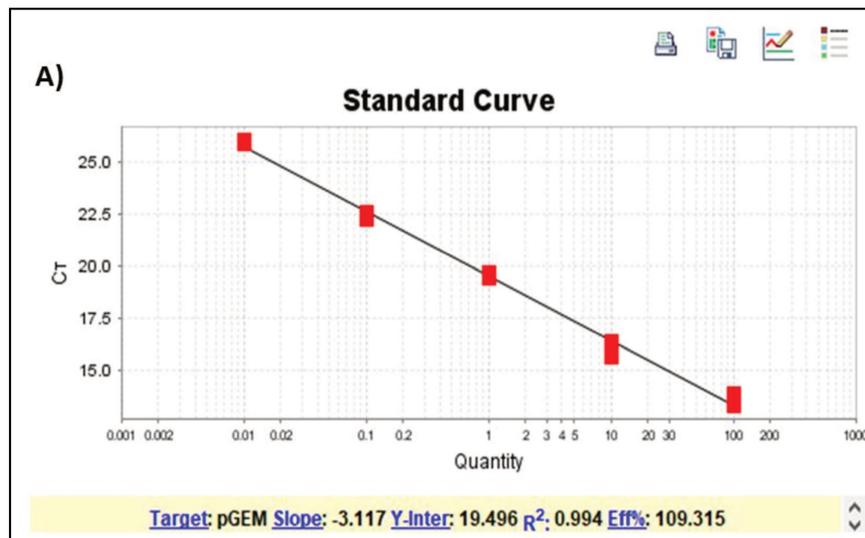


Figura 36: Curvas patrones utilizadas para la evaluación de carga parasitaria en sangre a distintos días post infección. **A)** Curva patrón del estándar interno pGEM®-T 100- 10-1- 0,1- 0,01 pg de ADN de pGEM ($R^2= 0,994$, eficiencia relacionada con la pendiente, Eff%= 109,3%). **B)** Curva patrón de *T. cruzi*: 10--1-0,1- 0,01- 0,001 *T. cruzi* ($R^2= 0,99$ y eficiencia relacionada con la pendiente, Eff%= 125,7%).

De las evaluaciones de carga parasitaria en sangre por qPCR se observó que la aplicación de la formulación vacunal TSnt produjo una reducción en el número de parásitos/ml, evaluada al día 133 post infección, y que estos niveles se mantuvieron bajos y constantes a lo largo de las distintas determinaciones (Figura 37A). Lo mismo ocurrió con la aplicación del Bz, en donde se puede visualizar una disminución de esta parasitemia, evaluada al día 196 post infección (Figura 37A). El grupo sin tratar PBS, por otra parte, mostró una elevada parasitemia a lo largo del experimento la cual disminuyó en el último punto, al día 260 post infección (Figura 37A). En este punto final del experimento, al día 260 post infección, se observó que si bien todos los grupos tratados lograron reducir el número de *T.cruzi*/ml de sangre, fue el grupo que recibió el tratamiento mixto TSnt+Bz el que presentó diferencias significativas con el grupo PBS ($*p < 0,05$, Kruskal-Wallis test, post test de Dunns) (Figura 37B).

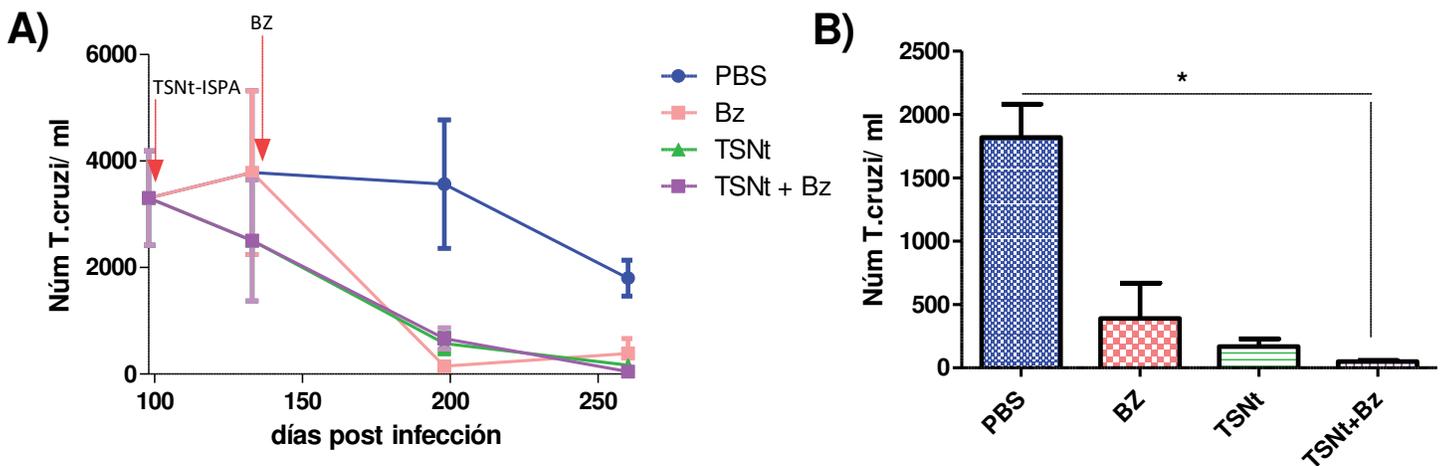


Figura 37: Medición de carga parasitaria en sangre por qPCR a distintos tiempos post infección. **A)** Número de parásitos *T. cruzi* por ml de sangre medido por qPCR a distintos tiempos post infección. **TSnt-ISPVA:** indica el comienzo del tratamiento con la formulación vacunal (tres dosis: día 100, 110 y 120 post infección). **BZ:** indica el comienzo del tratamiento con dicha droga (día 135 al 165 post infección). **B)** Número de *T.cruzi* por ml evaluado al día 260 post infección ($*p < 0,05$, Kruskal-Wallis test, post test de Dunn). Estos resultados provienen de un único experimento.

En cuanto al análisis de los ECG realizados al día 260 post infección no se encontraron diferencias en la frecuencia cardíaca, ni en los parámetros de onda como onda P, segmento PR e intervalo PR comparados entre grupos, pero sí en la evaluación del complejo QRS e intervalo QTc. Se observó que el grupo PBS presentó los mayores valores de estos parámetros con diferencias significativas respecto al grupo sin infectar NI y que de todos los grupos tratados, el grupo TSnt+Bz fue el que logró reducir significativamente los valores de ambos parámetros (* $p < 0,05$ ANOVA One-way; post test de Tukey) (Figura 38 AyB). El grupo Bz mostró una reducción significativa del complejo QRS pero no así del intervalo QTc (Figura 38 AyB). El grupo TSnt tampoco redujo el complejo QTc y mostró una tendencia a disminuir al complejo QRS (Figura 38 AyB). Con respecto a la evaluación de la presencia de arritmias observamos que el 100% de los ratones infectados sin tratar (grupo PBS) presentó algún tipo de alteración, que el 80% de los ratones tratados con Bz también mostró arritmias, así como el 60% de los ratones tratados con la TSnt (Figura 38C). Solo el grupo que recibió el tratamiento mixto, TSnt+Bz,

no evidenció alteraciones en ninguno de estos parámetros comportándose como el grupo NI (Figura 38C).

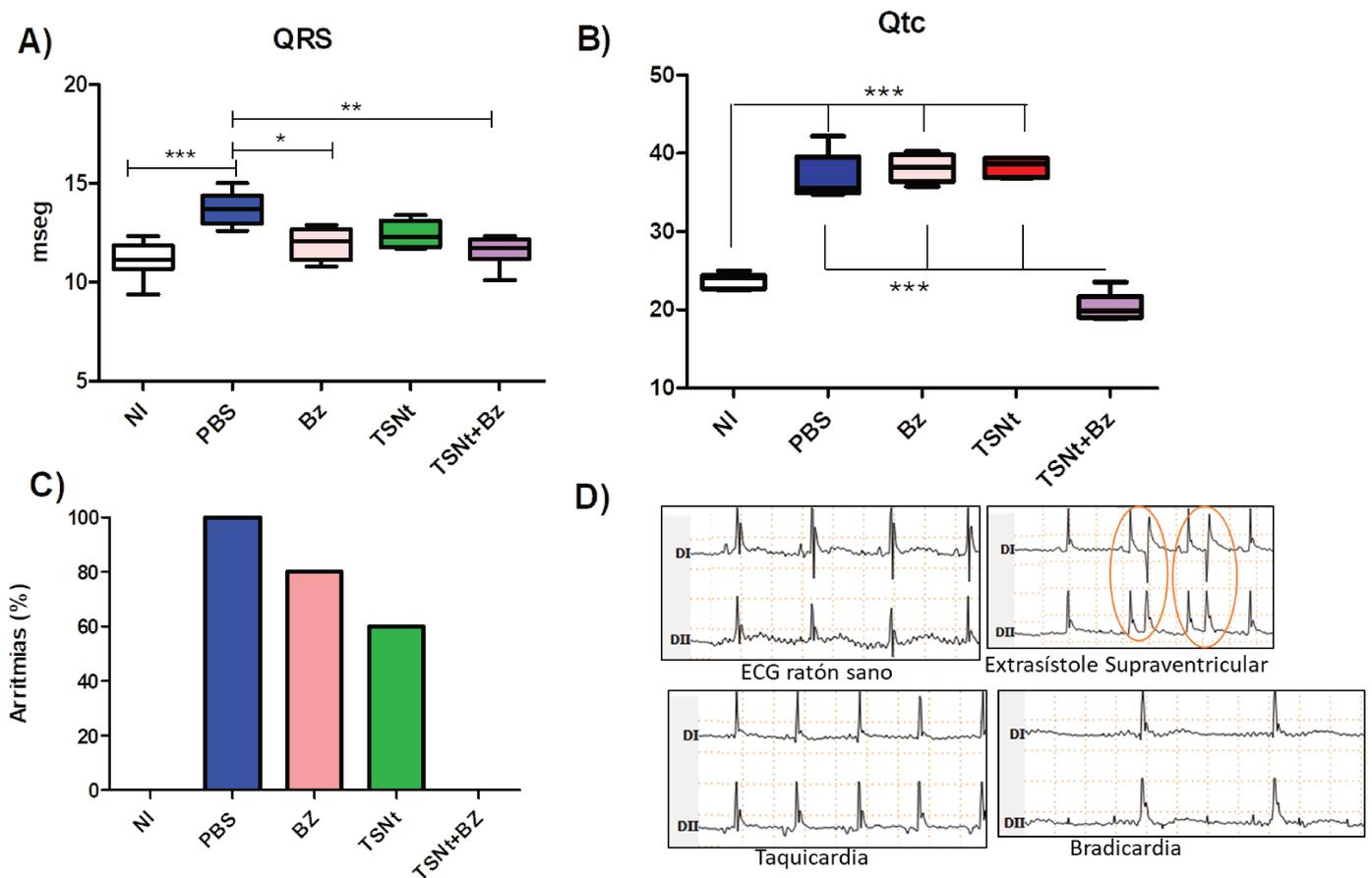


Figura 38: Evaluación de los ECG realizados al día 260 post infección. A) Complejo QRS expresado en milisegundos. **B)** Intervalo QT corregido según la frecuencia cardíaca aplicando la fórmula descrita en Mitchell et al., 1998 [213]. Resultados expresados en milisegundos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$, ANOVA One way; post test de Tukey). **C)** Porcentaje de arritmias encontradas en la evaluación de los distintos ECG. **D)** imágenes representativas de distintas arritmias encontradas durante el análisis de los ECG. Estos resultados provienen de un único experimento.

Con respecto a la cuantificación por qPCR de *T. cruzi* en corazón, se observó que las concentraciones de parásitos halladas fueron muy bajas al día 260 post infección (Figura 39), lo que coincide con lo observado en el modelo crónico de infección BALB/c-Sylvio X10/4 (Figura 35). Si bien el análisis grupal de datos no arrojó diferencias significativas entre los grupos se puede observar que los grupos tratados tienden a

disminuir estos valores de carga. En concordancia con esto, cuando se realizó un análisis de pares de grupos se observó que el grupo TSNt fue el único en mostrar una reducción significativa de la carga en comparación con el grupo PBS (* $p < 0,05$, Mann Whitney test: PBS vs TSNt+Bz) (Figura 39).

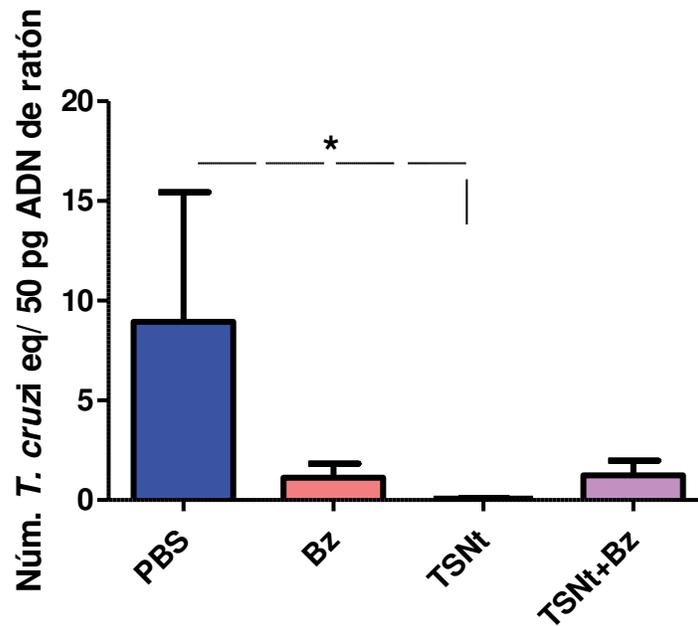


Figura 39: Cuantificación de *T. cruzi* en tejido cardíaco por qPCR evaluado al día 260 post infección. Resultados expresados como el número de *T. cruzi* equivalente en 50 pg de ADN de tejido cardíaco de ratón. (* $p < 0,05$ Mann Whitney test PBS vs TSNt). Estos resultados provienen de un único experimento.

2. V) Discusión:

La vacunación terapéutica ha sido propuesta para el control de la infección por *T. cruzi* con el objetivo de detener o al menos retrasar la progresión de las complicaciones cardíacas en pacientes infectados [106]. Además, en combinación con la terapia antiparasitaria, estas vacunas podrían permitir reducir la dosis del medicamento y/o la duración del tratamiento, lo que podría aumentar la tolerancia a estas drogas y reducir sus efectos secundarios adversos. Después de muchos años de debate sobre el papel de la autoinmunidad en el desencadenamiento de la progresión de la enfermedad de Chagas, que limitó considerablemente los esfuerzos para desarrollar una vacuna, ahora está bien establecido que la persistencia del parásito en los tejidos es uno de los principales mecanismos impulsores de la patogénesis, lo que proporciona un fundamento sólido para el desarrollo de vacunas [106]. Dado que se ha establecido que la carga de parasitemia en embarazadas es un factor clave para la transmisión congénita de la infección [32], [33], [219], una vacuna terapéutica que se aplique en la etapa preconcepcional destinada a prevenir la transmisión congénita del parásito sería una excelente herramienta adicional para el control de la enfermedad de Chagas. Aunque lograr el control de la enfermedad de Chagas y el desarrollo de vacunas requerirá fuertes inversiones, los beneficios económicos para las personas y la sociedad superan con creces estas inversiones [105].

Existe una amplia evidencia experimental de que la aplicación de una vacuna en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas permite disminuir la carga parasitaria en corazón y reducir la inflamación en dicho órgano [107]–[109], [204], [220]. Uno de los mecanismos que podría explicar esta acción es la disminución de la carga parasitaria que promueve la inmunización terapéutica. Sin embargo, en el caso de la enfermedad de Chagas el control de la lesión inmune en tejidos que promueve la inmunización también podría ser uno de los mecanismos que previene la patología cardíaca crónica ya que las

lesiones inflamatorias han mostrado ser un mecanismo patogénico clave en esta enfermedad [201].

Como ya se ha mencionado anteriormente, un tratamiento mixto que combine al parasiticida Bz con una vacuna terapéutica podría tener beneficios ya que se ha reportado que el tratamiento con Bz es capaz de promover el desarrollo de una población estable de células TCD8+ efectoras tanto en infecciones experimentales [205], [206] como en infecciones crónicas humanas, en donde se vio que el tratamiento con Bz en pacientes crónicos asintomáticos aumenta las células TCD8+ efectoras permitiendo mejorar la calidad de la respuesta inmune protectora [207], [208]. Sin embargo, como ya se ha mencionado, en el estudio multicéntrico BENEFIT no se pudo correlacionar que dicha droga parasiticida disminuya las lesiones halladas en corazón [82]. Cabe destacar que dicho evaluación no fue acompañada por un tratamiento inmunomodulador. En base a todo lo expuesto se planteó, como segunda parte de este trabajo de tesis, la hipótesis de que la administración de una formulación vacunal conformada por un antígeno altamente protectoro, como lo es la TS, podría actuar reprogramando la respuesta inmune y aumentando la eficacia de los mecanismos efectores que controlan la carga, pero también la respuesta regulatoria específica. Además, se planteó que la inmunomodulación que brinda el candidato vacunal en el curso de la infección crónica podría ser favorecida por un tratamiento parasiticida, como lo es el Bz, que disminuya la carga y ayude a modificar el perfil de la respuesta inmunológica aumentando la memoria efectora de linfocitos T citotóxicos.

Como ya se ha descrito, estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la capacidad protectora de la proteína TSm formulada con el adyuvante liposomal IMX [152] y su eficacia frente a seis antígenos más de *T. cruzi* [130]. También se han evaluado fracciones de esta TS: un fragmento TSf, correspondiente al extremo carboxilo, formulado con un adyuvante de producción propia llamado ISPA [156] y fragmentos amino terminal y carboxilo terminal clonados dentro del sistema de *delivery* BCG [120]. Todas estas evaluaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo fueron

ensayadas en un modelo de infección aguda como vacunas profilácticas, pero nunca antes se había trabajado con un modelo de infección crónica aplicando vacunas terapéuticas.

Con respecto al desarrollo de vacunas terapéuticas son escasos los trabajos que han evaluado la aplicación de una vacuna en un estadio avanzado de infección crónica por *T. cruzi*. Dentro de estos trabajos cabe destacar la evaluación de una vacuna que emplea al adenovirus recombinante tipo 5 el cual codificaba para las secuencias de las proteínas ASP2 y TS. Con esta construcción se han vacunado ratones de la cepa C57BL/6, previamente infectados con *T. cruzi* de la cepa Colombian, a los días 120 y 160 post infección y se observó, al día 230 post infección, que los ratones vacunados presentaron menos anormalidades en sus ECG y menos daño y carga parasitaria en corazón [220]. Recientemente se ha publicado el primer trabajo de evaluación de vacuna terapéutica que emplea una proteína recombinante como candidato vacunal. En este trabajo ratones ICR fueron infectados con *T. cruzi* de la cepa H1 y vacunados a los días 70 y 98 post infección, con una formulación vacunal que contenía a la proteína Tc24 de *T. cruzi* y al adyuvante E6020. Al día 180 post infección estos autores observaron que los ratones vacunados mostraban una menor fibrosis en corazón, una menor parasitemia en sangre y una respuesta inmune del perfil TH1 [204]. En este trabajo de tesis, a diferencia de los trabajos antes mencionados, se evaluó como vacuna terapéutica una formulación que contiene un fragmento de TS más un adyuvante de producción propia, ISPA, en dos modelos de infección crónica completamente diferentes. En ambos modelos se utilizaron ratones de la cepa BALB/c pero se trabajó con cepas de *T. cruzi* genéticamente distantes: una cepa de baja virulencia, como lo es la cepa Sylvio X10/4, y una cepa altamente virulenta, como lo es la cepa Tulahuen cl2. En ambos modelos no solo se evaluó la acción terapéutica de nuestra formulación vacunal sino que también se estudió la acción conjunta con uno de los tratamientos parasiticidas comúnmente aplicados en humanos, el Bz.

Para el establecimiento de los diferentes modelos crónicos, ratones BALB/c fueron infectados al iniciar el experimento con las correspondientes cepas de parásitos. Una vez establecida la fase crónica de infección, lo que se considera a partir del día 90 post

infección en donde la parasitemia ya no es visible [221], se comenzaron con los diferentes tratamientos. El esquema de trabajo empleado consistió primero en aplicar la formulación vacunal y luego comenzar con el tratamiento con Bz. Se escogió este esquema de trabajo pensando en la hipótesis de que al aplicar la formulación vacunal primero ocurre un redireccionamiento de la respuesta inmune hacia el antígeno inmunodominante TS, la cual podría potenciar el efecto estimulador que provoca el Bz sobre la población de células inmunes tal y como se describió anteriormente. Como vacuna terapéutica se aplicó la formulación vacunal TSnt-ISPA ya que este fragmento mostró los mejores resultados de protección en comparación con los demás antígenos ensayados (TSf, CP3 y ASP2) en los experimentos correspondientes al análisis profiláctico de las formulaciones vacunales. Por cuestiones de tiempo de los distintos experimentos, en especial los del modelo crónico que son muy largos, los ensayos se han ido largando casi en simultáneo, razón por la cual no se ha utilizado la mezcla de fragmentos TSnt+TSf como vacuna terapéutica que fue la mejor formulación evaluada como vacuna profiláctica.

En una primera vuelta experimental de esta evaluación terapéutica se trabajó con un modelo de infección BALB/c- Sylvio X10/4. Esta cepa, de DTU I, ha sido muy utilizada en modelos murino de infección crónica ya que no ocasiona una fuerte fase aguda de infección por lo que es considerada de baja virulencia, pero sí induce lesiones cardíacas crónicas que reproducen varias características patológicas de la enfermedad de Chagas en humanos [216], [217]. Estas características hacen que este modelo tenga similitudes con la infección en humanos en la cual la infección aguda suele ser subclínica pero en el 30% al 40% de los pacientes se desarrollan patologías en la fase crónica. Al inicio del experimento los ratones fueron infectados con 1×10^6 de tripomastigotes de la cepa Sylvio X10/4, a los 120 días post infección se comenzó con la aplicación de la formulación vacunal TSnt+ISPA y al día 140 post infección se administró el Bz durante 30 días seguidos. Como esta cepa de parásitos no genera una parasitemia visible ni mortalidad de los ratones infectados, se tomaron muestras de sangre a distintos días post infección para

evaluar por PCR convencional y ELISA para evaluar la presencia de ADN de *T. cruzi* y la generación de anticuerpos anti-*T. cruzi*.

Con respecto al análisis de la infección de los ratones se observó que todos los grupos, incluido el grupo control sin tratar, mostraron anticuerpos anti- *T. cruzi*, especialmente del isotipo IgG2a, y que dichos anticuerpos aumentaron a lo largo del experimento (Figura 30). También se observó que los grupos TSnt y TSnt+Bz fueron capaces de generar elevados niveles de anticuerpos específicos contra dicho fragmento con un balanceado perfil IgG2a e IgG1, a diferencia de lo ocurrido cuando se evaluaron anticuerpos contra homogenato de *T. cruzi* donde el isotipo predominante fue IgG2a (Figura 31). Esto coincide con lo evaluado en el modelo agudo de infección, en donde se observa que nuestro candidato vacunal genera una elevada respuesta de anticuerpos post inmunización. El hecho que todos los grupos muestren la presencia de anticuerpos anti- *T. cruzi* y que estos se mantengan a lo largo del experimento nos confirmó que la infección de los ratones ha ocurrido de manera exitosa. Estos resultados fueron confirmados con las reacciones de PCR, en las cuales se observaron que al momento antes de tratar el 100% de los ratones de los distintos grupos dieron positivo para la presencia de *T. cruzi*. Esta situación se revirtió al finalizar los distintos tratamientos en donde se percibió que solo los grupos vacunados (grupos TSnt y TSnt+BZ) fueron capaces de negativizar y disminuir este valor de positividad al 80% y 66,70% respectivamente. Por otra parte, el grupo tratado con Bz solo no logró bajar esta parasitemia detectable por PCR (Tabla 6).

Para el tratamiento de los ratones se utilizó una dosis de Bz de 100 mg/kg/día administrada por vía oral ya que se ha reportado que dicha dosis produce una cura parasitológica en varios modelos de infección experimental [200], [205], [222]–[224]. Se ha visto que en un modelo experimental murino C57BL/6- *T. cruzi* CL Brenner (DTU VI) cuando se aplica esta dosis de Bz durante 40 días consecutivos en estadios tempranos de infección se alcanzaba una cura parasitológica del 100% de los ratones, en los cuales no se observaron parásitos en sangre una vez finalizado el tratamiento e inmunosuprimido a los ratones [200]. Otro grupo de trabajo ha evaluado el tratamiento de Bz en distintas

dosis y diferentes modelos murinos de experimentación y han realizado un seguimiento de la infección mediante un método sumamente sensible como lo es la bioluminiscencia *in vivo* trabajando con parásitos fluorescente. En estos trabajos se ha encontrado que la dosis de 100 mg Bz/kg/día administrada de 5 a 20 días seguidos aplicado en la fase crónica de infección generaba la cura parasitológica del 100% de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* de la cepa CL Brenner (DTU VI), ya que ningún ratón mostró bioluminiscencia una vez finalizado el tratamiento y luego de haber sido inmunosuprimidos [223], [224]. A pesar de la amplia evidencia que existe de que una dosis de 100 mg Bz/kg/día administrado más de 20 días seguidos genera una cura parasitológica, existen trabajos en los que esta cura parasitológica no se ha alcanzado, lo que resalta la dificultad que existe en el desarrollo de un modelo murino de Chagas crónico, el cual depende de la cepa del animal, la cepa del *T. cruzi*, el inóculo de parásito aplicado y el tiempo/dosis de droga testada [225]. En uno de estos trabajos en donde se infectaron ratones BALB/c con diferentes cepas de *T. cruzi* se encontró que dicha dosis de Bz aplicada al día 90 post infección durante 20 días consecutivos no mostró negativizar las pruebas serológicas y no impidió la reactivación de la parasitemia [226]. En nuestro modelo de infección BALB/c-*T. cruzi* Sylvio X10/4 tampoco observamos una cura parasitológica al aplicar el tratamiento con Bz solo, sin combinar, ya que no logró reducir la parasitemia evaluada por PCR. Más allá del modelo de infección que es determinante en la cura parasitológica que se logra, cabe destacar que el diseño que hemos desarrollado para este experimento contempla realizar el tratamiento con Bz en una fase tardía, a diferencia de algunos trabajos citados, en donde el objetivo fue asegurarse obtener una infección con mayor número de lesiones producidas por el parásito al momento de tratar.

Al finalizar el experimento, al día 273 post infección, se realizó un ECG a cada ratón y se analizó de cada uno de ellos los parámetros de onda correspondientes. También se analizó la presencia de alteraciones en la forma y frecuencia de dichos ECG, los que se agruparon dentro de arritmias. De estas evaluaciones se encontró que aquellos grupos que recibieron la formulación vacunal, grupos TSnt y TSnt+BZ, lograron revertir el porcentaje de alteraciones eléctricas halladas al 50% y 33% respectivamente, en

comparación con el grupo PBS que mostró alteraciones en el 100% (Figura 32A). Dentro de estas alteraciones eléctricas encontradas podemos mencionar bradicardia, bloqueos atrioventriculares y extrasístoles supraventriculares (Figura 32B), alteraciones también reportadas en un modelo de infección crónica utilizando ratones BALB/c [227]. Esta gran disminución en el porcentaje de alteraciones obtenido con la aplicación la formulación TSnt+ISPA como vacuna terapéutica fue similar a lo obtenido en la evaluación de una vacuna basada en adenovirus recombinante que codificaba para TS y ASP2 [228]. En dicho trabajo se observó que al infectar ratones C57BL/6 con tripomastigotes de la cepa Colombian y aplicar la formulación vacunal en el estadio crónico, los ratones tratados disminuían el porcentaje de alteraciones encontradas en un 40% en comparación con el grupo control al día 230 post infección [228]. El grupo tratado con Bz, por otra parte, no logró reducir en gran medida el porcentaje de alteraciones encontradas, en donde el 75% de los ratones mostró la presencia de algún tipo de alteración en comparación con el grupo PBS que mostró alteraciones en el 100% de sus ECG (Figura 32A). En otros trabajos publicados, en donde se estudió la efectividad del Bz aplicado en una dosis de 100 mg/kg/día, se encontró que dicha droga parasiticida era capaz de disminuir el porcentaje de alteraciones halladas en los ECG en distintas magnitudes dependiendo el modelo experimental utilizado y la fase de infección en la que se aplicaba. En un modelo experimental BALB/c- *T. cruzi* Colombian (DTU I) se observó que al aplicar el Bz en la etapa aguda de la infección solo el 20% de los ratones tratados mostraron alteraciones en los ECG en la fase crónica, en comparación con el grupo control que mostró alteraciones en el 100% de los ECG de sus ratones [227]. En cambio, cuando se aplicó BZ en un modelo murino Swiss- *T. cruzi* Tulahuen (DTU VI) en la fase crónica de la infección se observó que el grupo tratado solo disminuyó en un 30% las alteraciones encontradas [205], situación similar a lo ocurrido en nuestro modelo experimental. Cuando se analizaron variaciones en los parámetros de onda no se han encontrado diferencias entre los diferentes grupos ensayados (información no mostrada). Este hecho tiene similitud con lo reportado en un trabajo previo en donde se evaluó la presencia de alteraciones en ECG de ratones BALB/c infectados con las cepas de *T. cruzi* Sylvio X10/4, Brasil y Tulahuen a distintas semanas

post infección [229]. En dicho trabajo se informó que los modelos que empleaban las cepas Tulahuen o Brasil presentaban alteraciones en el complejo QRS e intervalo QTc, pero no los que utilizaban Sylvio X10/4 [229].

Existe una amplia evidencia de que uno de los factores que intervienen en la patología cardíaca crónica de la enfermedad de Chagas es el daño dependiente de la persistencia del parásito y la lesión inmune del tejido [201]. En concordancia con esto, se ha reportado que: I) en modelos experimentales la carga parasitaria se correlaciona con la inflamación del tejido [230]; II) la reinfección en animales experimentales o la continua exposición a la infección de personas que residen en áreas endémicas conlleva a un incremento de la carga de parásitos y al desarrollo de una enfermedad más severa [231]; III) en modelos animales, la disminución de la carga de parásitos mediante un parasiticida atenúa la miocarditis [227], [232] y IV) ADN de *T. cruzi* se ha detectado en corazones de pacientes con CCC más frecuentemente que en pacientes seropositivos sin cardiopatía [233]. En base a estos antecedentes se procedió a analizar al día 273 post infección el daño histológico en corazón y carga parasitaria en dicho órgano. Del análisis histológico de corazón se observó que de todos los grupos infectados y tratados solo el grupo TSNT mostró un menor número de lesiones en este órgano (Figura 32). Por otra parte, con respecto a la evaluación de carga parasitaria en corazón por qPCR se observó que la presencia de parásitos en tejido cardíaco es muy baja inclusive en el grupo control PBS, sin embargo, se encontró que los grupos que recibieron la formulación vacunal disminuyeron dicha carga (Figura 35).

La baja cantidad de parásitos encontrada en corazón en el estadio crónico de infección muestra concordancia con una publicación previa, en la cual demuestran que en la infección crónica de ratones BALB/c con parásitos Sylvio X10/4 (DTU I) no existe tropismo por este órgano [234]. Por el contrario, en dicho trabajo describen que luego de 84 días post infección, en la fase crónica de infección, esta cepa de *T. cruzi* se puede encontrar en intestino [234]. En otro trabajo, se evaluó la distribución del *T. cruzi* a lo largo de la infección en diferentes modelos de experimentación empleando parásitos fluorescentes y visualizándolos *in vivo* con un límite de detección de hasta 100 parásitos

libres en la cavidad peritoneal [235]. Los autores observaron que en un estadio crónico, a los 150 días post infección, el *T. cruzi* se aloja predominantemente en el tracto gastrointestinal y para ratones de la cepa BALB/c el intestino grueso y estómago son los órganos que mostraron una mayor presencia de parásitos [223], [224], [236], [237]. En base a esto, este grupo de investigación postuló que las lesiones cardíacas podrían no deberse a la presencia permanente del parásito en corazón sino a que el parásito se aloja en forma crónica en intestino y en forma cíclica puede migrar al corazón produciendo lesiones como resultado de la respuesta inmune contra el mismo [236].

Todos estos resultados en conjunto nos muestran que el empleo de nuestra formulación vacunal TSnt-ISPA en un modelo de infección crónica BALB/c- Sylvio X10/4 es una estrategia promisorio como tratamiento terapéutico, ya que fue capaz de negativizar la parasitemia evaluada por PCR y tiende a disminuir la carga de *T. cruzi* en corazón, lo que llevó a tender a disminuir las lesiones en tejido cardíaco y a un menor desarrollo de arritmias cuando se evaluaron los ECG. El tratamiento con Bz no negativizó la parasitemia ni disminuir las lesiones halladas en corazón y en el caso del tratamiento mixto TSnt+Bz no mejoró los resultados obtenidos con la formulación vacunal sola. Estos resultados encontrados nos demuestran que esta cepa Sylvio X10/4, de DTU I, no fue sensible al tratamiento quimioterapéutico con Bz.

Se ha descrito resistencia al tratamiento quimioterapéutico con Bz y Nx por parte de ciertas cepas de *T. cruzi*. Algunos trabajos reportan que hasta un 27% de las cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes orígenes biológicos y geográficos, poseen resistencia natural a dichas drogas [238]. Se ha reportado que es posible inducir resistencia en este parásito, tanto *in vitro* como *in vivo*, por presiones continuas con estos medicamentos [239], [240] y se han propuesto algunos genes involucrados en el surgimiento del fenotipo de resistencia a este medicamento [241]–[243]. Algunos estudios reportaron que las cepas de *T. cruzi* de DTU I son más resistentes al Bz que parásitos provenientes de otras DTU [12], [226], [244], lo que se correlaciona con lo hallado en nuestro modelo BALB/c-Sylvio X10/4, parásito perteneciente a DTU I. Sin embargo, a la fecha no se han podido correlacionar los mecanismos moleculares involucrados en esta resistencia, ni tampoco

la resistencia con otros parámetros biológicos, genéticos o bioquímicos de *T. cruzi* [245], [246].

En este modelo de infección crónica BALB/c-Sylvio X10/4 se observó que los ratones infectados desarrollan una moderada cardiopatía con escasos infiltrados inflamatorios y sin diferencias en los parámetros de onda analizados por ECG, contrariamente a lo que se describe para el modelo de infección murino C3H-Sylvio X10/4, propuesto como modelo experimental para reproducir las características de la CCC en humanos [216], [247]. Es por esta razón que se ensayó un nuevo modelo de infección crónica trabajando con una cepa más virulenta, como lo es la cepa Tulahuen cl2, que permita confirmar estos resultados maximizando las lesiones obtenidas en la etapa crónica de infección.

Para el establecimiento de este nuevo modelo de infección ratones BALB/c fueron infectados con 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2 inoculados por vía intradérmica. Esta vía de administración y dosis de *T. cruzi* a inocular se ensayaron previamente. Debido a que 1.000 tripomastigotes Tulahuen cl2 inoculados por vía intraperitoneal, según lo observado en las evaluaciones en modelo agudo de infección, generaron la muerte del 100% de los ratones controles al ser infectados a las 16 semanas de edad, se decidió buscar otra dosis o vía de infección para aumentar la sobrevivencia de los ratones y poder establecer un modelo crónico de infección. En un principio se probó infectar ratones de 8 semanas de edad con una dosis de 500 Tulahuen cl2 de forma intraperitoneal en donde se observó una mortalidad del 100% de los ratones (información no mostrada). En otra prueba, que se realizó para el modelo agudo de infección, se inocularon ratones de 16 semanas de edad de forma intradérmica con 1.000 Tulahuen cl2 y se obtuvo que el 100% de estos ratones sobrevivieron (información no mostrada). En base a estos antecedentes se decidió infectar ratones de 8 semanas de edad con dicha dosis en forma intradérmica para lograr establecer un modelo crónico de infección. El resultado de esta infección fue la muerte del 53% de los ratones a diferencia de la infección de ratones de 16 semanas en donde el 100% sobrevivió, lo que nos indica que la edad de los ratones es un parámetro clave para la infección.

A los 100 días post infección se comenzó la administración de los distintos tratamientos. La formulación vacunal TSNT+ISPA se administró a los 100, 110 y 120 días post infección. El tratamiento con BZ comenzó al día 135 y de igual manera que lo descrito anteriormente: dosis orales y diarias de 100 mg Bz/ kg de ratón por 30 días consecutivos. Si bien en este modelo de infección se genera una parasitemia visible, a diferencia de lo ocurre con la cepa Sylvio X10/4, esta parasitemia solo se puede visualizar en la fase aguda de infección. Es por ello que se diseñó una qPCR para monitorear la carga de parásitos en sangre en estadios crónicos de infección. Para esta qPCR se planteó como estrategia utilizar como estándar interno un plásmido exógeno, como lo es pGEM-T, para relativizar la cuantificación de *T. cruzi* ya que la cantidad de células del huésped en sangre puede ser muy variable, especialmente en los casos de infección y tratamiento, a diferencia de lo ocurre en las qPCR de tejido cardíaco, en donde el estándar interno es un gen propio del ratón. Para la puesta a punto de esta técnica se siguió como referencia lo descrito en [215], en donde aplican como estándar interno un plásmido que contiene una secuencia de *Arabidopsis thaliana* para la cuantificación de *T. cruzi* en muestras de sangre de pacientes con Chagas crónico. Se observó que estas reacciones de qPCR utilizando pGEM-T como estándar interno nos permitió cuantificar pequeñas cantidades de *T. cruzi* y de dicho plásmido en las muestras de sangre de los ratones infectados con elevada sensibilidad y eficiencia (Figura 36). Todos los tratamientos aplicados lograron reducir el número de parásitos/ml de sangre, el cual se mantuvo a lo largo de los distintos días post infección (Figura 37A). El grupo que recibió el tratamiento mixto TSNT+Bz fue aquel que mostró diferencias significativas con respecto al PBS al punto final del experimento (día 260 post infección) (Figura 37B). Esta reducción del nivel de parásitos en sangre por parte de todos los tratamientos, incluidos el Bz nos demuestran que esta cepa de parásitos Tulahuen cl2 de DTU VI fue sensible a la acción quimioterapéutica de la droga, a diferencia de lo observado en el modelo de infección anterior.

Al día 273 post infección se finalizó el experimento, momento en el cual los ratones fueron anestesiados y sometidos a un estudio de ECG. En este modelo de infección crónica sí se han encontrado alteraciones en los parámetros de onda, como lo

son el complejo QRS y el intervalo QT, tal y como se había descrito en el trabajo previo de Eickhoff et al., 2010 [229] anteriormente citado. Se observó que los ratones sin tratar (grupo PBS) prolongaron la longitud de estos parámetros de onda, mientras que de los grupos tratados solo aquel que recibió el tratamiento mixto, TSNt+Bz, disminuyó estos parámetros significativamente, estableciendo valores muy similares al grupo sin infectar (Figura 38 AyB). Además, de este análisis se observó que el 100% de los ratones pertenecientes al grupo sin tratar PBS mostraron alteraciones en sus ECG en comparación con el grupo TSNt+Bz que no evidenció arritmias de ningún tipo (Figura 38C). Los grupos Bz y TSNt presentaron arritmias en un 80% y 60% de sus ECG respectivamente (Figura 38C), resultados similares a los obtenidos en la modelo experimental BALB/c- Sylvio X10/4. Esta gran reducción del porcentaje de alteraciones encontradas por parte del grupo TSNt+Bz concuerda con lo observado en el análisis de los parámetros de onda, ya que alteraciones en estos parámetros, en especial en el intervalo QT, están relacionados con problemas de conducción y de repolarización de ventrículos [248], lo que puede llevar a la aparición de extrasístoles supraventriculares, arritmia que fue encontrada en la mayoría de los grupos.

Las variaciones en el intervalo QT de un ECG han sido extensivamente estudiadas como marcadores de riesgo de arritmias ventriculares después de un infarto de miocardio [248] y en pacientes con fracciones de eyección del ventrículo izquierdo deprimida [249]. Para el caso de los pacientes que cursan una fase crónica de la enfermedad de Chagas y presentan una CCC se observó que dicho parámetro se encuentra prolongado debido al daño que sufre el corazón [250]. En un trabajo realizado con pacientes con CCC se estableció que aquellos que presentaban una falla en el ventrículo izquierdo, caracterizada por una baja fracción de eyección de este ventrículo evaluado por ecocardiograma, presentaban un intervalo QT más prolongado que aquellos que no mostraban problemas en dicho ventrículo [251]. En nuestro experimento observamos que el grupo TSNt+Bz no mostró alteraciones en dicho parámetro ni arritmias lo que nos demostraría, según los trabajos previos citados, que la función ventricular de dicho grupo

no estaría afectada. Sin embargo, estudios más complejos como ecocardiogramas deberían realizarse para corroborar dichas alteraciones.

Además de analizar la cardiopatía de los distintos grupos de ratones mediante ECG, también se estudió la carga parasitaria en corazón a los 260 días post infección. Los resultados obtenidos en este modelo de infección crónica fueron muy similares a los obtenidos con BALB/c- Sylvio X10/4: la carga de parásitos fue muy baja pero se pudo observar que los grupos tratados mostraron una tendencia a disminuir dicha carga, en donde el grupo TSnt logró reducirla respecto al grupo PBS (Figura 39). El análisis del daño histopatológico de este modelo experimental no pudo completarse para presentar en este trabajo de tesis, ya que el experimento concluyó a principio de la pandemia generada por el virus SARS-Cov-2 y no se pudo acceder a un servicio a tercero que realice el preparado y la tinción de las muestras.

En base a los resultados obtenidos en los dos modelos de infección crónica evaluados, se pudo observar que el empleo de una cepa no virulenta como Sylvio X10/4 no originó mortalidad en los ratones, provocó el desarrollo de anticuerpos a largo plazo y lesiones histológicas así como algún tipo de cardiopatía cualitativa. Sin embargo, no produjo lesiones en corazón cuantificables mediante ECG, a comparación del modelo que empleó la cepa virulenta Tulahuen cl2. Ambos modelos han proporcionado resultados que apuntan en una misma dirección pero con diferencias teniendo en cuenta en particular que la cepa Tulahuen cl2 mostró mayor sensibilidad al tratamiento con Bz y presentó, además, alteraciones de ECG cuantificables. Es por esta razón que se puede concluir que el mejor modelo de infección crónica para evaluar la eficacia de nuestra formulación vacunal fue aquel que empleó la cepa virulenta Tulahuen cl2 ya que, si bien una dosis de 1.000 Tulahuen cl2 inoculados por vía intradérmica originó un elevado porcentaje de mortalidad, mostró ser sensible al parasiticida Bz y ser capaz de generar lesiones en corazón detectables por ECG. Sin embargo, una optimización de dicho modelo de infección debería realizarse para lograr reducir la mortalidad de los ratones en la fase aguda de infección sin perder la magnitud de lesiones detectadas en corazón en la fase crónica de infección. Actualmente, nuestro grupo de trabajo está evaluando un nuevo

modelo basado en la cepa CL Brenner obtenida por cultivo de células que permita una menor mortalidad. Asimismo estamos evaluando el uso de tripomastigote de cultivo de la cepa Tulahuen cl2 que resultan menos virulentos que aquellos propagados *in vivo*. Otra alternativa que evaluaremos es el uso del modelo BALB/c- Tulahuen cl2 mediante infección oral. Este modelo, que ha desarrollado el grupo de la Dra Ana Rosa Perez en el Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario, permite 100% de supervivencia y genera lesiones histológicas en la fase crónica de infección (Manuscrito en preparación).

En relación a los tratamientos aplicados en la fase crónica de ambos modelos de infección observamos que nuestra formulación vacunal TSnt+ISPA mostró ser un candidato promisorio para ser aplicado como vacuna terapéutica ya que logró reducir la parasitemia en sangre y el porcentaje de arritmias en los dos modelos de infección crónica. El tratamiento con el parasiticida Bz, en cambio, solo mostró ser capaz de reducir el número de parásitos/ml de sangre en el modelo BALB/c- Tulahuen cl2, pero no demostró mejorar las alteraciones halladas en los ECG. Por otra parte, el tratamiento mixto TSnt+Bz mostró una gran sinergia, alcanzando los valores más bajos de parasitemia en sangre y no mostró alteraciones en los ECG, comportándose como el grupo sin infectar. Sin embargo, este tratamiento mixto solo mostró sinergia en el modelo de infección BALB/c-Tulahuen cl2, lo que podría deberse a la falta de sensibilidad observada del *T. cruzi* Sylvio X10/4 hacia el Bz. Este resultado plantea la pregunta de si la aplicación conjunta de la formulación vacunal y el Bz, tienen un efecto inmunomodulador generando una respuesta inmune reguladora/efectora balanceada óptima para controlar el daño originado por *T. cruzi*. Un estudio de la respuesta inmune celular generada por dicho tratamiento está en marcha para responder a esa pregunta.

2. V) Conclusiones parciales:

- ✓ La formulación vacunal TSNT-ISPA mostró resultados promisorios al ser aplicada como vacuna terapéutica en ambos modelos crónicos evaluados, ya que permitió: disminuir el porcentaje de ratones positivos para la presencia de *T. cruzi* en sangre evaluado por PCR en el modelo BALB/c-Sylvio X10/4 y el nivel de parásitos analizado por qPCR en el modelo BALB/c-Tulahuen (aunque no con diferencias significativas respecto al grupo control PBS); reducir el porcentaje de arritmias encontradas en ambos modelos crónicos (33% de arritmias en el modelo BALB/c-Sylvio y del 60% en el modelo BALB/c-Tulahuen vs 100% de arritmias del grupo PBS en ambos modelos de infección) y disminuyó el *score* de daño histológico en corazón.
- ✓ Por otra parte, la aplicación de la droga parasiticida Bz sola no mostró disminuir la parasitemia en el modelo BALB/c- Sylvio X10/4, pero sí el nivel de parásitos en sangre evaluado por qPCR en el modelo BALB/c-Tulahuen cl2 (aunque no con diferencias significativas respecto al grupo control PBS). Tampoco disminuyó el porcentaje de arritmias evaluado en ambos modelos crónicos ni el *score* de daño histológico evaluado en el modelo BALB/c-Sylvio X/10/4.
- ✓ El empleo del tratamiento combinado TSNT+Bz mostró sinergia, en donde se obtuvo el menor porcentaje de ratones positivos (66%) en la evaluación de *T. cruzi* en sangre por PCR en el modelo BALB/c-Sylvio X10/4 y el menor nivel de parásitos analizado por qPCR en el modelo BALB/c- Tulahuen cl2 con diferencias significativas respecto al PBS. Se observó que este grupo tuvo un 40% de arritmias en el modelo BALB/c-Sylvio X10/4 y un 0% de arritmias en el modelo BALB/c-Tulahuen y que fue el único grupo en el cual sus ratones mostraron una reducción

de los parámetros de onda QRS y QTc de los ECG, con valores similares al grupo sin infectar.

Conclusiones:

Como conclusiones generales de este trabajo de tesis podemos mencionar que:

- De todos los antígenos evaluados como candidatos para vacunas profilácticas contra el *T. cruzi* (TSNt, TSf, CP3 y ASP2), el antígeno TSNt fue el que confirió la mayor protección alcanzando porcentajes de supervivencia de alrededor del 100%-60% y disminuyendo el desarrollo de síntomas evaluados mediante el *score* clínico.
- De las diferentes mezclas de antígenos ensayadas (TSf+CP3, TSNt+TSf, TSNt+TSf+ASP2) como vacunas profilácticas contra el *T. cruzi* solo la mezcla de los fragmentos TSNt+TSf mostró los mayores porcentajes de supervivencia (80-100%), la menor parasitemia en sangre y los valores más bajos de *score* clínico. El agregado de la proteína CP3 al fragmento TSf no mejoró el desempeño que alcanzaron dichas proteínas por separado. Con respecto a la incorporación de ASP2 a la mejor formulación vacunal conseguida TSNt+TSf, no presentó complementación ni sinergia, sino que empeoró los resultados obtenidos, disminuyendo la supervivencia del grupo TSNt+TSf del 80% al 20% alcanzando los valores más altos de parasitemia y *score* clínico.
- Con respecto a la evaluación de nuestra formulación vacunal como tratamiento en una infección crónica por *T. cruzi*, se obtuvo que la aplicación de TSNt-ISPA mostró resultados muy promisorios, mejorando el tratamiento con Bz solo, ya que permitió disminuir la parasitemia en sangre en ambos modelos de infección crónica, redujo el porcentaje de arritmias encontradas en la evaluación de los ECG (33% de arritmias en el modelo BALB/c-Sylvio X10/4 y del 60% en el modelo BALB/c-Tulahuen cl2 vs 100% de arritmias del grupo PBS en ambos modelos de infección) y disminuyó con tendencia significativa el *score* de daño histológico en

corazón en los dos modelos ensayados. La aplicación del parasiticida Bz, en cambio, no mostró disminuir la parasitemia en sangre en el modelo BALB/c-Sylvio, pero sí en el modelo BALB/c-Tulahuen cl2 (aunque no con diferencias significativas respecto al grupo control PBS). Tampoco disminuyó el porcentaje de arritmias evaluado en ambos modelos crónicos ni el score de daño histológico evaluado en el modelo BALB/c-Sylvio.

- El empleo del tratamiento combinado TSnt+Bz mostró sinergia ya que permitió obtener los valores más bajos de parasitemia en ambos modelos de infección, disminuir el porcentaje de arritmias halladas (40% en el modelo BALB/c-Sylvio X10/4 y un 0% en el modelo BALB/c-Tulahuen cl2) y que fue el único tratamiento ensayado que logró disminuir los parámetros de onda QRS y QTc de los ECG, con valores similares al grupo sin infectar.

Bibliografía:

- [1] R. E. Bernstein (1984) "Darwin's illness: Chagas' disease resurgens.," *J R Soc Med*, vol. 77, no. 7, pp. 608–609.
- [2] "Enfermedad de Chagas - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud," (2020). <http://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>.
- [3] "La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)," (2020). [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- [4] "World Chagas Disease Day: bringing a forgotten disease to the fore of global attention," (2020). <https://www.who.int/news/item/14-04-2020-world-chagas-disease-day-bringing-a-forgotten-disease-to-the-fore-of-global-attention>.
- [5] OPS/Argentina, "OPS/OMS Argentina - Encuentro Nacional de Chagas: Argentina actualiza estrategia para lograr la eliminación de la transmisión | OPS/OMS," *Pan American Health Organization / World Health Organization*, (2019). https://www.paho.org/arg/index.php?option=com_content&view=article&id=10343:encuentro-nacional-de-chagas-argentina-actualiza-estrategia-para-lograr-la-eliminacion-de-la-transmision&Itemid=226).
- [6] J Henriksson, L Åslund, U Pettersson (1996) Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* (12): 108–114
- [7] RT Souza, FM Lima, RM Barros, DR Cortez, MF Santos, E M Cordero, JC Ruiz, S Goldenberg, MMG Teixeira, JF da Silveira (2011) Genome Size, Karyotype Polymorphism and Chromosomal Evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 6 (8).
- [8] JL Reis-Cunha, GF Rodrigues-Luiz, HO Valdivia, RP Baptista, TA Mendes, GL de Morais, R Guedes, AM Macedo, C Bern, RH Gilman, CT Lopez, B Andersson, AT Vasconcelos, DC Bartholomeu (2015). Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *BMC genomics*, 16(1): 499.

- [9] B Zingales, SG Andrade, MRS Briones, DA Campbel, E Chiari, O Fernandes, F Guh, E Lages-Silva, AM Macedo, CR Machado, MA Miles, AJ Romanha, NR Sturm, M Tibayrenc, AG Schijman (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (7): 1051–1054.
- [10] B Zingales, MA Miles, DA Campbell, M Tibayrenc, AM Macedo, MM Teixeira, AG Schijman, MS Llewellyn, E Lages-Silva, CR Machado, SG Andrade, NR Sturm (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12(2):240-53.
- [11] L Lima, O Espinosa-Álvarez, PA Ortiz, JA Trejo-Varón, JC Carranza, CM Pinto, MG Serrano, GA Buck, EP Camargo, MM Teixeira (2015) Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* 151:166-77.
- [12] NL Grosso, J Bua, AE Perrone, MN Gonzalez, PL Bustos, M Postan, LE Fichera (2010) *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of a isolate from an endemic area and its susceptibility to conventional drugs. *Exp Parasitol* 126(2):239-44.
- [13] B Zingales (2018) *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica* 184: 38–52.
- [14] ML Bizai, R Peralta, A Simonetto, LV Olivera, EE Arias, J Dalla Costa, S Manattini, W Sione, D Fabbro, C Diez (2020) Geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes detected in chronic infected people from Argentina. Association with climatic variables and clinical manifestations of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 78:104-128.
- [15] IA Bontempi, ML L Bizai, S Ortiz, S Manattini, D Fabbro, A Solari, C Diez (2016) Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units

- in single and mixed infections from human blood samples. *Infection, Genetics and Evolution* 43: 123–129.
- [16] MP Fernánde, MC Cecere, LA Lanati, MA Lauricella, AG Schijman, RE Gürtler, MV Cardinal (2014) Geographic variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units from *Triatoma infestans* at different spatial scales. *Acta Trop* 140:10-8.
- [17] JA Pérez-Molina, I Molina (2018) Chagas disease. *The Lancet* 10115 (391): 82–94.
- [18] C Bern (2015) Chagas' Disease. *N Engl J Med* 373 (5): 456–466, Jul. 2015.
- [19] R Watanabe Costa, JF da Silveira, D Bahia (2016) Interactions between *Trypanosoma cruzi* Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. *Front Microbiol* (7).
- [20] E Barrias, L Reignault, TMU de Carvalho, W de Souza (2019) Clathrin coated pit dependent pathway for *Trypanosoma cruzi* internalization into host cells. *Acta Tropica* (199): 105057.
- [21] FY Maeda, C Cortez, N Yoshida (2012) Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Front Immunol* (3): 361.
- [22] BN Salassa, PS Romano. (2019) Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence* 10 (1):4 60–469.
- [23] JA Cueto, MC Vanrell, BN Salassa, S Nola, T Galli, MI Colombo, PS Romano (2017) Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required during *Trypanosoma cruzi* parasitophorous vacuole development. *Cell Microbiol.* 19(6).
- [24] ES Barrias, TMU de Carvalho, W De Souza (2013) *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol* 4.
- [25] MN Garcia, D Aguilar, R Gorchakov, SN Rossmann, SP Montgomery, H Rivera, L Woc-Colburn, PJ Hotez, KO Murray (2015) Evidence of autochthonous Chagas disease in southeastern Texas. *Am J Trop Med Hyg* 92(2):325-30.
- [26] MN Garcia, D Hernandez, R Gorchakov, KO Murray, PJ Hotez (2015) The 1899 United States Kissing Bug Epidemic. *PLoS Negl Trop Dis* 9(12).

- [27] AL Carbajal-de-la-Fuente, YM Provecho, MDP Fernández, MV Cardinal, P Lencina, C Spillmann, RE Gürtler (2017) The eco-epidemiology of *Triatoma infestans* in the temperate Monte Desert ecoregion of mid-western Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112(10):698-708.
- [28] JA de Fuentes-Vicente, AE Gutiérrez-Cabrera, AL Flores-Villegas, C Lowenberger, G Benelli, PM Salazar-Schettino, A Córdoba-Aguilar (2018) What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Acta Trop*: 183:23-31.
- [29] “GeoVin: una app para reportar la presencia de vinchucas y aprender sobre ellas,” *Argentina.gob.ar* (2018) <https://www.argentina.gob.ar/noticias/geovin-una-app-para-reportar-la-presencia-de-vinchucas-y-aprender-sobre-ellas>.
- [30] KFC Lidani, FA Andrade, L Bavia, FS Damasceno, MH Beltrame, IJ Messias-Reason, TL Sandri (2019) Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health* 7:166.
- [31] J Ries, A Komarek, J Gottschalk, B Brand, L Amsler, M Jutzi, BM Frey (2016) A Case of Possible Chagas Transmission by Blood Transfusion in Switzerland. *Transf. med. and hem* 43(6), 415–417.
- [32] U Kemmerling, A Osuna (2019) Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Review About the Interactions Between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses. *Front. in Microb.* 10: 15.
- [33] PL Bustos, N Milduberger, BJ Volta, AE Perrone, SA Laucella, J Bua (2019) *Trypanosoma cruzi* Infection at the Maternal-Fetal Interface: Implications of Parasite Load in the Congenital Transmission and Challenges in the Diagnosis of Infected Newborns. *Front. Microbiol* 10: 1250.
- [34] Y Carlier, S Sosa-Estani, A O Luquetti, P Buekens (2015) Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110 (3):3 63–368.
- [35] MD Lewis, A F Francisco, S Jayawardhana, H Langston, MC Taylor, J M Kelly (2018) Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. *Sci Rep* 8.

- [36] K Rueda, JE Trujillo, JC Carranza, GA Vallejo (2014) Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: un nuevo escenario epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *biomedica* 34 (4).
- [37] MT Filigheddu, M Górgolas, JM Ramos (2017) Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Medicina Clínica* 148 (3): 125–131.
- [38] AA Nóbrega, MH Garcia, E Tatto, MT Obara, E Costa, J Sobel, WN. Araujo (2009) Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15 (4).
- [39] JF Ríos, M Arboleda, AN Montoya, EP Alarcón, GJ Parra-Henao (2011) Probable brote de transmisión oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia. *biomedica* 31 (2): 185.
- [40] R Labello Barbosa, VL Dias, ES Lorosa, E de Góes Costa, KS Pereira, R Gilioli, AMA Guaraldo, LAC Passos (2019) Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir in in natura açaí pulp resulting in food-borne acute Chagas disease at Pará State, Brazil. *Exp Parasitol* 197:68-75.
- [41] J Barreto-de-Albuquerque, D Silva-dos-Santos, AR Pérez, LR Berbert, E de Santanavan-Vliet, DA Farias-de-Oliveira, OC Moreira, E Roggero, CE de Carvalho-Pinto, J Jurberg, V Cotta-de-Almeida, O Bottasso, W Savino, J de Meis (2015) *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLoS Negl Trop Dis* 19;9(6).
- [42] HR Esper, VLT Freitas, JGPL Assy, EY Shimoda, OCP Berreta, MH Lopes, FOS França (2019) Fatal evolution of acute Chagas disease in a child from Northern Brazil: factors that determine poor prognosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6 (61:e27).
- [43] BA de Noya, ON González (2015) An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop.* 151: 94–102.
- [44] C Gomes, AB Almeida, AC Rosa, PF Araujo, ARL Teixeira (2019) American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. *Inter. J. of Inf. Dis* (81): 81–84.

- [45] DL Martin, KR Lowe, T McNeill, EA Thiele, DM Roellig, J Zajdowicz, SA Hunter, SA Brubaker (2015) Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop* 149:15-8.
- [46] M Ribeiro, N Nitz, C Santana, A Moraes, L Hagström, R Andrade, A Rios, A Sousa, B Dallago, R Gurgel-Gonçalves, M Hecht (2016) Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol*. 162:1-6.
- [47] A Rios, M Ribeiro, A Sousa, F Pimentel, L Hagström, R Andrade, RM Alves, A Cássia Rosa, ARL Teixeira, N Nitz, M M Hecht (2018) Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*?. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113(1): 3–8.
- [48] P Araujo, AB Almeida, CF Pimentel, AR Silva, A Sousa, S A Valente, V C Valente, MM Britto, AC Rosa, RM Alves, L Hagström, ARL Teixeira (2017) Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 12 (6): 437–446.
- [49] LH Malik, GD Singh, EA Amsterdam (2015) Chagas Heart Disease: An Update. *Am J Med* 28 (11):7–9.
- [50] JD Stanaway, G Roth (2015) The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. *gh* 10 (3):139.
- [51] JR Coura, J Borges-Pereira (2010) Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 115 (1–2): 5–13.
- [52] VRCD Santos, J Meis, W Savino, JAA Andrade, JRDS Vieira, JR Coura, ACV Junqueira (2018) Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113(5):e170298.
- [53] AG Schijman (2018) Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 184: 59–66.
- [54] MP Barrett, RJ Burchmore, A Stich, JO Lazzari, AC Frasch, JJ Cazzulo, S Krishna (2003) The trypanosomiasis. *Lancet* 362(9394):1469-80.
- [55] J Guarner (2019) Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Sem Diag Pat* 36 (3):164–169.

- [56] MC Fernandes, NW Andrews (2012) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Rev* 36 (3):734–747.
- [57] KM Bonney, DJ Luthringer, SA Kim, NJ Garg, DM Engman (2019) Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis* 14 (1): 421–447.
- [58] S Jabari, EC de Oliveira, A Brehmer, ABM da Silveira (2014) Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. *Histochem Cell Biol* 142 (3):235–244.
- [59] GR Acevedo, MC Girard, KA Gómez (2018) The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Front. Immunol.* 9: 1929.
- [60] MA Campos, IC Almeida, O Takeuchi, S Akira, EP Valente, DO Procópio, LR Travassos, JA Smith, DT Golenbock, RT Gazzinelli (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167(1):416-23.
- [61] FM Cerbán, CC Stempin, X Volpini, EA Carrera Silva, S Gea, C. Motran (2020) Signaling pathways that regulate *Trypanosoma cruzi* infection and immune response. *BBA* 1866 (5): 165707.
- [62] AC Oliveira, JE Peixoto, LB de Arruda, MA Campos, RT Gazzinelli, DT Golenbock, S Akira, JO Previato, L Mendonça-Previato, A Nobrega, M Bellio M (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 173(9):5688-96.
- [63] BC Caetano, BB Carmo, MB Melo, A Cerny, SL dos Santos, DC Bartholomeu, DT Golenbock, RT Gazzinelli (2011) Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 187(4):1903-11.
- [64] GM Clay, FS Sutterwala, ME Wilson (2014) NLR proteins and parasitic disease. *Immunol Res* 59 (1–3): 142–152.
- [65] AF Paroli, PV Gonzalez, C Díaz-Luján, LI Onofrio, A Arocena, RC Cano, EA Carrera-Silva, S Gea (2018) NLRP3 Inflammasome and Caspase-1/11 Pathway Orchestrate

- Different Outcomes in the Host Protection Against *Trypanosoma cruzi* Acute Infection. *Front Immunol* 9:913.
- [66] F Cardillo, JC Voltarelli, SG Reed, JS Silva (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun* 64(1):128–134.
- [67] T Lieke, C Steeg, SEB. Graefe, B Fleischer, T Jacobs (2006) Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 145 (2): 357–364.
- [68] RT Gazzinelli, IP Oswald, S Hieny, SL James, A Sher (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 22 (10): 2501–2506.
- [69] N Guiñazú, EA Carrera-Silva, MC Becerra, A Pellegrini, I Albesa, S Gea (2010) Induction of NADPH oxidase activity and reactive oxygen species production by a single *Trypanosoma cruzi* antigen. *Int J Parasitol* 40 (13): 1531–1538.
- [70] M Lopez, HB Tanowitz, NJ Garg (2018) Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. *Curr Clin Micro Rpt* 5 (1):45–54.
- [71] M Breitkreuz, N Hamdani (2015) A change of heart: oxidative stress in governing muscle function. *Biophys Rev* 7 (3): 321–341.
- [72] J.J Wen, NJ Garg (2018) Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates the mitochondrial ROS production and oxidative damage in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 12 (7).
- [73] AD Pack, MH Collins, CS Rosenberg, RL Tarleton (2018) Highly competent, non-exhausted CD8+ T cells continue to tightly control pathogen load throughout chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Pathog*, 14 (11).
- [74] RL Tarleton, R Reithinger, JA Urbina, U Kitron, RE Gürtler (2007) The Challenges of Chagas Disease— Grim Outlook or Glimmer of Hope?. *PLoS Med* 4 (12)

- [75] MS Cardoso, JL Reis-Cunha, DC Bartholomeu (2016) Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front. Immunol.* 6.
- [76] DV Andrade, KJ Gollob, WO Dutra (2014) Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis* 8 (7).
- [77] AR Arocena, LI Onofrio, AV Pellegrini, AE Carrera Silva, A Paroli, RC Cano, MP Aoki, S Gea (2014) Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *Eur J Immunol* 44(1):184-94. d
- [78] G Cabrera, I Marcipar (2019) Vaccines and the regulatory arm of the immune system. An overview from the *Trypanosoma cruzi* infection model" *Vaccine* 37(28):3628–3637.
- [79] FB González, SR Villar, R Fernández Bussy, GH Martin, L Pérol, R Manarin, SV Spinelli, C Pilon, JL Cohen, OA Bottasso, E Piaggio, AR Pérez (2015) Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled *T. cruzi* infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3(+) T cells. *Brain Behav Immun* 45:219-32.
- [80] J Bermudez, CD, A Simonazzi, JP Real, S Palma (2016) Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica* 156:1–16.
- [81] PA Sales Junior, I Molina, SM Fonseca Murta, A Sánchez-Montalvá, F Salvador, R Corrêa-Oliveira, CM Carneiro (2017) Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am J Trop Med Hyg* 97(5):1289-1303.
- [82] CA Morillo, JA Marin-Neto, A Avezum, S Sosa-Estani, A Rassi, F Rosas, E Villena, R Quiroz, R Bonilla, SJ Connolly, S Yusuf (2015) BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 373(14):1295-306.
- [83] C Crespillo-Andújar, E Venanzi-Rullo, R López-Vélez, B Monge-Maillo, F Norman, A López-Polín, JA Pérez-Molina (2018) Safety Profile of Benznidazole in the Treatment of Chronic Chagas Disease: Experience of a Referral Centre and Systematic Literature Review with Meta-Analysis. *Drug Saf* 41(11):1035-1048.

- [84] CA Morillo, H Waskin, S Sosa-Estani, M Del Carmen Bangher, C Cuneo, R Milesi, M Mallagray, W Apt, J Beloscar, J Gascon, I Molina, LE Echeverria, H Colombo, JA Perez-Molina, F Wyss, B Meeks, LR Bonilla, P Gao, B Wei, M McCarthy, S Yusuf (2017) STOP-CHAGAS Investigators. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol*.69(8):939-947.
- [85] V Vetter, G Denizer, LR Friedland, J Krishnan, M Shapiro (2018) Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of Medicine* 50 (2):110–120.
- [86] E De Gregorio, R Rappuoli (2014) From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development *Nat Rev Immunol*. 14 (7): 505–514.
- [87] I Delany, R Rappuoli, E De Gregorio (2014) Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med* 6 (6):708–720.
- [88] “Plotkin’s Vaccines - 7th Edition,” (2017). <https://www.elsevier.com/books/T/A/9780323357616>.
- [89] S Awate, LA Babiuk, G Mutwiri (2013) Mechanisms of Action of Adjuvants. *Front. Immunol* 4.
- [90] LE Rios, JC Vázquez-Chagoyán, AO Pacheco, MP Zago, NJ Garg (2019) Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 200: 105168,
- [91] TP Monath, PFC Vasconcelos (2015) Yellow fever, *J Clin Virol*, 64: 160–173.
- [92] AL Cunningham, N Garçon, O Leo, LR Friedland, R Strugnell, B Laupèze, M Doherty, P Stern (2016) Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine* 34(52):6655-6664.
- [93] RP Deering, S Kommareddy, JB Ulmer, LA Brito, AJ Geall (2014) Nucleic acid vaccines: prospects for non-viral delivery of mRNA vaccines. *Expert Opin Drug Deliv*, 11(6):885–899.
- [94] U Sahin, A Muik, E Derhovanessian, I Vogler, LM Kranz, M Vormehr, A Baum, K Pascal, J Quandt, D Maurus, S Brachtendorf, V Lörks, J Sikorski, R Hilker, D Becker, AK Eller, J Grützner, C Boesler, C Rosenbaum, MC Kühnle, U Luxemburger, A

- Kemmer-Brück, D Langer, M Bexon, S Bolte, K Karikó, T Palanche, B Fischer, A Schultz, PY Shi, C Fontes-Garfias, JL Perez, KA Swanson, J Loschko, IL Scully, M Cutler, W Kalina, CA Kyratsous, D Cooper, PR Dormitzer, KU Jansen, O Türeci (2020) COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* 586(7830):594-599.
- [95] EJ Anderson, NG Roupael, AT Widge, LA Jackson, PC Roberts, M Makhene, JD Chappell, MR Denison, LJ Stevens, AJ Pruijssers, AB McDermott, B Flach, BC Lin, NA Doria-Rose, S O'Dell, SD Schmidt, KS Corbett, PA Swanson, M Padilla, KM Neuzil, H Bennett, B Leav, M Makowski, J Albert, K Cross, V V Edara, K Floyd, MS Suthar, DR Martinez, R Baric, W Buchanan, CJ Luke, VK Phadke, CA Rostad, JE Ledgerwood, JH Beigel (2020) mRNA-1273 Study Group. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med* 383(25):2427-2438.
- [96] B Ramezanpour, I Haan, A Osterhaus, E Claassen (2016) Vector-based genetically modified vaccines: Exploiting Jenner's legacy. *Vaccine*, 34(50):6436–6448,
- [97] "Sputnik V vaccine," (2020). <https://sputnikvaccine.com/esp/about-vaccine/> (accessed Dec. 21, 2020).
- [98] F. dos Santos Virgilio, C. Pontes, M. R. Dominguez, J. Ersching, M. M. Rodrigues, J. R. Vasconcelos (2014) CD8⁺ T Cell-Mediated Immunity during *Trypanosoma cruzi* Infection: A Path for Vaccine Development?. *Mediators of Inflammation*, 2014: 1–12.
- [99] O Rodríguez-Morales, V Monteón-Padilla, SC Carrillo-Sánchez, M Rios-Castro, M Martínez-Cruz, A Carabarin-Lima, M Arce-Fonseca (2015) Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. *J Immunol Res*. 2015:489758.
- [100] PJ Hotez (2018) The global fight to develop antipoverty vaccines in the anti-vaccine era. *Hum. Vac. & Imm* 14(9):2128–2131.
- [101] BY Lee, KM Bacon, AR Wateska, ME Bottazzi, E Dumonteil, PJ Hotez (2012) Modeling the economic value of a Chagas' disease therapeutic vaccine. *Hum Vac. Imm.*, 8 (9): 1293–1301.

- [102] BY Lee, KM Bacon, DL Connor, AM Willig, RR Bailey (2010) The Potential Economic Value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) Vaccine in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*, 4 (12).
- [103] BY Lee, KM Bacon, ME Bottazzi, P J Hotez (2013) Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Inf. Dis.*, 13 (4): 342–348.
- [104] S Gupta, B Salgado-Jiménez, N Lokugamage, JC Vázquez-Chagoyán, NJ Garg (2019) TcG2/TcG4 DNA Vaccine Induces Th1 Immunity Against Acute *Trypanosoma cruzi* Infection: Adjuvant and Antigenic Effects of Heterologous *T. rangeli* Booster Immunization. *Front. Immunol* 10: 1456.
- [105] E Dumonteil, C Herrera, P Buekens (2019) A therapeutic preconceptional vaccine against Chagas disease: A novel indication that could reduce congenital transmission and accelerate vaccine development. *PLoS Negl Trop Dis* 13 (1): e0006985.
- [106] E Dumonteil, ME Bottazzi, B Zhan, MJ Heffernan, K Jones, JG Valenzuela, S Kamhawi, J Ortega, SP de Leon Rosales, BY Lee, KM Bacon, B Fleischer, BT Slingsby, MB Cravioto, R Tapia-Conyer, PJ Hotez (2012) Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines* 11(9):1043-55.
- [107] E Dumonteil, J Escobedo-Ortegon, N Reyes-Rodriguez, A Arjona-Torres, MJ Ramirez-Sierra (2004) Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infection with DNA Vaccines in Mice. *Infect Immun*, 72 (1): 46–53.
- [108] S Gupta, C Smith, S Auclair, ADJ Delgadillo, NJ Garg (2015) Therapeutic Efficacy of a Subunit Vaccine in Controlling Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease Is Enhanced by Glutathione Peroxidase Over-Expression. *PLoS ONE*, 10 (6).
- [109] AY Limon-Flores, R Cervera-Cetina, JL Tzec-Arjona, L Ek-Macias, G Sánchez-Burgos , MJ Ramirez-Sierra, JV Cruz-Chan, NR VanWynsberghe, E Dumonteil (2010) Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine* 28(46):7414-9.

- [110] H Zapata-Estrella, C Hummel-Newell, G Sanchez-Burgos, J Escobedo-Ortegon, MJ Ramirez-Sierra, A Arjona-Torres, E Dumonteil (2006) Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunol Lett.* 103(2):186-91. [111] R. L. Tarleton, "CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection," *Semin Immunopathol*, 37(3): 233–238.
- [112] SP Kurup, RL Tarleton (2013) Perpetual expression of PAMPs necessary for optimal immune control and clearance of a persistent pathogen. *Nat Commun*, vol. 4, p. 2616.
- [113] T Williams, I Guerrero-Ros, Y Ma, F Matos Dos Santos, PE Scherer, R Gordillo, A Horta, F Macian, LM Weiss, H Huang (2020) Induction of Effective Immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 88(4):e00908-19.
- [114] FJ Sánchez-Valdéz, C Pérez Brandán, A Ferreira, MÁ Basombrío. Gene-deleted live-attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as vaccines to protect against Chagas disease. *Expert Rev Vaccines*, 14 (5): 681–697.
- [115] C Pérez Brandan, MÁ Basombrío (2012) Genetically attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as a potential vaccination tool. *Bioengineered* 3(4): 242–246.
- [116] U Galili (2013) Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogeneses and clinical benefits. *Immun.* 140(1):1-11.
- [117] S Portillo, BG Zepeda, E Iniguez, JJ Olivas, NH Karimi, OC Moreira, AF Marques, K Michael, RA Maldonado, IC Almeida (2019) A prophylactic α -Gal-based glycovaccine effectively protects against murine acute Chagas disease. *NPJ Vaccines* 4:13.
- [118] AE Bivona, AS Alberti, N Cerny, SN Trinitario, EL Malchiodi (2020) Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-mediated control. *BBA* 1866 (5):165658.
- [119] I Quintana, M Espariz, SR Villar, FB González, MF Pacini, G Cabrera, I Bontempi, E Prochetto, J Stülke, AR Perez, I Marcipar, V Blancato, C Magni (2018) Genetic Engineering of *Lactococcus lactis* Co-producing Antigen and the Mucosal Adjuvant

- 3' 5'- cyclic di Adenosine Monophosphate (c-di-AMP) as a Design Strategy to Develop a Mucosal Vaccine Prototype. *Front Microbiol* 9:2100.
- [120] I Bontempi, K Leal, E Prochetto, G Díaz, G Cabrera, A Bortolotti, HR Morbidoni, S Borsuk, O Dellagostin, I Marcipar (2020) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG is a promising platform to develop vaccines against *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Exp Immunol*. 201(3):306-316.
- [121] KM Bonney, DM Engman (2008) Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?. *Curr Mol Med* 8(6):510–518.
- [122] JS Leon, DM Engman (2003) The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci*, 8: e315-322.
- [123] JC Vázquez-Chagoyán, S Gupta, NJ Garg (2011) Vaccine Development Against *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. *Adv. in Paras.* 5: 121–146.
- [124] I Marcipar, C Lagier (2012) Advances in Serological Diagnosis of Chagas' Disease by Using Recombinant Proteins. *Curr Top in Trop Medic* A. Rodriguez-Morales, Ed. InTech.
- [125] Da Silveira, GS Paranhos, PC Cotrim, RA Mortara, ME Camargo, A Rassi, J Wanderley, R Corral, HL Freilij, S Grinstein (1990) Antigens de *Trypanosoma cruzi* with clinical interest cloned and expressed in *Escherichia coli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 85(4):507-11.
- [126] N Garg, MP Nunes, RL Tarleton (1997) Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *J Immunol*, 158(7):3293–3302.
- [127] LM De Pablos, A Osuna (2012) Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. *Infect. Immun.*, 80 (7):2258–2264.
- [128] NM El-Sayed, PJ Myler, DC Bartholomeu, D Nilsson, G Aggarwal, AN Tran, E Ghedin, EA Worthey, AL Delcher, G Blandin, SJ Westenberger, E Caler, GC Cerqueira, C Branche, B Haas, A Anupama, E Arner, L Aslund, P Attipoe, E Bontempi, F Bringaud, P Burton, E Cadag, DA Campbell, M Carrington, J Crabtree, H Darban, JF da Silveira, P de Jong, K Edwards, PT Englund, G Fazelina, T Feldblyum, M Ferella, AC Frasch, K

- Gull, D Horn, L Hou, Y Huang, E Kindlund, M Klingbeil, S Kluge, H Koo, D Lacerda, MJ Levin, H Lorenzi, T Louie, CR Machado, R McCulloch, A McKenna, Y Mizuno, JC Mottram, S Nelson, S Ochaya, K Osoegawa, G Pai, M Parsons, M Pentony, U Pettersson, M Pop, JL Ramirez, J Rinta, L Robertson, SL Salzberg, DO Sanchez, A Seyler, R Sharma, J Shetty, AJ Simpson, E Sisk, MT Tammi, R Tarleton, S Teixeira, S Van Aken, C Vogt, PN Ward, B Wickstead, J Wortman, O White, CM Fraser, KD Stuart, B Andersson (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *309(5733):409-15*.
- [129] GH Fontanella, K De Vusser, W Laroy, L Daurelio, AL Nocito, S Revelli, R Contreras (2008) Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate. *Vaccine*. *26(19):2322-34*.
- [130] I Bontempi, P Fleitas, A Poato, M Vicco, L Rodeles, E Prochetto, G Cabrera, B Beluzzo, D Arias, A Racca, S Guerrero, I Marcipar (2017) Trans-sialidase overcomes many antigens to be used as a vaccine candidate against *Trypanosoma cruzi*. *Immunotherapy*. *9(7):555-565*.
- [131] W. Colli (1992) *Trans* -sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB j*, *7(13):1257–1264*.
- [132] L. Freire-de-Lima, L. Fonseca, T. Oeltmann, L. Mendonça-Previato, J. Previato (2015) The *trans* -sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology*, *25(11):1142–1149*.
- [133] LM da Fonseca, KM da Costa, VS Chaves, CG Freire-de-Lima, A Morrot, L Mendonça-Previato, JO Previato, Freire-de-Lima L (2019) Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma Cruzi* Trans-sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. *Front Immunol* *6;10:164*.
- [134] J. A. Bueren-Calabuig, G. Pierdominici-Sottile, A. E. Roitberg (2014) Unraveling the differences of the hydrolytic activity of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and *Trypanosoma rangeli* sialidase: a quantum mechanics-molecular mechanics modeling study. *J Phys Chem B* *118(22):5807–5816*.

- [135] A. Buschiazzo, R. Muiá, N. Larrieux, T. Pitcovsky, J. Mucci, O. Campetella (2012) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathog*, 8(1):p. e1002474.
- [136] G. D. Pollevick, J. L. Affranchino, A. C. Frasch, D. O. Sánchez (1991) The complete sequence of a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 47(2):247–250.
- [137] LM Freitas, SL dos Santos, GF Rodrigues-Luiz, TA Mendes, TS Rodrigues, RT Gazzinelli, SM Teixeira, RT Fujiwara, DC Bartholomeu (2011) Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One*. 6(10):e25914.
- [138] O. Campetella, C. A. Buscaglia, J. Mucci, M. S. Leguizamón (2020) Parasite-host glycan interactions during *Trypanosoma cruzi* infection: trans-Sialidase rides the show. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1866 (5): 165692.
- [139] CA Pascuale, JM Burgos, M Postan, AB Lantos, A Bertelli, O Campetella, MS Leguizamón (2017) Inactive trans-Sialidase Expression in iTS-null *Trypanosoma cruzi* Generates Virulent Trypomastigotes. *Front Cell Infect Microbiol* 7:430.
- [140] AB Lantos, G Carlevaro, B Araoz, P Ruiz Diaz, M Camara, CA Buscaglia, M Bossi, H Yu, X Chen, CR Bertozzi, J Mucci, O Campetella (2016). Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology. *PLoS pathogens*, 12(4)
- [141] AFFR Nardy, C. G. Freire-de-Lima, A. R. Pérez, A. Morrot (2016) Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Front. Microbiol.* 7.
- [142] M. S. Leguizamón, E. Mocetti, H. García Rivello, P. Argibay, O. Campetella (1999) Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. *J Infect Dis* 180(4): 1398–1402.

- [143] J. Mucci, M. G. Risso, M. S. Leguizamon, A. C. C. Frasc, O. Campetella (2006) The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. *Cell Microbiol* 8 (7): 1086–1095.
- [144] E. H. de Titto, F. G. Araujo (1998) Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. *Clinical Imm. Imm.* 46(1): 157–161
- [145] M. V. Tribulatti, J. Mucci, N. Van Rooijen, M. S. Leguizamón, O. Campetella (2006) The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun*, 73(1): 201–207.
- [146] L Freire-de-Lima, F Alisson-Silva, ST Carvalho, CM Takiya, MM Rodrigues, GA DosReis, L Mendonça-Previato, JO Previato, AR Todeschini (2010) *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8+ T cell responses. *The Journal of biological chemistry*, 285(18), 13388–13396.
- [147] P Ruiz Díaz, J Mucci, MA Meira, Y Bogliotti, D Musikant, S Leguizamón, O Campetella (2015). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase prevents elicitation of Th1 cell response via interleukin 10 and downregulates Th1 effector cells. *Infec. and imm.*, 83(5), 2099–2108.
- [148] D L Martin, DB Weatherly, SA Laucella, MA Cabinian, MT Crim, S Sllivan ,M Heiges, SH Craven, CS Rosenberg, MH Collins, A Sette, M Postan, RL Tarleton (2006) CD8+ T-Cell Responses to *Trypanosoma cruzi* Are Highly Focused on Strain-Variant trans-Sialidase Epitopes. *PLoS Pathog*, 2(8), p. e77.
- [149] C. S. Rosenberg, D. L. Martin, R. L. Tarleton (2010) CD8⁺ T Cells Specific for Immunodominant *Trans*-Sialidase Epitopes Contribute to Control of *Trypanosoma cruzi* Infection but Are Not Required for Resistance. *J.I.* 185 (1): 560–568.
- [150] M. M. Rodrigues, M. Ribeirão, V. Pereira-Chioccola, L. Renia, F. Costa (1999) Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun*, 67 (8): 3855–3863.

- [151] CS Eickhoff, X Zhang, JR Vasconcelos, RG Motz, NL Sullivan, K O'Shea, N Pozzi, D Gohara, J Blase, E Di Cera, DF Hoft (2016). Costimulatory Effects of an Immunodominant Parasite Antigen Paradoxically Prevent Induction of Optimal CD8 T Cell Protective Immunity. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005896.
- [152] IA Bontempi, MH Vicco, G Cabrera, SR Villar, FB González, EA Roggero, P Ameloot, N Callewaert, AR Pérez, IS Marcipar (2015) Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine*. 33(10):1274-83.
- [153] F. Costa, G. Franchin, V. L. Pereira-Chioccola, M. Ribeirão, S. Schenkman, and M. M. Rodrigues (1998) Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* 16(8):768–774.
- [154] Eickhoff CS, Vasconcelos JR, Sullivan NL, Blazevic A, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, Hoft DF (2011) Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*.5(3):e983.
- [155] A. Baz Morelli, D. Becher, S. Koernig, A. Silva, D. Drane, E. Maraskovsky (2012) ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases. *J Med Microbiol*, 61(7):935–943.
- [156] E Prochetto, C Roldán, IA Bontempi, D Bertona, L Peverengo, MH Vicco, LM Rodeles, AR Pérez, IS Marcipar, G Cabrera (2017) Trans-sialidase-based vaccine candidate protects against *Trypanosoma cruzi* infection, not only inducing an effector immune response but also affecting cells with regulatory/suppressor phenotype. *Oncotarget* 8(35):58003-58020.
- [157] B. Morein, K. Hu, K. Lövgren, E. D'Hondt (2007) New ISCOMs Meet Unsettled Vaccine Demands. *Vacc Adj Del Systems*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 191–222.
- [158] H.-X. Sun, Y. Xie, Y.-P. Ye (2009) ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine* 27(33): 4388–4401.

- [159] E. Maraskovsky, M. Schnurr, N. S. Wilson, N. C. Robson, J. Boyle, D. Drane, (2009) Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunol Cell Biol*, 87(5): 371–376.
- [160] D Bertona, N Pujato, I Bontempi, V Gonzalez, G Cabrera, L Gugliotta, D Hozbor, A Nicastro, L Calvinho, IS Marcipar (2017) Development and assessment of a new cage-like particle adjuvant. *J Pharm Pharmacol* 69(10):1293-1303.
- [161] J Bidart, C Kornuta, M Gammella, V Gnazzo, I Soria, C Langellotti, C Mongini, R Galarza, L Calvinho, G Lupi, V Quattrocchi, I Marcipar, P Zamorano (2020) A New Cage-Like Particle Adjuvant Enhances Protection of Foot-and-Mouth Disease Vaccine. *Front Vet Sci* 7:396.
- [162] E. Prochetto (2016) Obtención y evaluación preclínica de dos fracciones de la proteína trans-sialidasa para ser usados como subunidades en el desarrollo de vacunas contra el parásito. Trabajo de tesina. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe
- [163] LM Peverengo, V Garcia, LM Rodeles, D Mendicino, M Vicco, C Lagier, V Gonzalez, L Gugliotta, I Marcipar (2018) Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology* 145(12):1594-1599.
- [164] G Díaz (2019) Evaluación de antígenos de superficie de *Trypanosoma cruzi* para el diseño de una vacuna contra la enfermedad de Chagas. Encuentro de Jóvenes Investigadores- UNL, 2019.
- [165] S Blättner, S Das, K Paprotka, U Eilers, M Krischke, D Kretschmer, C Remmele, M Dittrich, T Müller, C Schuelein-Voelk, T Hertlein, MJ Mueller, B Huettel, R Reinhardt, K Ohlsen, T Rudel, MJ Fraunholz (2016) *Staphylococcus aureus* Exploits a Non-ribosomal Cyclic Dipeptide to Modulate Survival within Epithelial Cells and Phagocytes. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005857.
- [166] Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ (2012) Current understanding of immunity to

- Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol* 34(6):753-70.
- [167] A. C. C. Frasch (1994) Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitology* 108(S1): S37–S44.
- [168] J. F. da Silveira, E. S. Umezawa, A. O. Luquetti (2001) Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Par.* 17(6):286–291,
- [169] J. M. Di Noia, C. A. Buscaglia, C. R. De Marchi, I. C. Almeida, and A. C. C. Frasch (2002) A *Trypanosoma cruzi* Small Surface Molecule Provides the First Immunological Evidence that Chagas' Disease Is Due to a Single Parasite Lineage. *J of Expl Med*, 195 (4):401–413.
- [170] V Balouz, LJ Melli, R Volcovich, G Moscatelli, S Moroni, N González, G Ballering, M Bisio, A Ciocchini, CA Buscaglia, J Altcheh (2017) The Trypomastigote Small Surface Antigen from *Trypanosoma cruzi* Improves Treatment Evaluation and Diagnosis in Pediatric Chagas Disease. *J of clin microb* 55(12), 3444–3453.
- [171] GE Cánepa, MS Degese, A Budu, CRS Garcia, CA Buscaglia (2012) Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Bioch J* 444 (2):211–218.
- [172] IM Díaz Lozano, LM De Pablos, SA Longhi, MP Zago, AG Schijman, A Osuna (2017) Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. *Sci Rep* 7.
- [173] VRA Pereira, VMB Lorena, M Nakazawa, CF Luna, ED Silva, AGP Ferreira, MA Krieger, S Goldenberg, MBP Soares, EM Coutinho, R Correa-Oliveira, YM Gomes (2005) Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 96(3):154–161.

- [174] VRA Pereira, VMB Lorena, AFA Verçosa, ED Silva, AGP Ferreira, UR Montarroyos, AP Galvão Silva, YM Gomes (2003) Antibody isotype responses in Balb/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(6):823–825.
- [175] L Qin, PB Gilbert, L Corey, MJ. McElrath, SG Self (2007) A Framework for Assessing Immunological Correlates of Protection in Vaccine Trials. *J INFECT DIS* 196(9):1304–1312.
- [176] T Bhattacharyya, J Brooks, M Yeo, HJ Carrasco, MD Lewis, MS Llewellyn, MA Miles (2010) Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *Int J Parasitol.*40(8):921-8.
- [177] CR De Marchi, JM Di Noia, A Frasch, V Amato Neto, IC Almeida, CA Buscaglia (2011) Evaluation of a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Mucin-Like Antigen for Serodiagnosis of Chagas' Disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 18(11):1850–1855.
- [178] MLM Cámara, GE Cánepa, AB Lantos, V Balouz, H Yu, X Chen, O Campetella, J Mucci, CA Buscaglia (2017) The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates *Trypanosoma cruzi* infectivity and differentiation. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(8):e0005856.
- [179] F Tzelepis F, BC de Alencar, ML Penido, C Claser, AV Machado, O Bruna-Romero, RT Gazzinelli, MM Rodrigues (2008) Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J Immunol* 180(3):1737-48.
- [180] MH Magdesian, R Giordano, H Ulrich, MA Juliano, L Juliano, RI Schumacher, W Colli, MJ Alves (2001) Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J Biol Chem* 276(22):19382-9.
- [181] MH Magdesian, RR Tonelli, MR Fessel, MS Silveira, RI Schumacher, R Linden, W Colli, MJ Alves (2007) A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Cell Res.* 313(1):210-8.

- [182] RR Tonelli, AC Torrecilhas, JF Jacysyn, MA Juliano, W Colli, MJM. Alves (2011) *In vivo* infection by *Trypanosoma cruzi*: The conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. *Parasitology* 138(4):481–492.
- [183] AAR Teixeira, VCS de Vasconcelos, W Colli, MJM. Alves, RJ Giordano (2015) *Trypanosoma cruzi* Binds to Cytokeratin through Conserved Peptide Motifs Found in the Laminin-G-Like Domain of the gp85/Trans-sialidase Proteins. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9):e0004099.
- [184] GU Maier, JD Rowe, TW Lehenbauer, BM Karle, DR Williams, JD Champagne, SS Aly (2019) Development of a clinical scoring system for bovine respiratory disease in weaned dairy calves. *J Dairy Sci* 102(8):7329–7344.
- [185] L Metcalfe, M Chevalier, MP Tiberghien, E Jolivet, M Huňady, S Timothy, C Philippe-Reversat (2020) Efficacy of a live intranasal vaccine against parainfluenza type 3 and bovine respiratory syncytial virus in young calves with maternally derived antibodies. *Vet. record open*, 7(1), e000429.
- [186] J Mucci, A Hidalgo, E Mocetti, PF Argibay, MS Leguizamón, O Campetella (2002) Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6):3896–3901.
- [187] MG Risso, TA Pitcovsky, RL Caccuri, O Campetella, MS Leguizamón (2007) Immune system pathogenesis is prevented by the neutralization of the systemic *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* during severe infections. *Parasitology* 134(4):503–510.
- [188] HP Low, RL Tarleton (1997) Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. *Mol Biochem Parasitol* 88 (1–2):137–149.
- [189] AA Pan, D McMahan-Pratt (1989) A mastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein. *J Immunol* 143(3):1001–1008.

- [190] HP Low, MA Santos, B Wizel, RL Tarleton (1998) Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. *J Immunol* 160(4):1817-23.
- [191] AF Araújo, BC de Alencar, JR Vasconcelos, MI Hiyane, CR Marinho, ML Penido, SB Boscardin, DF Hoft, RT Gazzinelli, MM Rodrigues (2005) CD8+-T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect Immun.* 73(9):6017-25.
- [192] RP Barbosa, BG Filho, LI Dos Santos, PA Junior, PE Marques, RV Pereira, DC Cara, O Bruña-Romero, MM Rodrigues, RT Gazzinelli, AV Machado (2013) Vaccination using recombinants influenza and adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 are highly effective on protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One.* 8(4):e61795.
- [193] C Pontes Ferreira, LM Cariste, B Ferri Moraschi, B Ferrarini Zanetti, S Won Han, D Araki Ribeiro, A Vieira Machado, J Lannes-Vieira, RT Gazzinelli, JCR Vasconcelos (2019) CXCR3 chemokine receptor guides *Trypanosoma cruzi*-specific T-cells triggered by DNA/adenovirus ASP2 vaccine to heart tissue after challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 13(7):e0007597.
- [194] AV Machado, JE Cardoso, C Claser, MM Rodrigues, RT Gazzinelli, DO Bruna-Romero (2006) Long-Term Protective Immunity Induced Against *Trypanosoma cruzi* Infection After Vaccination with Recombinant Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 and Trans-Sialidase. . *Hum Gene Ther.*
- [195] MS Picchio, VR Sánchez, N Arcon, AS Soto, M Perrone Sabilia, MLA Aldirico, M Urrutia, R Moretta, IM Fenoy, A Goldman, V Martin (2018) Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and
- [196] B Dziadek, J Gatkowska, M Grzybowski, J Dziadek, K Dzitko, H Dlugonska (2012) *Toxoplasma gondii*: The vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. *Exp Paras* 131(1):133–138.

- [197] B Dziadek, J Gatkowska, A Brzostek, J Dziadek, K Dzitko, M Grzybowski, H Dlugonska (2011) Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of *Toxoplasma gondii* in murine models of experimental toxoplasmosis. *Vaccine* 29(4):821-30.
- [198] JM Burgos, MG Risso, SF Brenière, C Barnabé, O Campetella, MS Leguizamón (2013) Differential Distribution of Genes Encoding the Virulence Factor Trans-Sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units. *PLoS ONE* 8(3): e58967.
- [199] DB Weatherly, D Peng, RL Tarleton (2016) Recombination-driven generation of the largest pathogen repository of antigen variants in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 17 (1)729.
- [200] J Bustamante, R Tarleton (2015) Reaching for the Holy Grail: insights from infection/cure models on the prospects for vaccines for *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110(3): 445–451.
- [201] A Rassi, JA Marin, A Rassi (2017) Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112 (3): 224–235.
- [202] AD Kosinska, T Bauer, U Protzer (2017) Therapeutic vaccination for chronic hepatitis B. *Curr Opin Virol*, 23: 75–81.
- [203] AF Marques, MB da Silva, MAP Juliano, JE Munhõz, LR Travassos, CP Taborda (2008) Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect*, 10 (12–13):1251–1258.
- [204] M Barry, L Versteeg, Q Wang, J Pollet, B Zhan, F Gusovsky, ME Bottazzi, PJ Hotez, KM Jones (2019) A therapeutic vaccine prototype induces protective immunity and reduces cardiac fibrosis in a mouse model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 13(5):p. e0007413.

- [205] JM Bustamante, LM Bixby, RL Tarleton (2008) Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* 14(5):542–550.
- [206] MC Fernández, SM González Cappa, ME Solana (2010) *Trypanosoma cruzi*: Immunological predictors of benznidazole efficacy during experimental infection. *Experimental Parasitology* 124(2): 172–180.
- [207] SA Laucella, DP Mazliah, Ga Bertocchi, MG Alvarez, G Cooley, R Viotti, MC Albareda, B Lococo, M Postan, A Armenti, RL Tarleton (2009) Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. *Clin Infect Dis* 49(11):1675–1684.
- [208] J Mateus, E Pérez-Antón, P Lasso, A Egui, N Roa, B Carrilero, JM González, MC Thomas, CJ Puerta, MC López, A Cuéllar (2017) Antiparasitic Treatment Induces an Improved CD8+ T Cell Response in Chronic Chagasic Patients. *J Immunol* 198 (8): 3170-3180.
- [209] AD Kosinska, E Zhang, L Johrden, J Liu, PL Seiz, X Zhang, Z Ma, T Kemper, M Fiedler, D Glebe, O Wildner, U Dittmer, M Lu, M Roggendorf (2013) Combination of DNA prime--adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model. *PLoS Pathog* 9(6): e1003391.
- [210] CRF Marinho, DZ Bucci, MLZ Dagli, KRB Bastos, MG Grisotto, LR Sardinha, CRGM Baptista, CP Gonçalves, MR D'Império Lima, JM Álvarez (2004) Pathology Affects Different Organs in Two Mouse Strains Chronically Infected by a *Trypanosoma cruzi* Clone: a Model for Genetic Studies of Chagas' Disease. *IAI* 72(4):2350–2357.
- [211] M Postan, AW Cheever, JA Dvorak, JP McDaniel (1986) A histopathological analysis of the course of myocarditis in C3H/He mice infected with *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio-X10/4. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 80, no. 1, pp. 50–55, Jan. 1986, doi: 10.1016/0035-9203(86)90193-8.
- [212] M. Postan, JP McDaniel, JA Dvorak (1986) *Trypanosoma cruzi*: constancy of clone pathogenicity for inbred mice during long-term in vitro maintenance. *Trans of the R S of Trop Med and Hyg* 80(4): 659–662.

- [213] GF Mitchell, A Jeron, G Koren (1998) Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Ameri J of Phys-H and Circ Phys* 274(3):H747–H751.
- [214] KL Cummings, RL Tarleton (2003) Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol and Biochl Parasitology* 129 (1):53–59.
- [215] T Duffy, M Bisio, J Altcheh, JM Burgos, M Diez, MJ Levin, RR Favaloro, H Freilij, AG Schijman (2009) Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3 (4):p. e419.
- [216] CRF Marinho, LN Nuñez-Apaza, KR Bortolucia, AL Bombeiro, DZ Bucci, MG Grisotto, LR Sardinha, CE Jorquera, S Lira, MR D'Império Lima, JM Álvarez (2009) Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes and Infection* 11(13):1037–1045.
- [217] CRF Marinho, LN Nuñez-Apaza, R Martins-Santos, KRB Bastos, AL Bombeiro, DZ Bucci, LR Sardinha, MRD Lima, JM Álvarez (2007) IFN-g, But Not Nitric Oxide or Specific IgG, is Essential for the In vivo Control of Low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* Parasites. *Scand J Immunol*, 66(2–3): 297–308.
- [218] D Andrés, R Ceci, G Ranchilio, J Mitelman, IM Irurzun, EE Mola (2010) El papel de la fibrosis y su relación con la variabilidad de la frecuencia cardíaca en la enfermedad de Chagas. 3:6.
- [219] M Kaplinsk, M Jois, G Galdos-Cardenas, VR Rendell, V Shah, RQ Do, R Marcus, MS Pena, MC Abastoflor, C La Fuente, R Bozo, E Valencia, M Verastegui, R Colanzi, RH Gilman, C Bern (2015) Working Group on Chagas Disease in Bolivia and Peru. Sustained Domestic Vector Exposure Is Associated With Increased Chagas Cardiomyopathy Risk but Decreased Parasitemia and Congenital Transmission Risk Among Young Women in Bolivia. *Clin Infect Dis* 61(6):918-26.
- [220] IR Pereira, G Vilar-Pereira, V Marques, AA da Silva, B Caetano, OC Moreira, AV Machado, O Bruna-Romero, MM Rodrigues, RT Gazzinelli, J Lannes-Vieira (2015) A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine reprograms immune response and reverses chronic cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 11(1):e1004594.

- [221] JC Silverio, IR Pereira, MC Cipitelli, NF Vinagre, MM Rodrigues, RT Gazzinelli, J Lannes-Vieira (2012) CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 8(4):e1002645.
- [222] S Cencig, N Coltel, C Truyens, Y Carlier (2012) Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains," *Int J of Ant Ag* 40(6):527–532.
- [223] AF Francisco, S Jayawardhana, MC Taylor, MD Lewis, JM Kelly (2018) Assessing the Effectiveness of Curative Benznidazole Treatment in Preventing Chronic Cardiac Pathology in Experimental Models of Chagas Disease. *Ant Ag Chem*, 62(10):e00832-18.
- [224] AF Francisco, S Jayawardhana, MD Lewis, KL White, DM Shackleford, G Chen, J Saunders, M Osuna-Cabello, KD Read, SA Charman, E Chatelain, JM Kelly (2016) Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. *Sci Rep.* 6:35351.
- [225] CB Scarim, AR Ribeiro, JA da Rosa, CM Chin (2018) Response to different benznidazole doses in animal models of chronic phase Chagas disease: a critical review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 51 (2):133–140.
- [226] MJ Toledo, MT Bahia, CM Carneiro, OA Martins-Filho, M Tibayrenc, C Barnabé, WL Tafuri, M de Lana (2003) Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 47(1):223-30.
- [227] S Garcia, CO Ramos, JF Senra, F Vilas-Boas, MM Rodrigues, AC Campos-de-Carvalho, R Ribeiro-Dos-Santos, MB Soares (2005). Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(4):1521-8.
- [228] IR Pereira, G Vilar-Pereira, V Marques, AA da Silva, B Caetano, OC Moreira, AV Machado, O Bruna-Romero, MM Rodrigues, RT Gazzinelli, J Lannes-Vieira (2015) A

- human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine reprograms immune response and reverses chronic cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 11(1):e1004594.
- [229] CS Eickhoff, CT Lawrence, JE Sagartz, LA Bryant, AJ Labovitz, SS Gala, DF Hoft (2010) ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *J Parasitol.* 96(4):758-64.
- [230] L Zhang, RL Tarleton (1999) Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis,* 180 (2): 480–486.
- [231] JM Bustamante, HW Rivarola, AR Fernández, JE Enders, R Fretes, JA Palma, PA Paglini-Oliva (2002) *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. *Int J Parasitol.* 32(7):889-96.
- [232] MT Bahia, IM de Andrade, TA Martins, AF do Nascimento, LF Diniz, IS Caldas, A Talvani, BB Trunz, E Torreele, I Ribeiro (2012) Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6(11):e1870.
- [233] EM Jones, DG Colley, S Tostes, ER Lopes, CL Vnencak-Jones, TL McCurley (1992) A *Trypanosoma cruzi* DNA sequence amplified from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Trans Assoc Am Physicians* 105: 182–189, 1992.
- [234] J Santi-Rocca, F Fernandez-Cortes, C Chillón-Marinas, ML González-Rubio, D Martin, N Gironès, M Fresno (2017) A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Sci Rep.* 7(1):8893.
- [235] MD Lewis, AF Francisco, MC Taylor, H Burrell-Saward, AP McLatchie, MA Miles, JM Kelly (2014) Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cell Microbiol.* 16(9):1285-300.
- [236] MD Lewis, AF Francisco, MC Taylor, S Jayawardhana, JM Kelly (2016) Host and parasite genetics shape a link between *Trypanosoma cruzi* infection dynamics and chronic cardiomyopathy. *Cel Microb* 18(10):1429–1443.
- [237] GS Mann, AF Francisco, S Jayawardhana, MC Taylor, MD Lewis, F Olmo, EO de Freitas, FMS Leoratti, C López-Camacho, A Reyes-Sandoval, JM Kelly (2020) Drug-

- cured experimental *Trypanosoma cruzi* infections confer long-lasting and cross-strain protection. *PLoS Negl Trop Dis*. 14(4):e0007717.
- [238] LS Filardi, Z Brener (1987) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans of the Royal Soc of Trop Med and Hyg* 81(5): 755–759.
- [239] AM Mejía-Jaramillo, GJ Fernández, L Palacio, O Triana-Chávez (2011) Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors* 4: 169
- [240] SR Wilkinson, MC Taylor, D Horn, JM Kelly, I Cheeseman (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(13):5022–5027.
- [241] HM Andrade, SMF Murta, A Chapeaurouge, J Perales, P Nirdé, AJ Romanha (2008) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J Proteome Res*, 7(6): 2357–2367.
- [242] SM Murta, FB Nogueira, PF Dos Santos, FM Campos, C Volpe, DB Liarte, P Nirdé, CM Probst, MA Krieger, S Goldenberg, AJ Romanha (2008) Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Trop*. 107(1):59-65.
- [243] FB Nogueira, JC Ruiz, C Robello, AJ Romanha, SMF Murta (2009) Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res*, 104(4):835–844.
- [244] AM Mejía-Jaramillo, GJ Fernández, M Montilla, RS Nicholls, O Triana-Chávez (2012) *Trypanosoma cruzi* strains resistant to benznidazole occurring in Colombia. *Biomédica* 32(2): 196–205.
- [245] SM Murta, RT Gazzinelli, Z Brener, AJ Romanha (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 93(2):203–214.

- [246] D Villarreal, C Barnabé, D Sereno, M Tibayrenc (2004) Lack of correlation between in vitro susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp Parasitol*, 108 (1–2): 24–31.
- [247] CR Marinho, MR D’Império Lima, MG Grisotto, J M. Alvarez (1999) Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas’ disease. *Infect Immun* 67(1): 308–318.
- [248] JS Perkiömäki, MJ Koistinen, S Yli-Mäyry, HV Huikuri (1995) Dispersion of QT interval in patients with and without susceptibility to ventricular tachyarrhythmias after previous myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 26 (1): 174–179.
- [249] S Padmanabhan, H Silvet, J Amin, RG Pai (2003) Prognostic value of QT interval and QT dispersion in patients with left ventricular systolic dysfunction: results from a cohort of 2265 patients with an ejection fraction of < or =40%. *Am Heart J*, 145(1): 132–138.
- [250] J Bradfield, B Woodbury, M Traina, S Hernandez, D Sanchez, R Wachsner, K Shivkumar, S Meymandi (2014) Repolarization parameters are associated with mortality in chagas disease patients in the United States. *Indian pac elect j* 14(4), 171–180.
- [251] HAR Corbucci, DM Haber, RB Bestetti, JA Cordeiro, ML. Fioroni (200&) QT interval dispersion in patients with chronic heart failure secondary to Chagas’ cardiomyopathy: correlation with clinical variables of prognostic significance. *Cardiov. Path* 15 (1): 18–23.

ANEXO: Información complementaria

Soluciones empleadas en las distintas técnicas realizadas en este trabajo de tesis:

- **Medios de cultivos utilizados para el crecimiento de bacterias *E. coli*:**

Medio LB líquido:

| <i>Reactivo</i> | <i>Concentración</i> |
|-----------------------------|----------------------|
| Peptona de carne | 1% (p/v) |
| Extracto de Levadura | 0,5% (p/v) |
| NaCl | 0,5% (p/v) |

Medio LB-agar

| <i>Reactivo</i> | <i>Concentración</i> |
|-----------------------------|----------------------|
| Peptona de carne | 1% (p/v) |
| Extracto de Levadura | 0,5% (p/v) |
| NaCl | 0,5% (p/v) |
| Agar | 1,7% (p/v) |

- **Transformación de bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) con los construcciones pET-28a(+) TSNT o TSf:**

| <i>Solución</i> | <i>Reactivos</i> | <i>Concentración</i> |
|-----------------|-------------------|----------------------|
| ST1 | MOPS | 10 mM |
| | KCl | 10 mM |
| | pH=7 | |
| ST2 | MOPS | 100 mM |
| | KCl | 10 mM |
| | CaCl ₂ | 50 mM |
| | pH=6.5 | |

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE):**

| <i>Solución</i> | <i>Reactivos</i> | <i>Concentración</i> |
|-------------------------|---|---|
| GEL DE APILAMIENTO | Tris-HCl (pH 6,8) SDS Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) TEMED Persulfato de amonio | 130 Mm 0,05 % (p/v) 4,8 % (p/v) 0,1 % (v/v) 0,05 % (p/v) |
| GEL DE CONCENTRACIÓN | Tris-HCl (pH= 8,8) SDS Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) Glicerol TEMED Persulfato de amonio | 375 mM 0,1 % (p/v) 15 % (p/v) 10 % (v/v) 10 % (v/v) 0,06 % (v/v) |
| BUFFER DE MUESTRA 5X | Tris-HCl (pH= 6,8) Glicerol SDS 2-mercaptoetanol Azul de bromofenol | 312 mM 50 % (v/v) 10 % (p/v) 12,5 % (v/v) 0,5 % (p/v) |
| BUFFER DE CORRIDA | Tris-HCl pH 8,3 Glicina SDS | 25 mM 192 mM 0,1 % (p/v) |
| SOLUCIÓN COLORANTE | Coomassie Brilliant Blue R-250 (Genbiotech) Etanol Ácido acético | 0,5 % (p/v) 45 % (v/v) 10 % (v/v) |
| SOLUCIÓN DECOLORANTE I | Etanol Ácido Acético | 50 % (v/v) 10 % (v/v) |
| SOLUCIÓN DECOLORANTE II | Etanol Ácido Acético | 10 % (v/v) 7 % (v/v) |

- **Método colorimétrico del BCA para la cuantificación de proteínas:**

| | | |
|---------------------|--|---------------------------|
| Reactivo A | 0,1 g BCA 2g Na ₂ CO ₃ .H ₂ O 0,4g Na OH mL 0,16g Tartrato de sodio dihidratado 0,95g NaHCO ₃ | } Volumen final de 100 mL |
| Reactivo B | 0,4g CuSO ₄ en volumen final 10 mL | |
| Reactivo RST | 98 volúmenes del Reactivo A + 2 volúmenes del Reactivo B | |

- **Técnica de ELISA:**

| <i>Solución</i> | <i>Reactivos</i> | <i>Concentración</i> |
|-----------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Solución de sensibilización | Na ₂ CO ₃ | 15 Mm |
| | NaHCO ₃ | 35 mM |
| | Na ₃ | 3,1 mM |
| | pH= 9,6 | |
| Solución de bloqueo | PBS | 1X |
| | Leche | 5% (p/v) |
| Solución de lavado | PBS 1X | |
| | Tween 20 | 0,05 % (v/v) |
| Solución de incubación | PBS | 1X |
| | Leche | 1% (p/v) |
| Solución <i>stopper</i> | H ₂ SO ₄ | 0,5 N |

- **Solución de Guanidina-EDTA para la conservación de ADN en muestras de sangre:**

| <i>Reactivo</i> | <i>Concentración</i> |
|-----------------|----------------------|
| Guanidina | 6M |
| EDTA | 0,2 M pH=8 |

- **Buffer de lisis para disgregar corazones:**

| <i>Reactivo</i> | <i>Concentración</i> |
|---------------------|----------------------|
| Tris-HCl | 10 mM (pH=7,6) |
| NaCl | 0,1 M |
| EDTA | 10 mM |
| SDS | 0,5% |
| Proteinasa K | 300 µg/ml |