

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“Utilización del 5-fluorouracilo para optimizar un candidato vacunal con elevada capacidad protectora contra *Trypanosoma cruzi* en diferentes modelos murinos”

Bioquímica Eliana Borgna

Director de Tesis: Dr. Gabriel Cabrera

Co-Directora: Dra. Florencia González

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

-2026-

Agradecimientos

A todos los que estuvieron desde el primer día, cuando esta tesis era apenas una idea y muchas dudas. A los que llegaron en el camino y se quedaron, y también a quienes ya no están pero fueron parte importante de este proceso y de mí. Nada fue en vano.

A la casa de estudios que me formó y me sostuvo: la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por ser espacio de aprendizaje, crecimiento y pensamiento crítico.

Al LTI, por el trabajo compartido, los errores, los logros y todo lo que se aprende puertas adentro. Por los festejos cuando las cosas salían bien, por celebrar cada pequeño avance, y por el día dulce, ese ritual tan lindo que se compartía semana a semana y que también sostuvo el camino.

A mi director, por el acompañamiento, la guía y la confianza a lo largo de este proceso. A mis compañeros, por hacer de la tesis una experiencia colectiva, por la ayuda en los momentos clave, las charlas y por ser grandes compañías cuando el recorrido se hizo largo.

A los vínculos de siempre y a los nuevos, esos que no fueron casualidad. A las charlas, los silencios compartidos, los abrazos oportunos y las palabras justas cuando todo parecía cuesta arriba.

A los lugares que me transformaron, a los espacios donde crecí, aprendí y me reconstruí. A cada experiencia que me sostuvo, incluso cuando dolió.

A lo más lindo de estos meses: mi sobrino Rafi, que llegó para recordarme lo esencial, lo simple y lo verdaderamente importante. Gracias por traer luz, ternura y futuro.

A mí, que hice lo que pude y un poco más. Que me caí, dudé, seguí y aprendí. Que entendí que el conocimiento también se construye con cuerpo, con emoción y con vínculos.

Esta tesis es el resultado de todo eso: de las personas, de los procesos, de las pérdidas y de los encuentros.

Porque la ciencia también se hace con humanidad, y porque todo esto, también es salud.

Y porque, al final, llegar no fue lo más importante, sino todo lo que pasó en el medio.

No hacen falta nombres ni listas: quienes estuvieron, acompañaron y sostuvieron saben que estas palabras son para ustedes, y que esta tesis lleva un pedacito de cada uno.

¡¡Gracias!!

Aportes Científico-Tecnológicos

Artículos Científicos

Prochetto E, [Borgna E](#), Jiménez-Cortegana C, Sánchez-Margalet V, Cabrera G. **Myeloid-derived suppressor cells and vaccination against pathogens.** Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:1003781. doi:10.3389/fcimb.2022.1003781.

[Borgna E](#), Prochetto E, Gamba JC, Marcipar I, Cabrera G. **Role of myeloid-derived suppressor cells during *Trypanosoma cruzi* infection.** Int Rev Cell Mol Biol. 2023;375:117-63. doi:10.1016/bs.ircmb.2022.09.002.

[Borgna E](#), Gamba JC, Prochetto E, Marcipar I, Cabrera G. **Simple protocol for measuring CD11b+ GR-1+ (Ly6C+/Ly6G+) myeloid cells from a minimum volume of mouse peripheral blood.** Methods Cell Biol. 2024;184:59-68. doi:10.1016/bs.mcb.2024.01.001.

[Borgna E](#), Prochetto E, Gamba JC, Vermeulen EM, Poncini CV, Cribb P, et al. **Control of myeloid-derived suppressor cell dynamics potentiates vaccine protection in multiple mouse models of *Trypanosoma cruzi* infection.** Front Immunol. 2024;15:1484290. doi:10.3389/fimmu.2024.1484290

Gamba JC, [Borgna E](#), Prochetto E, Pérez AR, Batista-Duharte A, Marcipar I, et al. **Integrating cellular immune biomarkers with machine learning to identify potential correlates of protection for a *Trypanosoma cruzi* vaccine.** Vaccines. 2025;13(9):915. doi:10.3390/vaccines13090915.

Índice

Agradecimientos.....	1
Aportes Científico-Tecnológicos	2
Índice	3
Abreviaturas y Símbolos	7
Resumen	9
Abstract	11
Introducción	13
<i>Enfermedad de Chagas: Historia y relevancia epidemiológica</i>	13
<i>Agente Etiológico de la enfermedad: T. cruzi</i>	14
<i>El genoma de T. cruzi como base para la clasificación en Unidades Discretas de Tipificación</i>	15
<i>Ciclos de transmisión de T. cruzi</i>	17
<i>Estadios de T. cruzi</i>	18
<i>El vector: insectos triatominos</i>	20
<i>Vías de transmisión</i>	21
<i>Presentación clínica de la enfermedad</i>	22
<i>Fase Aguda</i>	22
<i>Fase Crónica</i>	23
<i>Fase crónica asintomática o indeterminada</i>	23
<i>Fase crónica sintomática</i>	23
<i>Tratamiento farmacológico de la infección</i>	24
<i>Aspectos inmunológicos de la infección por T. cruzi</i>	25
<i>Parámetros de la respuesta inmune efectora</i>	25
<i>Parámetros de la respuesta inmune regulatoria</i>	28
<i>Células Treg: generalidades</i>	28
<i>Células supresoras de origen mieloide (MDSCs)</i>	29
<i>Origen de las MDSCs</i>	30
<i>Marcadores de superficie de las MDSCs</i>	31
<i>Mecanismos de supresión de las MDSCs</i>	32
<i>Catabolismo de L-arginina: iNOS y Arg1</i>	32
<i>Producción de ROS y peroxinitritos</i>	33
<i>Modulación de CDs</i>	33
<i>Otros mecanismos</i>	33
<i>Rol de las MDSCs en la infección por T. cruzi</i>	34
<i>Diseño racional de vacunas</i>	35

<i>Características de las vacunas</i>	36
<i>Tipos de vacunas</i>	37
<i>Desarrollo de vacunas contra T. cruzi</i>	40
<i>Candidato vacunal: Trans-sialidasa</i>	43
<i>Depleción de MDSCs durante la infección por T. cruzi de animales vacunados con TSf-ISPA</i>	45
Objetivos del trabajo	47
<i>Objetivo general</i>	47
<i>Objetivos específicos</i>	47
Capítulo 1	48
<i>"Selección de una estrategia de administración de los compuestos 5FU y TSf-ISPA en base a la respuesta inmune y la capacidad protectora contra T. cruzi"</i>	48
Introducción	49
<i>Rol de las MDSC en infecciones</i>	49
<i>MDSCs en infecciones virales</i>	50
<i>MDSCs en infecciones bacterianas</i>	50
<i>MDSCs en infecciones fúngicas</i>	51
<i>MDSCs en infecciones parasitarias</i>	51
<i>MDSCs en inmunizaciones</i>	51
<i>Depleción de las MDSCs</i>	52
<i>5-fluorouracilo y su mecanismo de acción</i>	53
Objetivo del capítulo 1	55
Materiales y métodos.....	56
<i>Animales</i>	56
<i>Formulación del candidato vacunal TSf-ISPA</i>	56
<i>Tratamiento con 5FU</i>	56
<i>Inmunizaciones</i>	57
<i>Evaluación de la respuesta inmune generada</i>	58
<i>Evaluación de anticuerpos específicos mediante la técnica ELISA</i>	58
<i>Evaluación de la respuesta celular: reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)</i>	59
<i>Cinética de cambio de la población MDSCs con los tratamientos de una dosis de 5FU prevacuna y covacuna</i>	59
<i>Citometría de flujo para evaluar depleción de células CD11b+Gr-1+ a los 7 y 15 días post-inmunización</i>	59
<i>Capacidad supresora de las células Gr-1+ de inhibir la maduración de CDs derivadas de médula ósea</i> ..	60
<i>Capacidad supresora sobre la proliferación de linfocitos T CD4+</i>	61
<i>Infección con T. cruzi</i>	61
<i>Parasitemia</i>	61

<i>Supervivencia</i>	61
<i>Estadística</i>	62
Resultados	63
<i>Estrategias de Administración de 5FU y TSf-ISPA: Proceso de Selección y Análisis</i>	63
<i>Cinética de las células CD11b+Gr-1+: Caracterización Post-inm</i>	64
<i>Control de la efectividad del 5FU para depletar células CD11b+Gr-1+</i>	66
<i>Cinética de las células MDSCs en el grupo experimental 5FU solo</i>	67
<i>Capacidad supresora de las células MDSCs</i>	67
<i>Capacidad Supresora de las células Gr-1+ sobre células dendríticas derivadas de médula ósea</i>	68
<i>Capacidad supresora de las células Gr-1+ sobre la proliferación de linfocitos T CD4+</i>	69
<i>Selección entre estrategia de una o dos dosis de 5FU para potenciar la formulación TSf-ISPA</i>	70
<i>Respuesta humoral y celular en los grupos vacunados con TSf-ISPA y tratados con una o dos dosis de 5FU</i>	73
<i>Evaluación de la capacidad protectora. Desafíos con T. cruzi</i>	74
Discusión	76
Conclusiones Parciales	80
Capítulo 2	81
<i>"Evaluación en diferentes modelos murinos de la capacidad protectora contra T. cruzi de los compuestos 5FU y TSf-ISPA"</i>	81
Introducción	82
<i>Origen evolutivo de las DTUs</i>	82
<i>Criterios genéticos y moleculares para la identificación de DTUs</i>	82
<i>Distribución eco-epidemiológica de las DTUs</i>	83
<i>Importancia clínica y epidemiológica de las DTUs</i>	84
<i>Análisis Comparativo de las Cepas Dm28c y Tulahuén de T. cruzi</i>	85
<i>Comparación de la respuesta inmune en modelos BALB/c y C57BL/6 infectados con T. cruzi</i>	86
<i>Variabilidad de T. cruzi y desarrollo de vacunas</i>	87
Objetivo del capítulo 2	89
Materiales y métodos	90
<i>Animales</i>	90
<i>Formulación del candidato vacunal e inmunizaciones</i>	90
<i>Evaluación de anticuerpos específicos mediante la técnica ELISA y de la respuesta celular: Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)</i>	91
<i>Infección con diferentes cepas de T. cruzi</i>	91
<i>Parasitemia</i>	91
<i>Supervivencia</i>	92

<i>Citometría de flujo de MDSCs post-infección</i>	92
<i>Estadística</i>	92
Resultados	93
<i>Modelo de inmunización e infección basado en ratones C57BL/6</i>	93
<i>Infección en el modelo C57BL/6-Tulahué</i> n	94
<i>Modelos de infección basados en T. cruzi de DTU I</i>	96
<i>Modelo basado en infección intradérmica</i>	97
<i>Análisis de la capacidad protectora a largo plazo de la formulación doble 5FU TSf-ISPA</i>	98
Discusión.....	100
Conclusiones Parciales.....	104
Capítulo 3	105
<i>“Análisis de los mecanismos inmunológicos para la potenciación del candidato vacunal TSf-ISPA al usar 5FU en la etapa de inmunización”</i>	105
Introducción	106
<i>Caracterización de la respuesta inmunológica en la etapa de inmunización</i>	106
<i>Análisis de poblaciones celulares en sangre periférica entera</i>	107
Objetivo del capítulo 3	109
Materiales y métodos.....	110
<i>Caracterización de la respuesta inmunológica en el bazo y ganglios inguinales de los animales inmunizados con el candidato vacunal seleccionado en el objetivo 1</i>	110
<i>Caracterización de la respuesta inmunológica en sangre periférica de los animales inmunizados con el candidato vacunal seleccionado en el objetivo 1.</i>	110
<i>Estadística</i>	111
Resultados	112
<i>Alteraciones en poblaciones inmunes del bazo luego de la inmunización</i>	112
<i>Alteraciones en las poblaciones inmunes de los ganglios linfáticos luego de la inmunización</i>	114
<i>Sangre periférica</i>	115
Discusión.....	118
Conclusiones Parciales.....	121
Conclusiones finales	122
Bibliografía.....	123

Abreviaturas y Símbolos

- 5FU: 5-fluorouracilo.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- Arg1: Arginasa 1.
- BMDCs: Células dendríticas derivadas de médula ósea.
- BZ: Benznidazol.
- CCC: Cardiopatía chagásica crónica (“Chronic Chagas heart disease”).
- CDs: Células dendríticas.
- Células NK: Células asesinas naturales (“Natural killer cells”).
- CFSE: 5,6 carboxifluorescein diacetato succinimidil éster.
- ConA: Concanavalina A.
- DO: Densidad óptica.
- DTH: Hipersensibilidad retardada (“Delayed hypersensitivity”).
- DTU/DTUs: Unidad/es discreta de tipificación (“Discrete Typing Units”).
- EC: Enfermedad de Chagas
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”).
- G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos (“Granulocyte colony stimulating factor”).
- GIPL: Glicoinositolfosfolípidos (“Glycoinositolphospholipid”).
- GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (“Granulocyte-macrophage colony stimulating factor”).
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol (“Glycosylphosphatidylinositol”).
- i.d.: Inoculación intradérmica.
- IDO: Enzima indolamina-2,3-dioxigenasa.
- iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.
- i.p.: Inoculación intraperitoneal.
- IFN- γ : Interferón gamma.
- IgG: Inmunoglobulina G.
- IL: Interleuquina.
- ISPA: Adyuvante de jaulas lipídicas (“Immunostimulating Particles”).
- Treg / Tregs: Células T regulatorias Foxp3+.
- LPS: Lipopolisacárido.
- M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos (“Macrophage colony stimulating factor”).

- MDSC/MDSCs: Célula(s) supresora(s) de origen mieloide (“Myeloid derived suppressor cells”).
- MFI: Intensidad de fluorescencia media (“Mean fluorescence intensity”).
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (“Major histocompatibility complex”).
- MHC II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II.
- M-MDSC / M-MDSCs: Célula(s) supresora(s) de origen mieloide monocítica(s).
- NO: Óxido nítrico (“Nitric oxide”).
- NI: No infectado.
- NFX: Nifurtimox.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (“Pathogen Associated Molecular Patterns”).
- PBS: Buffer fosfato salino.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase chain reaction”).
- PGE2: Prostaglandina E2.
- PMN-MDSC/PMN-MDSCs: Célula(s) supresora(s) de origen mieloide polimorfonuclear(es).
- Post-inm: post-inmunización.
- PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones (“Pattern Recognition Receptors”).
- PSS: Solución fisiológica salina.
- ROS: Especies reactivas del oxígeno (“Reactive oxygen species”).
- RPMI: Medio de cultivo completo.
- s.c: Administración subcutánea.
- SFB: Suero Fetal Bovino.
- SP: Sangre periférica.
- *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*.
- TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta.
- TLR: Receptores Toll-like.
- TMB: Tetrametil-bencidina.
- TNF: Factor de necrosis tumoral (“Tumor necrosis factor”).
- TS: Trans-sialidasa.
- TSf: Fracción de la Trans-sialidasa.

Resumen

La enfermedad de Chagas (EC), causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), continúa siendo un grave problema de salud pública, principalmente en América Latina, pero con una creciente relevancia global, estimándose entre 6 y 7 millones de personas infectadas en todo el mundo. A pesar de los esfuerzos realizados para desarrollar una vacuna efectiva, el complejo ciclo de vida, la diversidad genética y la capacidad de *T. cruzi* de manipular el sistema inmune del hospedador han dificultado el avance hacia una vacuna con licencia y, hasta el momento, ningún candidato vacunal ha sido evaluado en fases clínicas avanzadas (fase II/III). Este escenario destaca la necesidad de complementar las estrategias tradicionales con enfoques innovadores.

Sobre la base de estos antecedentes, se planteó una línea de investigación con una perspectiva integral del proceso de vacunación, considerando no solo el brazo efector del sistema inmune, sino también los componentes regulatorios que pueden participar en la modulación de la respuesta inducida por la vacuna.

En particular, esta tesis evaluó una estrategia inmunológica orientada a mejorar la eficacia de un candidato vacunal basado en una fracción de la proteína trans-sialidasa (TS) de *T. cruzi*, formulada con un adyuvante de base lipídica (ISPA), bajo la hipótesis de que la depleción transitoria, mediante 5-fluorouracilo (5FU), de células CD11b⁺Gr-1⁺ con fenotipo de células supresoras de origen mieloide (MDSCs) potenciaría la respuesta inmune efectora y aumentaría la capacidad protectora contra *T. cruzi* en diferentes modelos murinos.

En primer lugar, se optimizó el esquema de administración de los componentes TSf-ISPA y 5FU, basado en tres dosis separadas cada 15 días. Se observó que la administración de 5FU el día previo a cada inmunización con TSf-ISPA producía una disminución inicial de las células CD11b⁺Gr-1⁺, seguida de un efecto rebote hacia el día 7 post-inmunización. De acuerdo con este resultado, se optimizó un protocolo de doble dosis que incorporó una administración adicional de 5FU el día 8 post-inmunización con TSf-ISPA, lo cual permitió controlar esta dinámica, disminuyendo los niveles de dichas células hacia el día 15 post-inmunización. Funcionalmente, se aportó evidencia de que los esplenocitos CD11b⁺Gr-1⁺ que se expanden durante la inmunización incluyen células con capacidad supresora, afectando parámetros compatibles con la maduración de células dendríticas (CDs) y la proliferación de linfocitos T CD4⁺. La respuesta humoral aumentó en todos los protocolos que incluyeron TSf-ISPA, sin diferencias significativas entre los esquemas con o sin 5FU; sin embargo, la respuesta celular, evaluada mediante hipersensibilidad retardada (DTH), fue mayor en los animales tratados con el protocolo de doble 5FU TSf-ISPA que en aquellos que recibieron una sola dosis de 5FU. En términos de protección, el protocolo basado en la doble administración de 5FU mostró una mayor capacidad protectora frente a dosis letales elevadas de la cepa Tulahuén en ratones BALB/c, por lo que fue seleccionado como el más promisorio.

Si bien la diversidad genética del parásito, agrupada en siete unidades discretas de tipificación (DTUs), constituye uno de los principales obstáculos para el desarrollo vacunal, son escasos los trabajos que han

evaluado la protección cruzada de una misma vacuna frente a distintos linajes de *T. cruzi*. Asimismo, tanto la respuesta del hospedador como la vía de infección son variables que afectan la calidad de las respuestas inmunes y que tampoco han sido ampliamente consideradas. A lo largo de esta tesis se aportó evidencia de que la formulación seleccionada (doble 5FU TSf-ISPA) confiere capacidad protectora en términos de parasitemia y/o supervivencia en diferentes modelos murinos, empleando cepas de ratón de distinta base genética (BALB/c y C57BL/6), linajes del parásito genéticamente distantes (DTU I y DTU VI) y diferentes vías de infección (intraperitoneal e intradérmica). Además, la formulación también confirió capacidad protectora a mediano plazo (45 días post-inmunización) en el modelo BALB/c/Tulahuén, lo que respalda la generación de memoria inmunológica.

En cuanto a los mecanismos inmunológicos involucrados, el tratamiento con doble 5FU TSf-ISPA indujo un mayor incremento de células CD4⁺ y CD8⁺, incluyendo poblaciones de memoria CD4⁺CD44⁺ y CD8⁺CD44⁺, así como de células dendríticas con un fenotipo compatible con células dendríticas convencionales de tipo I en ganglios y bazo, en comparación con el grupo tratado con una sola dosis de 5FU, aportando evidencia de que la depleción de MDSCs permite alcanzar una mayor protección mediante el refuerzo de la respuesta efectora celular.

Por último, a partir de un protocolo basado en citometría de flujo utilizando pequeños volúmenes de sangre periférica (SP), se observó que el esquema de doble 5FU disminuyó de manera sistémica las células CD11b⁺Gr-1⁺, abriendo la posibilidad de incorporar nuevas herramientas para la determinación de correlatos de protección del candidato vacunal.

En conjunto, los resultados demuestran que la inmunización con TSf-ISPA induce la expansión de MDSCs, las cuales pueden actuar como un mecanismo limitante de la respuesta efectora. La modulación transitoria de estas células mediante 5FU se asoció con mayor respuesta celular y capacidad protectora de la vacuna en múltiples condiciones experimentales. Estos resultados refuerzan la importancia de considerar al sistema inmune en su totalidad durante el diseño racional de vacunas contra patógenos complejos, integrando no solo el estudio de la respuesta efectora, sino también la participación de los componentes regulatorios como un complemento valioso para el desarrollo de estrategias superadoras.

Abstract

Chagas disease (CD), caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), remains a major public health problem, primarily in Latin America but with increasing global relevance, with an estimated 6–7 million people infected worldwide. Despite efforts to develop an effective vaccine, the complex life cycle, genetic diversity, and the ability of *T. cruzi* to manipulate the host immune system have hindered progress toward a licensed vaccine, and to date, no vaccine candidate has been evaluated in advanced clinical phases (phase II/III). This scenario highlights the need to complement traditional strategies with innovative approaches.

Based on this background, a research line was proposed with an integrated perspective on the vaccination process, considering not only the effector arm of the immune system but also regulatory components that may participate in modulating the vaccine-induced response.

In this context, this thesis evaluated an immunological strategy aimed at improving the efficacy of a vaccine candidate based on a fraction of the trans-sialidase (TS) protein of *T. cruzi*, formulated with a lipid-based adjuvant (ISPA), under the hypothesis that transient depletion, using 5-fluorouracil (5FU), of CD11b⁺Gr-1⁺ cells with a myeloid-derived suppressor cell (MDSC) phenotype would enhance the effector immune response and increase protective capacity against *T. cruzi* in different murine models.

First, the administration schedule of TSf-ISPA and 5FU was optimized, based on three doses administered 15 days apart. It was observed that administering 5FU the day prior to each immunization with TSf-ISPA induced an initial decrease in CD11b⁺Gr-1⁺ cells, followed by a rebound effect by day 7 post-immunization. Based on this finding, a double-dose protocol was optimized, incorporating an additional administration of 5FU on day 8 post-immunization with TSf-ISPA. This approach allowed control of this dynamic, reducing the levels of these cells by day 15 post-immunization. Functionally, evidence was provided that CD11b⁺Gr-1⁺ splenocytes expanding during immunization include cells with suppressive capacity, affecting dendritic cell (DC) maturation and CD4⁺ T cell proliferation. The humoral response increased in all protocols including TSf-ISPA, with no significant differences between regimens with or without 5FU; however, the cellular response, evaluated by delayed-type hypersensitivity (DTH), was higher in animals treated with the double 5FU TSf-ISPA protocol than in those receiving a single dose of 5FU. In terms of protection, the protocol based on double 5FU administration showed greater protective capacity against high lethal doses of the Tulahuén strain in BALB/c mice, and was therefore selected as the most promising.

Although the genetic diversity of the parasite, grouped into seven discrete typing units (DTUs), represents one of the main obstacles to vaccine development, few studies have evaluated cross-protection of a single vaccine against different *T. cruzi* lineages. Moreover, both host response and route of infection are variables that affect the quality of immune responses and have not been widely considered. Throughout this thesis, evidence was provided that the selected formulation (double 5FU TSf-ISPA) confers protective capacity

in terms of parasitemia and/or survival across different murine models, using mouse strains with distinct genetic backgrounds (BALB/c and C57BL/6), genetically distant parasite lineages (DTU I and DTU VI), and different routes of infection (intraperitoneal and intradermal). In addition, the formulation also conferred medium-term protection (45 days post-immunization) in the BALB/c/Tulahuén model, supporting the generation of immunological memory.

Regarding the underlying immunological mechanisms, treatment with double 5FU TSf-ISPA induced a greater increase in CD4⁺ and CD8⁺ cells, including CD4⁺CD44⁺ and CD8⁺CD44⁺ memory populations, as well as dendritic cells with a phenotype consistent with type I responses in lymph nodes and spleen, compared with the group treated with a single dose of 5FU. These findings provide evidence that MDSC depletion enhances protection by strengthening the cellular effector response.

Finally, using a flow cytometry protocol based on small volumes of peripheral blood (PB), it was observed that the double 5FU regimen systemically reduced CD11b⁺Gr-1⁺ cells, opening the possibility of incorporating new tools to determine correlates of protection for this vaccine candidate.

Overall, the results demonstrate that immunization with TSf-ISPA induces the expansion of MDSCs, which may act as a limiting mechanism of the effector response. Transient modulation of these cells using 5FU enhanced the cellular response and improved the protective capacity of the vaccine under multiple experimental conditions. These results highlight the importance of considering the immune system as a whole in the rational design of vaccines against complex pathogens, integrating not only the study of the effector response but also the contribution of regulatory components as a valuable complement for the development of improved strategies.

Introducción

Enfermedad de Chagas: Historia y relevancia epidemiológica

La enfermedad de Chagas (EC), también denominada tripanosomiasis americana, es una zoonosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Actualmente, ha sido reportada en 44 países de los cinco continentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 6 y 7 millones de personas se encuentran infectadas en territorios tanto endémicos, principalmente Latinoamérica, como no endémicos, debido a los movimientos migratorios. La EC continúa siendo un grave problema de salud pública, ya que alrededor de 75 millones de personas viven en áreas expuestas al riesgo de infección, y se reportan aproximadamente 12.000 muertes anuales (1). La incidencia anual se calcula en 30.000 a 40.000 casos; sin embargo, la detección es baja en la mayoría de los países (con tasas menores al 10% e incluso al 1%), lo que limita el acceso oportuno al diagnóstico y a una atención sanitaria adecuada (2).

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en Minas Gerais, Brasil. Sus hallazgos fueron luego corroborados y ampliados por los aportes de Salvador Mazza en Argentina (3). Existen, sin embargo, referencias previas al vector: en 1835, Charles Darwin relató en su libro, “Viaje de un naturalista alrededor del mundo” su encuentro con insectos hematófagos durante su estadía en Chile. Tras su regreso a Inglaterra permaneció asintomático hasta 1841, cuando comenzó a presentar alteraciones cardíacas y gastrointestinales progresivas que culminaron con su muerte en 1882. Años más tarde se planteó la hipótesis de que Darwin pudo haber adquirido la enfermedad de Chagas durante su paso por áreas endémicas de Chile y Argentina (3).

El primer caso clínico descrito fue el de Berenice, una niña de 2 años atendida por Carlos Chagas el 14 de febrero de 1909, que presentaba fiebre alta, hepatoesplenomegalia, edema facial y parasitemia detectable. Sorprendentemente, Berenice permaneció asintomática toda su vida, falleciendo a los 73 años por causas no relacionadas (4). Posteriormente, la enfermedad fue documentada en otros países de América Latina: El Salvador (1913), Perú (1919), Venezuela (1919), Costa Rica (1922), Paraguay (1924), Guatemala (1933), Chile (1937), México (1938), Bolivia (1942), Colombia (1947), Nicaragua (1949), Argentina (1949) y Honduras (1960). Evidencias más recientes han identificado ADN de *T. cruzi* en momias de Chile/Perú y Brasil, con dataciones entre 7.050 y 2.500 años a.C., lo que demuestra que la infección ha estado presente en América por más de 9.000 años (5). Estudios de prevalencia sugieren que hasta un 40% de la población de aquella época podría haber estado infectada con *T. cruzi* (5).

Los aportes de Chagas resultan únicos en la historia de la medicina y la parasitología, dado que describió de manera integral los principales elementos de una nueva enfermedad tropical: el vector, el patógeno y sus

ciclos de desarrollo, los reservorios, las manifestaciones clínicas, la epidemiología y medidas profilácticas (1). Según Lannes-Vieira, la historia de la EC puede dividirse en tres fases:

1909–1934: marcada por el descubrimiento y los trabajos de Chagas, así como la controversia científica y social en torno al reconocimiento de la enfermedad.

1935–1960: caracterizada por las contribuciones de Mazza y Romaña en Argentina, quienes confirmaron la forma aguda de la enfermedad, y por los aportes de Evandro Chagas y Emmanuel Dias en Brasil, que consolidaron el carácter endémico y crónico de la infección.

1961–actualidad: definida por los desafíos persistentes en la comprensión de la enfermedad y en su control, lo que ha impulsado el desarrollo de políticas sanitarias nacionales e internacionales (1).

Agente Etiológico de la enfermedad: *T. cruzi*

El parásito *T. cruzi* es un protista caracterizado por la presencia de un único flagelo y una única mitocondria. El genoma mitocondrial se organiza en una región especializada denominada kinetoplasto, ubicada en proximidad a la base del flagelo, cuya estructura es fundamental para la supervivencia del parásito (6).

Desde el punto de vista taxonómico, *T. cruzi* se ubica actualmente dentro del clado Discoba, filo Euglenozoa, clase Kinetoplastea, orden Trypanosomatida y familia Trypanosomatidae (Figura 1), de acuerdo con clasificaciones basadas en filogenómica que han reemplazado los esquemas tradicionales como Sarcomastigophora/Mastigophora, hoy considerados obsoletos (7). Los kinetoplástidos se distinguen por la presencia del kinetoplasto, que corresponde a una red de ADN mitocondrial asociada al flagelo.

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género Trypanosoma incluye numerosos parásitos de relevancia médica y veterinaria. Particularmente, *T. cruzi* se caracteriza por ser un parásito intracelular con un ciclo de vida heteroxénico y complejo, que involucra tanto insectos vectores (triatominos) como una amplia gama de mamíferos, incluidos los humanos, como reservorios (8).

La clasificación propuesta por Levine y colaboradores (6), basada en criterios morfológicos y biológicos, constituyó un marco de referencia clave. Sin embargo, los avances en biología molecular y filogenómica han permitido refinar esta organización, ubicando a *T. cruzi* dentro de linajes evolutivos mejor definidos. Esta actualización no solo tiene implicancias taxonómicas, sino que también contribuye a una comprensión más precisa de su biología, evolución y relevancia en la patogenia de la enfermedad de Chagas (9).

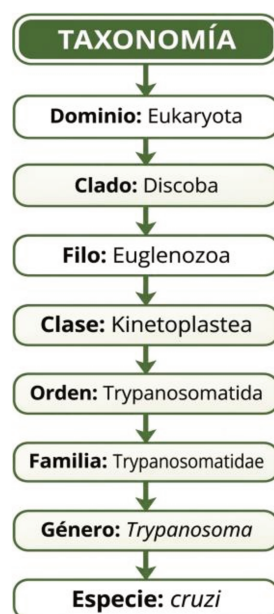


Figura 1: Clasificación Taxonómica de *T. cruzi*. Figura de autoría propia.

El genoma de *T. cruzi* como base para la clasificación en Unidades Discretas de Tipificación

T. cruzi presenta una notable heterogeneidad genética, considerada una de las más elevadas entre los protozoos parásitos. La comprensión del origen y la estructura de esta diversidad resultan clave para interpretar los distintos ciclos de transmisión, los patrones epidemiológicos y las características biológicas y patogénicas del parásito. Los estudios genómicos y poblacionales han demostrado que esta variabilidad se manifiesta tanto a nivel nuclear como mitocondrial, reflejando una compleja historia evolutiva marcada por eventos de divergencia, recombinación e hibridación (10,11).

Hasta mediados de la década de 2010 se había documentado la distribución geográfica de aproximadamente 6.400 aislados de *T. cruzi*, obtenidos a partir de reservorios humanos, vectores triatomíneos y una amplia variedad de mamíferos silvestres y domésticos en áreas endémicas (12). Estos estudios evidenciaron una fuerte asociación entre determinados genotipos del parásito y nichos ecológicos específicos, aunque también mostraron la superposición geográfica de distintos linajes (10). Si bien esta base de datos ha sido actualizada en años posteriores, dichos trabajos sentaron las bases para un sistema de clasificación robusto y ampliamente aceptado.

Con el objetivo de estandarizar la nomenclatura y facilitar la comunicación entre los distintos grupos de investigación, en 2009 se alcanzó un consenso internacional que estableció la clasificación de *T. cruzi* en seis Unidades Discretas de Tipificación (*Discrete Typing Units*, DTUs), denominadas TcI a TcVI. Este sistema se fundamenta en el concepto de linajes evolutivos discretos, definidos como conjuntos de aislados que presentan mayor similitud genética entre sí que con los pertenecientes a otros grupos, independientemente del marcador utilizado para su identificación (10,12,13). La asignación a una DTU se realiza mediante el análisis combinado

de marcadores genéticos nucleares y mitocondriales, así como de características moleculares e inmunológicas compartidas.

Posteriormente, se describió una DTU adicional, denominada TcBat, asociada principalmente a murciélagos y filogenéticamente diferenciada del resto de los linajes humanos clásicos. La identificación de TcBat reforzó la idea de que la diversidad de *T. cruzi* es aún mayor de lo inicialmente propuesto (5).

Desde una perspectiva evolutiva, TcI, TcIII y TcIV han sido propuestos como un grupo monofilético, mientras que TcII se ubica en un linaje diferenciado (Figura 2). Estudios de tipificación multilocus respaldan que los linajes TcV y TcVI tienen un origen híbrido, producto de eventos de recombinación entre los linajes ancestrales TcII y TcIII (Figura 2). Estos procesos de hibridación, junto con fenómenos de introgresión mitocondrial (como la transferencia de genoma mitocondrial de TcIV a TcIII), han contribuido de manera significativa a la actual estructura genética de *T. cruzi*, complejizando la interpretación de sus relaciones filogenéticas (Figura 2) (11).

La clasificación en DTUs, basada en información genética, constituye una herramienta fundamental para el estudio integral de *T. cruzi*, ya que permite vincular la diversidad del parásito con aspectos ecológicos, epidemiológicos, clínicos e inmunopatogénicos.

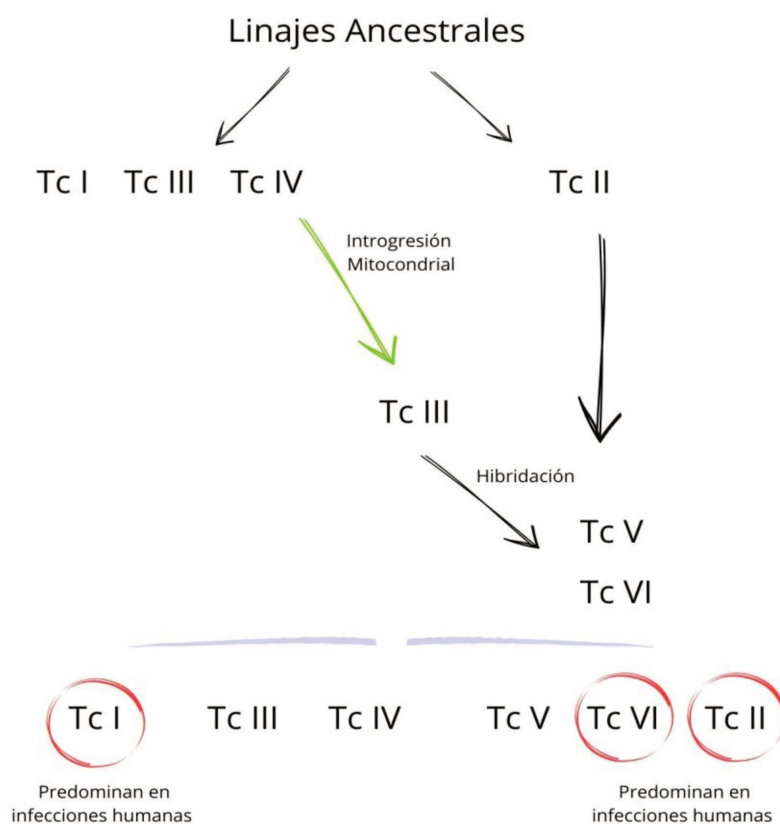


Figura 2: Modelo evolutivo de las DTUs de *T. cruzi*. Figura modificada de (11).

Ciclos de transmisión de *T. cruzi*

La infección por *T. cruzi* se lleva a cabo a través de tres ciclos epidemiológicos que se interrelacionan entre sí: el ciclo silvestre, el peridoméstico y el doméstico (Figura 3). En el ciclo silvestre, el parásito circula entre animales silvestres y triatominos que habitan ambientes naturales. Sin embargo, la deforestación y la pérdida de fuentes de alimento en estos entornos facilitan que triatominos y mamíferos silvestres infectados (principalmente marsupiales) se acerquen a áreas peridomésticas en busca de alimento. A su vez, los animales domésticos y de corral pueden desplazarse hacia el ambiente selvático y adquirir la infección, lo que genera un flujo bidireccional entre ambos ambientes (14).

Los triatominos peridomésticos, progresivamente adaptados a convivir cerca de los humanos, pueden invadir el domicilio y alimentarse de sangre humana, estableciendo así el ciclo doméstico. En algunos casos, incluso triatominos silvestres pueden ser atraídos directamente a las viviendas por la luz artificial y alimentarse de sangre de las personas cuando la disponibilidad de presas en la selva es baja. Del mismo modo, marsupiales y murciélagos pueden ingresar a los hogares en busca de alimento, incrementando la posibilidad de transmisión (14).

Por otra parte, la acción humana también influye en esta dinámica: actividades como la tala, la caza o la extracción de fibras vegetales favorecen el contacto con triatominos y reservorios silvestres, y pueden facilitar el transporte accidental de insectos infectados al interior de las casas, junto con materiales como madera, palmas o fibras utilizadas en techos y paredes en áreas rurales. De esta manera, se configura un intercambio de “doble vía” entre los tres ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas, cuyo eje central lo constituyen los reservorios, los vectores y el ser humano (14).

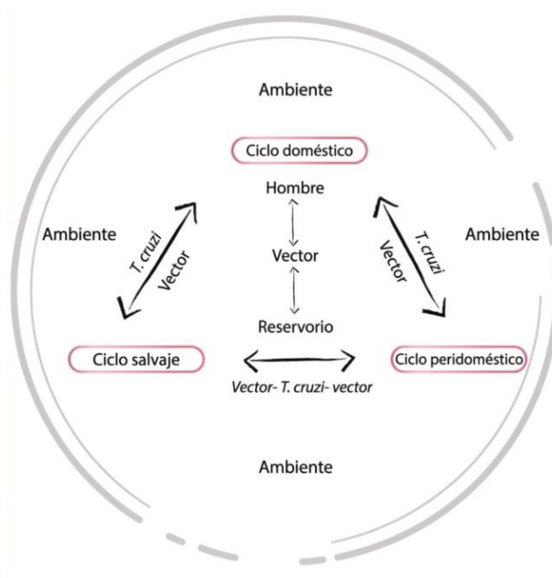


Figura 3: Ciclos de transmisión de *T. cruzi* y sus principales formas evolutivas. Figura modificada de (14).

Estadios de *T. cruzi*

T. cruzi presenta un ciclo de vida complejo, durante el cual adopta distintas formas morfológicas que le permiten adaptarse a los diversos ambientes que atraviesa. A lo largo de este proceso, el parásito transita por los siguientes estadios principales: tripomastigote (metacíclico y sanguíneo), amastigote y epimastigote, como se muestra en la Figura 4 (15).

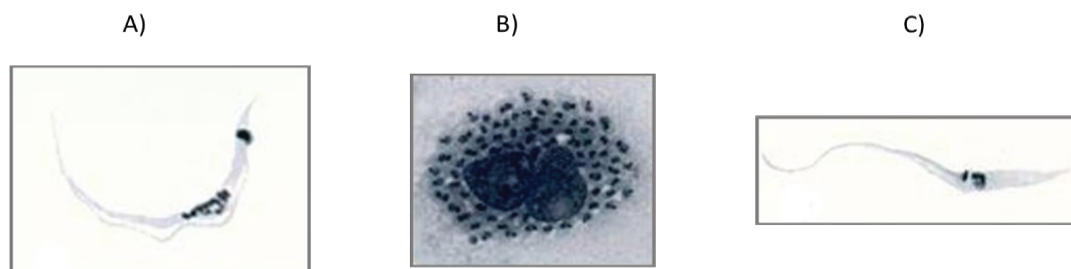


Figura 4: Estadios celulares de *T. cruzi*. Figura modificada de (15).

- A) **Tripomastigote:** es la forma infectiva que circula en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado y también la que se transmite al vector. Presenta un flagelo libre y el kinetoplasto ubicado en posición posterior al núcleo. Dentro de este estadio se distinguen dos variantes principales. Tripomastigote sanguíneo: se encuentra en la sangre del hospedador vertebrado. No se divide en el torrente sanguíneo y puede presentarse en dos morfologías: una forma esbelta, con núcleo alargado y flagelo corto, principalmente asociada a la infección de células vertebradas, y una forma ancha, con núcleo ovalado y flagelo más largo, que tendría mayor capacidad para infectar al insecto vector. Tripomastigote metacíclico: se origina en el recto del insecto vector a partir de epimastigotes y es eliminado con las heces durante la alimentación. Esta forma es la responsable de iniciar la infección en el hospedador vertebrado al ingresar por soluciones de continuidad en la piel o a través de mucosas. Una vez que el tripomastigote invade la célula hospedadora, inicia una serie de transformaciones altamente reguladas. El parásito se pliega sobre sí mismo dentro de la vacuola parasitófora, acercando sus extremos anterior y posterior, lo que favorece la relocalización del kinetoplasto y los cuerpos basales y el acortamiento del flagelo, marcando el inicio de la amastigogénesis (16).
- B) **Amastigote:** corresponde a la forma intracelular que se multiplica dentro de las células del hospedador, especialmente en tejidos musculares y nerviosos. Se caracteriza por su morfología redondeada y la ausencia de flagelo libre. La transición hacia amastigote incluye formas intermedias con diferentes grados de redondez y longitud flagelar. Además, los amastigotes se dividen mediante mitosis nuclear semicerrada, donde el huso mitótico se forma dentro del núcleo sin participación de los cuerpos basales. Este estadio continúa hasta alcanzar una elevada carga intracelular, momento en el que se inicia la transformación inversa hacia tripomastigotes (16).
- C) **Epimastigote:** es la forma proliferativa presente en el intestino medio del insecto vector. Posee un flagelo emergente y el kinetoplasto localizado en posición anterior al núcleo. Dentro del hospedador vertebrado, existen formas transicionales semejantes a epimastigotes que aparecen durante la transición amastigote/tripomastigote. Estas formas presentan: cuerpo más alargado o “en forma de hoja”, flagelo progresivamente más largo y el kinetoplasto en posición similar al epimastigote clásico. Sin embargo, a diferencia de los epimastigotes del vector, estas formas no parecen ser replicativas y actuarían como intermediarias necesarias antes de la formación del tripomastigote maduro (16).

El ciclo de *T. cruzi* puede iniciarse cuando el triatomino se alimenta de la sangre de un animal o de una persona infectada que porta el parásito en su estadio tripomastigote sanguíneo (Figura 5). Una vez ingeridos, la mayoría de los parásitos son destruidos en el estómago del insecto; sin embargo, algunos logran sobrevivir y, tras unos días, se diferencian en epimastigotes. Estas formas proliferativas migran hacia el intestino posterior del vector, donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos. La transmisión a un nuevo huésped ocurre cuando el triatomino infectado vuelve a alimentarse, generalmente durante la noche. En ese momento defeca cerca del sitio de la picadura, liberando en sus heces los tripomastigotes metacíclicos. El prurito provocado por la picadura favorece que la persona o el animal se rasque, permitiendo que los parásitos ingresen al organismo a través de lesiones cutáneas o mucosas, o bien al llevar accidentalmente las manos contaminadas hacia la boca o los ojos (17).

Una vez dentro del huésped vertebrado, los tripomastigotes invaden las células en el sitio de inoculación mediante un proceso de reconocimiento específico entre el parásito y las células del mamífero, que involucra numerosas moléculas presentes en ambos tipos celulares (18).

El ingreso de *T. cruzi* a la célula puede dividirse en dos etapas: primero, la adhesión, mediada por la unión de antígenos del parásito a receptores de la célula huésped, lo que desencadena eventos de señalización celular; y segundo, la internalización, que culmina con la formación de una vacuola parasitófora que alberga al parásito (19). Una vez formada esta vacuola, se produce la fusión con lisosomas celulares, lo que conduce a su maduración, proceso esencial para el avance de la infección (20). Esta fusión se asocia con el inicio de la diferenciación de tripomastigotes a amastigotes, inducida en parte por el pH ácido generado dentro de la vacuola (21). Posteriormente, los amastigotes degradan la membrana vacuolar mediante enzimas propias y quedan libres en el citoplasma de la célula huésped, donde se multiplican asexualmente por fisión binaria. Finalmente, los amastigotes se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados tras la ruptura celular, pudiendo invadir nuevas células o reincorporarse al torrente (Figura 5) (22).

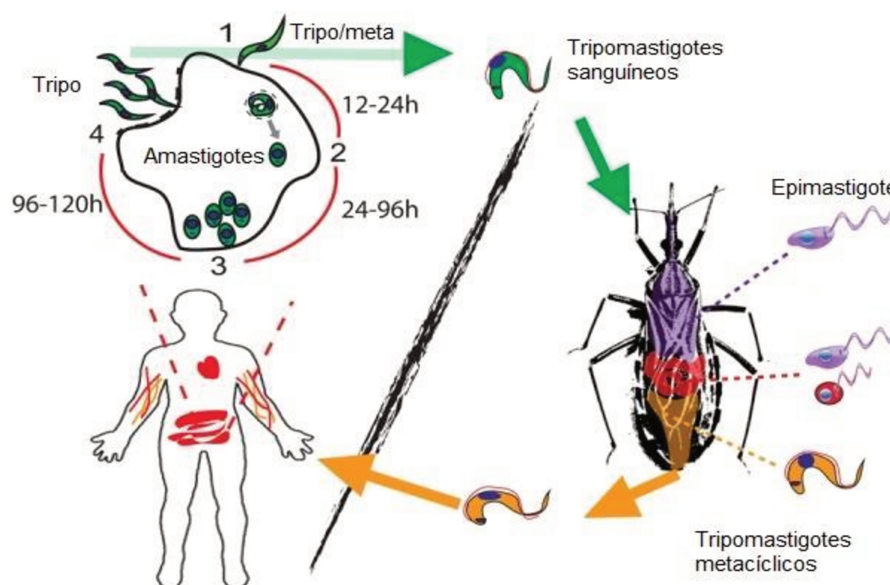


Figura 5: Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se detallan las fases en el vector y en el huésped mamífero. El ciclo intracelular incluye la invasión de células nucleadas, diferenciación en amastigotes, replicación por fisión binaria y liberación de tripomastigotes sanguíneos. Figura modificada de (23).

El vector: insectos triatominos

Los triatominos son insectos hematófagos pertenecientes al orden Hemiptera y a la familia Reduviidae, que actúan como vectores de *T. cruzi* (Figura 6 y 7). Su distribución se concentra principalmente en América Latina, aunque también se han registrado en algunas regiones de Estados Unidos, como Texas (24,25).

Entre los triatominos asociados a hábitats domésticos con mayor relevancia epidemiológica se destacan: *Triatoma infestans*, predominante en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú; *Rhodnius prolixus*, en Colombia, Venezuela y países de Centroamérica; *Triatoma dimidiata*, presente en Ecuador y América Central; y *Rhodnius pallescens*, en Panamá (26).



Figura 6: Fotografía de *Triatoma dimidiata*, tomada el 17 de mayo de 2005. Figura modificada de la página de la OMS (2).

Los triatominos presentan un desarrollo que comprende estadios ninfales antes de alcanzar la etapa adulta. Durante los estadios inmaduros, carecen de alas pero ya poseen hábitos hematófagos. A medida que maduran, adquieren gradualmente las características morfológicas típicas de los adultos, incluyendo alas y una

estructura corporal definida. En la etapa adulta, se destacan rasgos como la cabeza alargada con un aparato bucal succionador especializado y un abdomen segmentado, adaptaciones clave para su alimentación y rol como vector (Figura 7) (25).

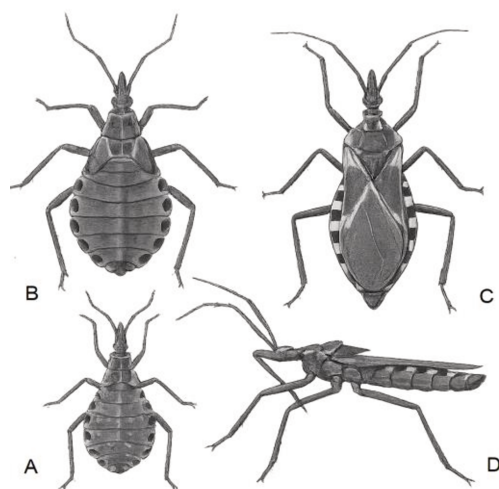


Figura 7: Estadios del Triatomo. A) B) Estadios ninfales (inmaduros). Los triatomos atraviesan cinco estadios ninfales antes de llegar a la adultez. En esta etapa no tienen alas, pero ya son hematófagos. C) Adulto, con alas desarrolladas y características morfológicas definitivas. D) Vista lateral del adulto, donde se observa la cabeza alargada con el pico succionador y el abdomen segmentado. Figura modificada de (25).

Los triatomos no solo transmiten *T. cruzi* a los seres humanos, sino también a una amplia variedad de animales domésticos, como perros, gatos y cabras, y a animales silvestres, entre los que se incluyen roedores, mapaches y armadillos. Además, han desarrollado una notable capacidad de adaptación a la vida cercana al ser humano, estableciéndose en grietas y hendiduras de las paredes de las viviendas, así como en corrales y otras estructuras del peridomicilio (27).

Vías de transmisión

La transmisión de *T. cruzi* ha sido históricamente predominantemente vectorial, a través de triatomos que se adaptaron progresivamente desde el ciclo silvestre al peridoméstico y doméstico. También son relevantes la vía transfusional, antes muy frecuente hasta la implementación de controles en bancos de sangre, y la oral, responsable de numerosos brotes agudos en la Amazonia. A estas se suman la transmisión congénita y, en menor medida, accidentes de laboratorio, y trasplantes. Finalmente, la migración de personas desde áreas endémicas hacia países no endémicos constituye un factor epidemiológico relevante que debe ser considerado (28,29).

En la transmisión materno-fetal de *T. cruzi* (vía vertical), el parásito atraviesa la placenta y alcanza al feto, y el establecimiento de la infección depende de la compleja interacción entre el parásito, la placenta, la madre y el feto (30). Se ha estimado que esta forma de transmisión ocurre en un 1-12% de los embarazos y

guarda relación directa con la parasitemia materna (31). En Argentina, la tasa de transmisión vertical se aproxima al 6%, y a nivel regional se calcula que nacen anualmente alrededor de 9.000 niños infectados en América Latina (32).

Por otro lado, la vía oral constituye uno de los mecanismos más relevantes de transmisión de *T. cruzi* en el ciclo silvestre, ya que muchos mamíferos consumen insectos infectados (29). En los últimos años, los procesos de deforestación y otras modificaciones ambientales han alterado la dinámica de los vectores y reservorios, favoreciendo su desplazamiento hacia nuevas áreas. Como consecuencia, se han documentado episodios de contaminación con el parásito en espacios de preparación y consumo de alimentos. Esta forma de transmisión puede originarse por la ingesta de jugos de frutas, agua o vegetales contaminados con heces de triatominos o con secreciones de mamíferos infectados, así como por el consumo de carne insuficientemente cocida procedente de animales portadores del parásito (33).

Finalmente, la transmisión sexual de *T. cruzi* constituye un tema en investigación. Aunque esta posibilidad fue planteada hace varias décadas, la evidencia disponible aún es limitada. Experimentos en modelos murinos han demostrado que, tras el apareamiento entre animales infectados y no infectados, los individuos sanos pueden presentar infección, lo que sugiere la viabilidad de este mecanismo (34,35). En humanos, se han identificado casos familiares de EC en los que se detectó ADN del parásito en muestras seminales. Al correlacionar estos hallazgos con la información clínica, se planteó la hipótesis de una posible transmisión sexual (36).

Presentación clínica de la enfermedad

La EC evoluciona en dos fases consecutivas con manifestaciones clínicas diferenciadas: una fase aguda inicial y, posteriormente, una fase crónica.

Fase Aguda

La fase aguda se caracteriza por generar una elevada parasitemia, en la cual los parásitos se diseminan en la forma de tripomastigotes sanguíneos e invaden diversos tejidos, como hígado, intestino, bazo, ganglios linfáticos, sistema nervioso central y el músculo cardíaco. La mayoría de las veces, los pacientes son asintomáticos, pero en ciertos casos pueden presentar fiebre, dolores musculares y de cabeza, escalofríos, náuseas, vómitos o diarrea. Esta fase aguda dura aproximadamente entre 1 a 3 meses, y es seguida por una fase asintomática indeterminada, sin manifestaciones clínicas (33).

Cuando la transmisión ocurre por medio de vectores, el sitio en el cual ocurrió la picadura puede presentar una lesión inflamatoria, conocida como “chagoma”, pero si el ingreso de *T. cruzi* sucede por medio de la membrana conjuntiva, se produce una alteración característica, la cual se denomina “Signo de Romaña” (37). En la infección por la vía vectorial, en muy pocos casos se desarrollan síntomas más severos y

posiblemente fatales como miocarditis aguda y/o meningoencefalitis (38). En la mayoría de los casos se produce escasa sintomatología, por lo cual la infección cursa de manera desapercibida para la persona infectada, siendo común su diagnóstico cuando se encuentra en el estadio crónico de la enfermedad (1).

La detección de la infección en la fase aguda, se basa en la detección del parásito por medio de un examen microscópico de sangre fresca anticoagulada, o por un frotis de sangre. También puede emplearse Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase chain reaction, PCR) para detectar y amplificar un segmento del genoma de *T. cruzi*, habitualmente de sangre periférica (33).

Fase Crónica

Luego de transcurrida la fase aguda, los individuos que se encuentran infectados ingresan a la fase crónica, la cual puede dividirse en dos formas clínicas diferentes: la fase crónica asintomática (también conocida como indeterminada) y la fase crónica sintomática.

Fase crónica asintomática o indeterminada

Esta fase, tiene como característica que no presenta síntomas o manifestaciones clínicas. Los pacientes que se encuentran en esta fase, se caracterizan por presentar resultados normales en los estudios radiológicos de corazón, esófago y colon. Además, no presenta variaciones en los electrocardiogramas (39). Pero, aunque no presentan sintomatología, presentan serología positiva con anticuerpos contra *T. cruzi*. Esta fase puede durar años e incluso toda la vida en algunos pacientes (40).

Fase crónica sintomática

De las personas que se encuentran infectadas con *T. cruzi*, se estima que un 30% evoluciona a una fase crónica sintomática (38). Esta fase suele iniciar entre la segunda y la cuarta década de vida de la persona que se encuentra infectada, luego de 5 a 15 años de la infección original. En esta etapa, las manifestaciones clínicas están relacionadas con daños en el corazón, esófago y colon (41) (Figura 8).

Cuando los pacientes cursan este estadio crónico, el corazón es uno de los órganos más afectados. La manifestación más grave y común que se presenta es la enfermedad cardíaca crónica, en la cual los corazones suelen estar agrandados con una marcada alteración en el tamaño y la forma. Esta miocardiopatía chagásica ocurre con mayor frecuencia en personas de 20 a 59 años (42).

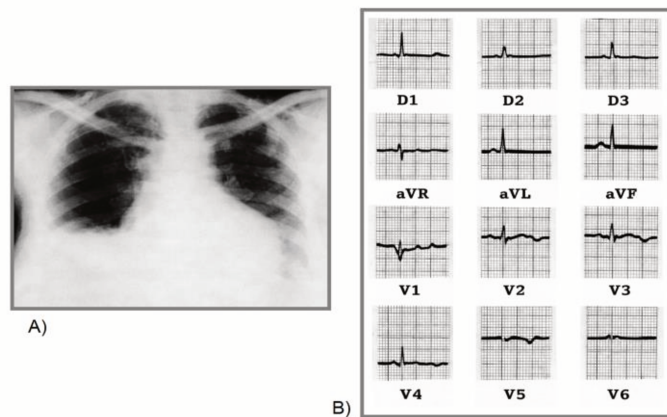


Figura 8: Caso crónico de enfermedad de Chagas adquirida por transfusión sanguínea que muestra radiografía con agrandamiento y signos de insuficiencia cardíaca (A) y electrocardiograma que muestra isquemia miocárdica (B). Figura modificada de (29).

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 (43).

Durante esta fase crónica, el número de parásitos en sangre disminuye, por lo cual el diagnóstico debe enfocarse de otra manera, y requiere de al menos dos pruebas serológicas positivas contra *T. cruzi*. Hay tres tipos de ensayos que se pueden realizar cuando el paciente se encuentra cursando esta fase de la enfermedad: hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Además, es recomendable que se realicen controles periódicos de electrocardiogramas y radiología para buscar signos de manifestaciones cardíacas y/o digestivas (44).

Tratamiento farmacológico de la infección

En la actualidad, se continúa la búsqueda de tratamientos eficaces para la enfermedad de Chagas. Solo se dispone de dos medicamentos aprobados: Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BZ). Ambos son eficaces cuando la enfermedad de Chagas se trata en su fase temprana, pudiendo erradicar el parásito en aproximadamente el 50%-80% de los casos tratados. Sin embargo, la eficacia en la fase crónica, especialmente en etapas avanzadas, es limitada y aún motivo de debate (45). El BZ se administra durante 60 días, en dosis diarias de 5-7,5 mg/kg, mientras que el NFX se administra 8-10 mg/kg por día durante 60-90 días (39).

Ambos fármacos pueden provocar reacciones adversas. No obstante, los niños menores de 12 años muestran una mejor tolerancia a estos medicamentos. En adultos, la incidencia de reacciones adversas es casi el doble (60.9% con NFX y 55% con BZ) en comparación con los niños (29.3% con NFX y 25% con BZ). El NFX se asocia principalmente con la pérdida de peso y efectos adversos psiquiátricos, mientras que el BZ se vincula con reacciones cutáneas y neurológicas. En mujeres embarazadas, no se recomienda el tratamiento debido a que no se conoce bien el riesgo teratogénico que pueden causar estas drogas (46).

Aspectos inmunológicos de la infección por *T. cruzi*

Parámetros de la respuesta inmune efectora

La infección por *T. cruzi* en vertebrados, por vía vectorial u oral, comienza cuando el parásito penetra en el hospedador a través de lesiones en la piel o la mucosa oral. Se estima que el inóculo inicial puede ser pequeño, desde cientos hasta unos pocos miles de parásitos (47). La primera ronda de replicación ocurriría principalmente *in situ*, en los tejidos del hospedador próximos al lugar de ingreso del parásito (48,49). Luego de una replicación inicial, se produce el encuentro con el sistema inmune.

En la inmunidad innata, la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors, PRRs) es fundamental para el control inicial de la parasitemia; en este contexto, destacan los receptores Toll-like (TLR) TLR2/6, TLR4 y TLR9, ya que se ha observado que modelos murinos knock-out (KO) para estos receptores presentan una mayor susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* (50–57). A través de estos PRRs los macrófagos y las células dendríticas (CDs) que patrullan los tejidos pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de *T. cruzi*. Por ejemplo, se ha descrito que extractos lipídicos totales de las cepas RA y K98 inducen una respuesta proinflamatoria a través de TLR2/6 en macrófagos y células HEK (58). Grandes cantidades de glicoinositolfosfolípidos (Glycoinositolphospholipid, GIPL) cubren al parásito. La fracción lipídica de los GIPL, podría ser reconocida por TLR4 e inducir efectos proinflamatorios e inmunomoduladores (54,59). Además, los GIPL podrían activar las células asesinas naturales (NK) y provocar la secreción de anticuerpos por parte de las células B (60,61).

Los anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) unen glicoproteínas a la superficie del parásito (53). Los anclajes de GPI derivados de *T. cruzi* son ligandos de TLR2; e inducen la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α y óxido nítrico (nitric oxide, NO) en células inmunes innatas (53).

Por otro lado, se ha reportado que el ARN del parásito interactúa con TLR7 del hospedador (62), mientras que el ADN CpG no metilado se une a TLR9, un hecho que puede inducir la producción de IL-12p40, TNF- α y NO por células inmunitarias como las células dendríticas del bazo y las derivadas de médula ósea (52,56,57).

De acuerdo con las moléculas secretadas cuando el sistema innato interactúa con *T. cruzi*, se ha descrito que una respuesta inmune protectora debería incluir IFN- γ , IL-12 y NO. Esta observación también se respalda en el hecho de que ratones deficientes en estos componentes inmunitarios, asociados con polarización Th1, son altamente susceptibles a la infección por *T. cruzi* (56).

Los macrófagos cultivados con *T. cruzi* se infectan y lisan fácilmente, mientras que el pretratamiento de macrófagos con IFN- γ disminuye la infección por parásitos mediante un mecanismo que incluye la expresión de iNOS y la producción de NO. Además, se ha demostrado que TNF- α juega un papel sinérgico, potenciando

el efecto del IFN- γ (63). Asimismo, después de reaccionar con superóxido O₂^{•-}, el NO puede formar el agente citotóxico peroxinitrito, el cual podría ser crucial para la eliminación de *T. cruzi* (64,65).

La relevancia de IL-12 y del IFN- γ en la inducción de una respuesta Th1 se refuerza por el papel de las células NK. Se ha reportado que las células NK participan tempranamente secretando IFN- γ e incluso pueden matar al parásito mediante un mecanismo dependiente de contacto (66,67).

Con respecto a la participación de las CDs en la activación de la respuesta inmune efectora, se reportó que la proteína cruzipaina de *T. cruzi* induce la maduración de dichas células mediante la activación del receptor de bradicinina B2, un evento que podría ser importante para la inducción de una respuesta Th1 protectora (68). En este sentido, la transferencia adoptiva de CDs B2R+/+ a ratones B2R-/- rescató las respuestas Th1 y de células T citotóxicas, protegiendo a los animales frente al desafío de infección aguda (68). Además, se describió que otra proteína del parásito, Tc52, era capaz de inducir la maduración de CDs vía TLR2 (69). Asimismo, la invasión por *T. cruzi* conduce a la activación de NFATc1 y maduración de CDs, resultando en la producción de IFN- γ de manera independiente de TLR (56).

En cuanto a la respuesta adaptativa, se ha aportado evidencia de que un perfil Th1 con inducción de una respuesta citotóxica de células T CD8 sería muy importante para la protección (48), lo cual se avaló utilizando modelos murinos KO para células T CD4 y CD8, que son altamente susceptibles a la infección (70). Además, en años recientes se ha sugerido un papel protector de las células T CD4 con perfil Th17 (71). Asimismo, se ha reportado que las respuestas de células B también juegan un papel crítico (70,72,73). Los anticuerpos específicos contra *T. cruzi* también serían importantes para la lisis dependiente de anticuerpos y mediada por complemento, ya que se ha descrito que los tripomastigotes son resistentes a la lisis en ausencia de anticuerpos (74). Se sugirieron varios blancos superficiales, como epítomos α -galactosil (α -gal), para permitir la lisis dependiente de anticuerpos mediada por complemento (75,76).

En conjunto, varias líneas de investigación sugieren que el control de la infección por *T. cruzi* mediante la respuesta inmune efectora depende tanto de la inmunidad innata como adaptativa, involucrando el sistema de complemento, células NK, macrófagos, CDs, linfocitos T y B, y la producción de citoquinas proinflamatorias tipo Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-12, y eventualmente también IL-17 y el perfil Th17 de células T CD4 (38).

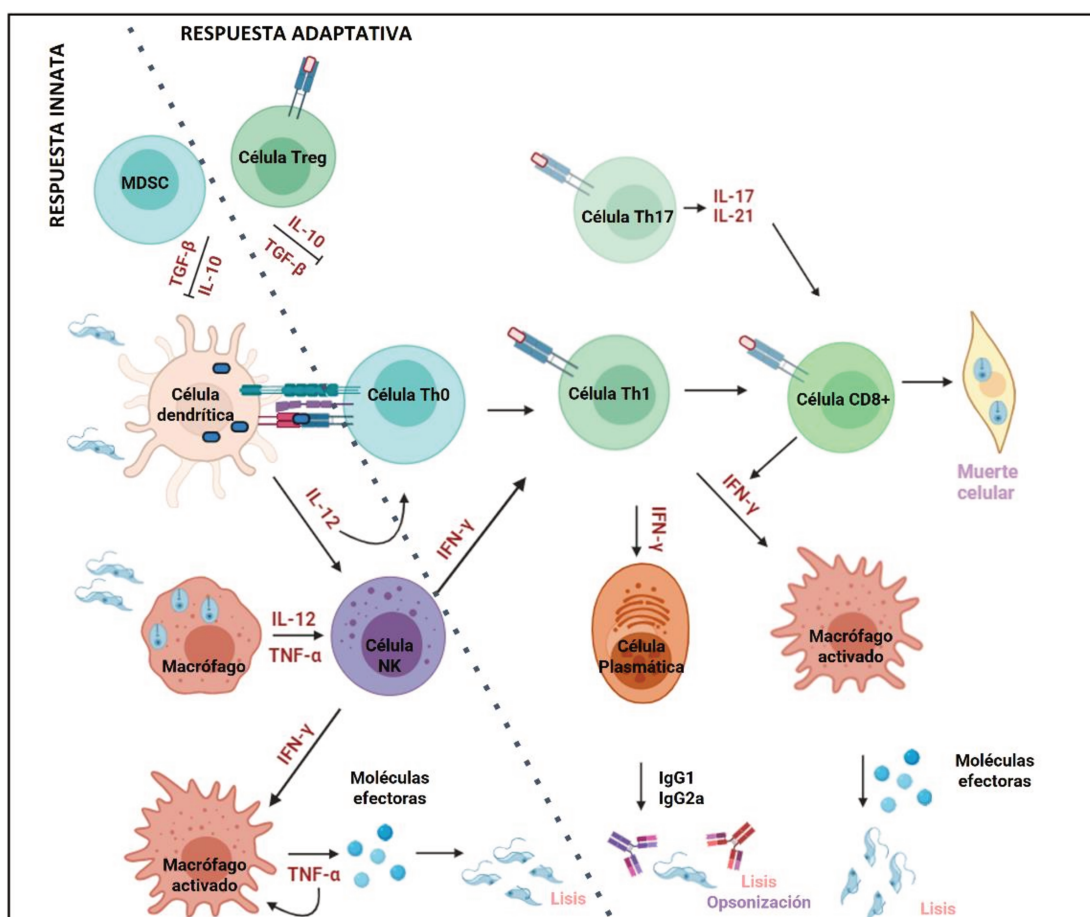


Figura 9: Representación simplificada de la respuesta inmune innata y adaptativa frente a la infección por *T. cruzi*. En la respuesta innata efectora, las CDs, macrófagos y células NK actúan como primera línea de defensa, reconociendo PAMPs del patógeno y secretando IL-12, IFN- γ y TNF- α . En cuanto a la respuesta adaptativa efectora, las CDs participan presentando antígenos a las células Th0, que pueden diferenciarse hacia Th1 —promoviendo la activación de células CD8+ citotóxicas y macrófagos vía IFN- γ — o hacia Th17, con producción de IL-17 e IL-21. Las células plasmáticas secretan anticuerpos IgG1 e IgG2a que median lisis y opsonización del patógeno. Por otra parte, dentro del brazo regulatorio del sistema inmune, las MDSCs pueden participar fundamentalmente dentro de la respuesta innata mientras que las Tregs pueden participar en la respuesta adaptativa, modulando la respuesta inmune, en parte a través de citoquinas como TGF- β e IL-10. Figura modificada de (77).

Sin embargo, en paralelo a la caracterización de los mecanismos efectores, también se ha acumulado importante evidencia sobre numerosos eventos que involucran a la respuesta inmune y que no serían favorables para la eliminación del parásito. Por ejemplo, si bien los macrófagos producen NO y especies reactivas de oxígeno como mecanismos microbicidas (63–65), el parásito expresa enzimas antioxidantes que contrarrestarían estos efectos (78,79). Además, se ha reportado que la activación de los PRRs no sería suficiente para activar de forma eficiente al sistema inmune, lo cual retrasaría la generación de linfocitos T CD8+ específicos (48,55). Asimismo, otro hallazgo característico en la fase aguda es la activación policlonal de linfocitos B, con producción masiva de anticuerpos inespecíficos, lo cual retrasaría la respuesta humoral protectora (72,80,81).

Esta activación es inducida por proteínas parasitarias como la prolina-racemasa, el antígeno SAPA derivado de las trans-sialidasas y el superantígeno Tc24 (82–84).

De este modo, aunque existe abundante evidencia sobre los mecanismos inmunológicos que participan en el control de la infección por *T. cruzi*, también se han descrito múltiples estrategias del parásito para evadir y modular la respuesta inmune, favoreciendo el establecimiento de la infección crónica (48,72,85,86).

Parámetros de la respuesta inmune regulatoria

El sistema inmunológico no solo ha evolucionado para reconocer y eliminar patógenos y células propias alteradas, sino también para evitar respuestas dirigidas contra la microbiota comensal y los tejidos sanos, así como para regular la magnitud y duración de la respuesta efectora con el fin de preservar la integridad tisular del hospedador (87). En este contexto, la respuesta inmune regulatoria constituye un componente esencial del sistema inmune, actuando como un mecanismo de control que limita la inflamación excesiva y previene el desarrollo de inmunopatología.

Desde los primeros trabajos que postularon la existencia de poblaciones celulares con funciones supresoras, se ha acumulado abundante evidencia que demuestra que tanto células de origen linfóide como mieloide participan activamente en la regulación de la respuesta inmune (87–90). Actualmente, se reconoce que la inmunorregulación es un proceso dinámico y altamente contextual, presente en múltiples escenarios fisiológicos y patológicos, incluyendo infecciones agudas y crónicas, cáncer, enfermedades autoinmunes, embarazo, envejecimiento y vacunación (91).

Si bien estos mecanismos son fundamentales para mantener la homeostasis inmunológica, también pueden ser explotados por distintos patógenos para limitar las respuestas efectoras dirigidas en su contra. En este sentido, *T. cruzi* representa un ejemplo de este tipo de patógenos, capaz de modular la respuesta inmune del hospedador, tal como ha sido revisado previamente (92). Entre las poblaciones reguladoras/supresoras con mayor relevancia en la infección por *T. cruzi*, las células T regulatorias CD4⁺Foxp3⁺ (Tregs) (93–95), y las células supresoras de origen mieloide (MDSCs) podrían tener un rol preponderante (91,96,97).

Células Treg: generalidades

Las Tregs representan el paradigma clásico de la inmunorregulación adaptativa. Estas células se caracterizan por la expresión constitutiva del receptor de IL-2 (CD25) y del factor de transcripción Foxp3, cuya función es esencial para su desarrollo y actividad supresora. Se ha demostrado que la ausencia o disfunción de estas células conduce a una activación inmunológica descontrolada y al desarrollo de enfermedades autoinmunes severas, lo que resalta su rol crítico en el mantenimiento de la tolerancia periférica (90).

Desde el punto de vista funcional, las Tregs ejercen su acción inmunosupresora a través de múltiples mecanismos no excluyentes. Estos incluyen la inhibición directa de la proliferación de linfocitos T efectores mediante contacto célula-célula, el consumo de IL-2 del microambiente, y la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β . Además, pueden modular la función de células presentadoras de antígeno, particularmente las CD, promoviendo un fenotipo tolerogénico que limita la activación de respuestas efectoras robustas (87,98).

Debido a su importante papel en la respuesta inmune, numerosos estudios han analizado el rol de estas células durante la infección por *T. cruzi*, así como su influencia en animales vacunados. Las condiciones experimentales empleadas han variado en cuanto a las cepas de ratones empleadas (BALB/c, C57BL/6, C3H/HeJ, ratones A/J, Swiss exocriados), las DTU de las cepas de *T. cruzi* (Tulahuén, cepa Y, Colombiana, Brasil, Yucatán, RA), las dosis de parásitos (50, 100, 1000, 2000, 10.000, 80.000), los enfoques experimentales utilizados para evaluar el papel de las Tregs (depleción con anti-CD25, transferencia adoptiva, tratamiento con IL-2 + dexametasona, depleción de Tregs con toxina diftérica) (95). Si bien los resultados obtenidos parecen depender de los modelos empleados, en términos generales, se observa que estas células o bien no participan significativamente, o bien influyen favoreciendo la supervivencia del hospedador, al limitar la respuesta inmune, incluso a costa de permitir mayor carga parasitaria (95).

Células supresoras de origen mieloide (MDSCs)

Las MDSCs se describen como una población de células de origen mieloide, inmaduras y con una elevada capacidad para suprimir respuestas inmunes. Si bien diversos estudios se focalizaron en poblaciones celulares con características compatibles con MDSCs desde la década del 70 (89), recién en 2007 se consensuó el empleo de la nomenclatura basada en el término MDSCs para referirse a dichas células (99). Evidencia acumulada indica que las MDSCs constituyen una de las poblaciones reguladoras más relevantes del sistema inmune, ya que se ha demostrado su participación tanto en contextos fisiológicos normales (como el embarazo, el envejecimiento o en recién nacidos) como en procesos patológicos (tales como el cáncer, la obesidad, inflamación crónica e infecciones por diversos patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos) (Figura 10) (96,100–102).

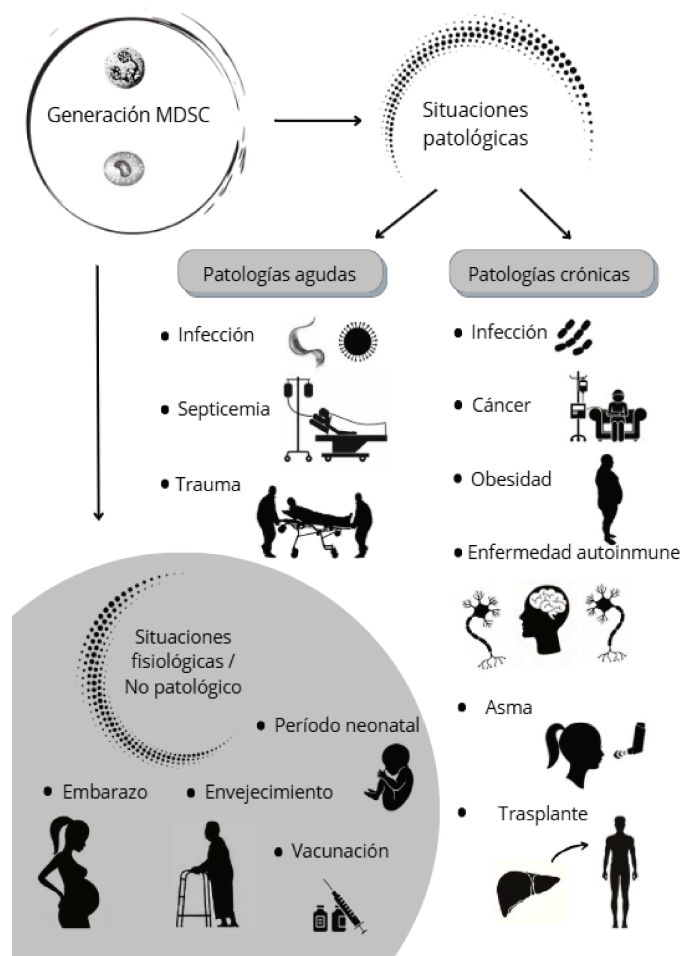


Figura 10: Escenarios fisiopatológicos de la generación de MDSCs. La generación de MDSCs ocurre no sólo en condiciones patológicas, sino también en escenarios fisiológicos y no patológicos. Las condiciones patológicas pueden clasificarse en agudas, como infecciones, sepsis y traumatismos; y crónicas, como infecciones, cáncer, obesidad, enfermedades autoinmunes, asma y trasplantes. Las condiciones fisiológicas y no patológicas incluyen el envejecimiento, el embarazo, el período neonatal y la vacunación. Figura modificada de (96).

Origen de las MDSCs

Las células mieloides, como los neutrófilos y los monocitos, han surgido evolutivamente como componentes de un mecanismo protector crítico del sistema inmune innato. En condiciones de estado estacionario, factores de crecimiento como GM-CSF, G-CSF y M-CSF impulsan la mielopoyesis e inducen la diferenciación de granulocitos y monocitos a un ritmo que garantiza la homeostasis (103,104). Sin embargo, ciertas condiciones pueden afectar la producción de estos factores, lo que, junto con otras moléculas, puede favorecer la expansión de las MDSCs a través de dos vías principales. Por un lado, condiciones agudas (como sepsis o ciertas infecciones) pueden causar una fuerte sobreactivación de los PRRs y la secreción de quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento, reclutando leucocitos hacia el tejido afectado (105). Cuando la patología aguda no se controla adecuadamente, la movilización masiva de leucocitos puede afectar la

homeostasis de la médula ósea, activando una *mielopoiesis de emergencia* para reponer las células innatas inmaduras (100,106), compensando el desequilibrio inflamatorio (107). Por otro lado, patologías crónicas (como cáncer u obesidad) provocan un aumento leve pero persistente de estos factores de crecimiento, favoreciendo la generación de MDSCs (108,109).

Actualmente, el "modelo de dos señales" es el más aceptado para explicar la acumulación y activación de MDSCs. La primera señal es necesaria para la expansión de dichas células e incluye factores como GM-CSF, G-CSF, IL-6 y Gal-1 (107,110,111). La segunda señal, relacionada con la activación celular, incluye citocinas inflamatorias y DAMPs como IFN- γ , IL-1 β , PGE2 y ligandos de TLR (109,111,112).

Marcadores de superficie de las MDSCs

En los seres humanos, las MDSCs se definen como células CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR^{low/-}, distinguiéndose dos subpoblaciones principales, las M-MDSCs CD14⁺ CD15⁻ (MDSC monocíticas) y las PMN-MDSCs CD15⁺ CD14⁻ CD66b⁺ (MDSC polimorfonucleares o granulocíticas) (100,101,109,113). Otros marcadores también han sido propuestos, aunque su uso es limitado todavía, como LOX-1 (113). En modelos murinos, el uso de anticuerpos específicos contra Ly6G y Ly6C permitió una clasificación más precisa de estas células en las mismas subpoblaciones principales descritas en humanos: las PMN-MDSCs o G-MDSCs (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{+/low}) y las M-MDSCs (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺). Si bien tradicionalmente estas células se identifican como CD11b⁺Gr-1⁺, esta estrategia no permite discriminar entre ambas subpoblaciones, ya que el anticuerpo anti-Gr-1 reconoce tanto a Ly6G como a Ly6C, por lo que marca la población de MDSCs total (101,109,113).

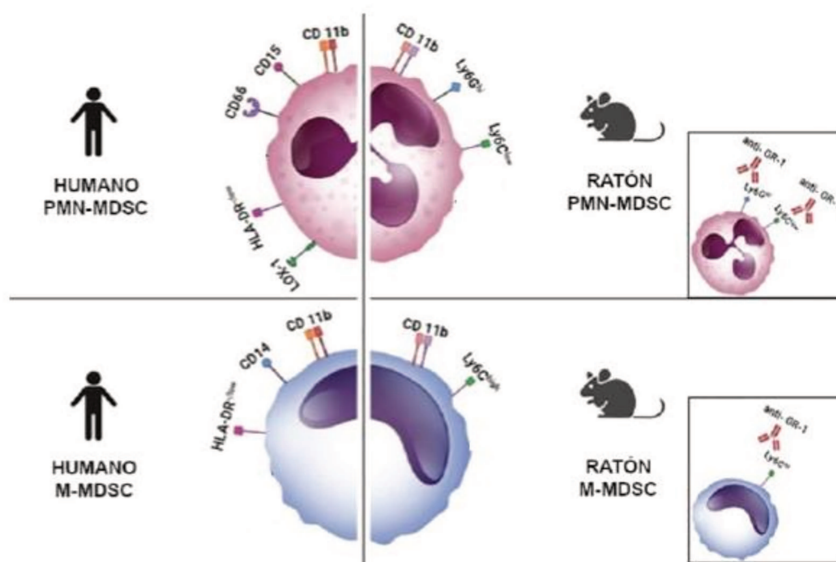


Figura 11: Marcadores de células supresoras de origen mieloide (MDSCs). La figura ilustra los marcadores de superficie de los diferentes subconjuntos de células MDSCs en ratones y humanos. Estos marcadores permiten la

discriminación entre células supresoras de origen mieloide polimorfonucleares (PMN-MDSCs) y células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (M-MDSCs). LOX-1+, receptor de LDL oxidado tipo lectina 1+. Los recuadros pequeños muestran que el anticuerpo anti-GR-1 se une a las moléculas Ly6G y Ly6C. Figura modificada de (114).

Cada subpoblación se asocia fundamentalmente con un perfil molecular particular. En el caso de las M-MDSCs, se observa una elevada expresión de iNOS y arginasa 1 (Arg1), combinación que les confiere rasgos funcionales asociados tanto a macrófagos de tipo M1 como M2. Por su parte, las PMN-MDSCs se caracterizan por una intensa actividad de NOX-2, enzima fundamental para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (97). A pesar de estas diferencias, ambas poblaciones comparten la expresión de diversos mediadores reguladores, entre ellos STAT3 fosforilado, PD-L1, S100A8/A9, IL-10 y GM-CSF, que resultan esenciales para su activación y capacidad supresora (97).

Cabe destacar que, aunque la fenotipificación es útil para su identificación, debido a la similitud de las M-MDSCs con los monocitos, y de las PMN-MDSCs con los neutrófilos, se recomienda evaluar la capacidad supresora de las células mediante ensayos funcionales (97,101,109).

Mecanismos de supresión de las MDSCs

Las MDSCs ejercen una amplia variedad de mecanismos inmunosupresores, que pueden afectar a células T CD4+, T CD8+, linfocitos B, CD8, y células NK, entre otras (Figura 12), lo que las convierte en una población altamente efectiva para modular la respuesta del hospedador. Entre los mecanismos mejor caracterizados se encuentran:

Catabolismo de L-arginina: iNOS y Arg1

Las MDSCs expresan en forma simultánea Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) y Arginasa-1 (Arg1), dos enzimas que utilizan el mismo sustrato: la L-arginina. La actividad de Arg1 agota la L-arginina del microambiente, bloqueando la síntesis de la cadena CD3 ζ , del receptor de las células T (TCR), interfiriendo con la proliferación de los linfocitos T; y la iNOS utiliza la L-arginina para generar NO, una molécula que puede participar en vías metabólicas que interfieren con la señalización del receptor de IL-2 y que pueden inducir apoptosis en linfocitos T activados (97).

En modelos de *T. cruzi*, este mecanismo se ha identificado como uno de los principales responsables de la disminución de la respuesta efectora durante la fase aguda. Se ha demostrado incluso que la expansión descontrolada de M-MDSCs puede llevar a niveles críticos de depleción de L-arginina, afectando de manera sistémica la fisiología del hospedador y contribuyendo a la mortalidad si no se restablece su disponibilidad (97).

Producción de ROS y peroxinitritos

Las PMN-MDSCs, mediante la actividad de NADPH oxidasa 2 (NOX-2), generan grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden reaccionar con NO para formar peroxinitritos (ONOO⁻). Estos compuestos, nitratan residuos de tirosina en el TCR, afectando su estructura y disminuyendo la afinidad por el complejo péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (péptido-MHC). Además, pueden bloquear la migración de los linfocitos T al nitrar quimioquinas como CCL2 involucradas en el tráfico celular (108,115).

Modulación de CDs

Las MDSCs pueden ejercer efectos inmunosupresores mediante la modulación de CDs. En un modelo de vacunación con *Mycobacterium tuberculosis* inactivada por calor se describió que la inmunización repetida indujo la expansión de MDSCs monocíticas (M-MDSCs) en el bazo, las cuales, tras una señal inflamatoria secundaria, se activaron y expresaron iNOS, produciendo NO (116). Estas M-MDSCs activadas migraron hacia las zonas ricas en linfocitos T de la pulpa blanca esplénica, donde establecieron un contacto estrecho con CDs convencionales y plasmacitoides, induciendo su apoptosis de manera dependiente de NO.

La disminución de CDs funcionales compromete la presentación antigénica y la provisión de señales coestimuladoras, lo cual puede conducir a generar un microambiente tolerogénico que limita la activación de linfocitos T efectores y favorece la inducción de respuestas regulatorias (116).

Otros mecanismos

A estos mecanismos fundamentales se suman otros procesos, como la producción de TGF- β , la inducción de COX-2 y PGE2, la depleción de cisteína y triptófano, inducción de células Treg, entre otros, todos ellos capaces de modular y suprimir diferentes componentes de la inmunidad innata y adaptativa (Figura 12) (94,111,112,114,117).

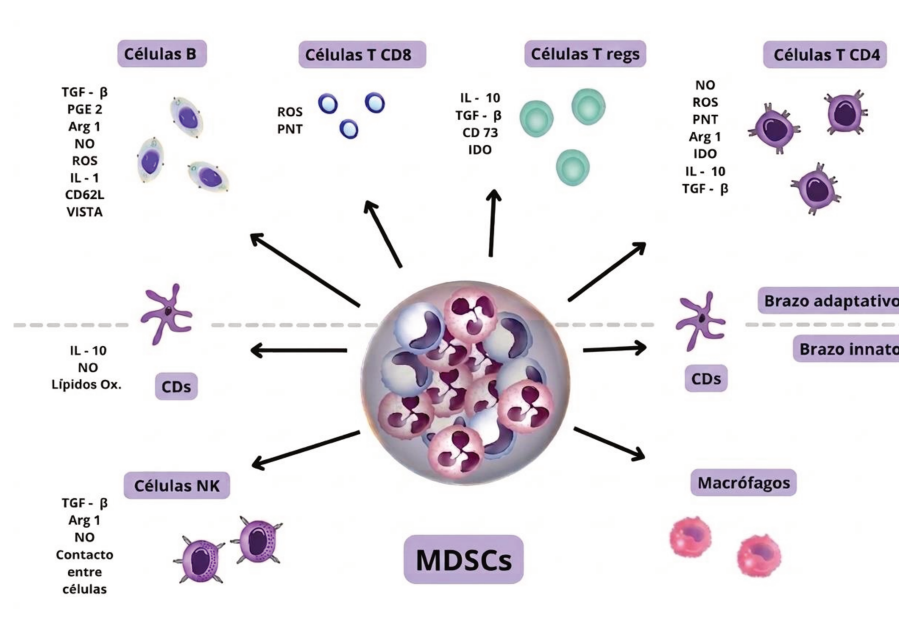


Figura 12: Mecanismos supresores de las MDSCs. Las MDSCs pueden influir sobre varios tipos de células inmunitarias, tanto del brazo innato como adaptativo, a través del contacto célula a célula y la secreción de diversas moléculas antiinflamatorias. A su vez, pueden afectar la función de varias proteínas y la migración celular. Los mecanismos de supresión de las MDSC son diversos y pueden ejercer su acción de manera específica o no específica. Abreviaturas: TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; PGE2, Prostaglandina E2; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas de oxígeno; IL-1, interleucina 1; IL-10, interleucina 10; CD62L, grupo de ligando de diferenciación 62; CD73, grupo de diferenciación 73; IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa; ARG-1, Arginasa-1; PNT, peroxinitrito; VISTA, dominio Ig supresor de la activación de células T. Figura modificada de (114).

Rol de las MDSCs en la infección por *T. cruzi*

La infección por *T. cruzi* implica un desafío complejo para el sistema inmune. Durante la fase aguda, observaciones realizadas fundamentalmente en modelos experimentales aportan evidencia de que el parásito logra inducir un estado de profunda inmunosupresión en el hospedador, acompañado de un notable aumento de la frecuencia de células CD11b⁺Gr-1⁺ en bazo, hígado y corazón.

Dichas células fueron identificadas como MDSCs funcionales (97,118), incluso desde el año 2002, a partir de estudios llevados a cabo en modelo de ratones Sv129 y C57BL/6 infectados con parásitos Tulahuén (119). Los autores mostraron que las células CD11b⁺Gr-1⁺ purificadas de animales infectados suprimen la proliferación de células T, mediante un mecanismo que dependía del NO. Además describieron que los aumentos de MDSCs era dependiente de IFN- γ , dado que los ratones deficientes en el receptor de IFN- γ (IFN- γ R^{-/-}) no mostraron aumentos de células CD11b⁺Gr-1⁺ supresoras tras la infección (119).

Luego, el grupo de Gea y colaboradores comparó la expansión de MDSCs en la infección de ratones BALB/c vs C57BL/6 infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* (118). Los ratones C57BL/6, que son más

susceptibles a dicha cepa, mostraron incrementos menores de MDSCs que los BALB/c, los cuales presentaron niveles más altos de MDSCs y una mayor supervivencia tras la infección, sugiriendo que dichas células cumplían un rol importante permitiendo la mayor supervivencia del huésped (118).

Las MDSCs aisladas expresaron niveles elevados de la enzima iNOS y de la subunidad p47phox de la NADPH oxidasa; en consecuencia, se demostró nuevamente que la supresión dependía del NO, pero también de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Además, los autores detectaron nitración de tirosinas en la superficie de las células T CD8 y CD4, lo que demuestra la participación del peroxinitrito (PNT) en el mecanismo de supresión (118).

Se observó que el aumento de las MDSCs dependía de la IL-6, ya que en ratones KO para IL-6 se detectó un incremento tres veces menor en el número de estas células.

Para estudiar el papel fisiológico de las MDSCs, se depletaron dichas células en los días 10 y/o 15 post-infección con 5-fluorouracilo (5FU), utilizando una dosis que ha sido descrita en diversos trabajos para depletar MDSCs de forma selectiva (120,121). De manera interesante, la supervivencia de los animales infectados disminuyó drásticamente en los animales depletados de MDSCs, aportando importante evidencia de que estas células cumplen un papel no menor en la infección, y sugirieron que tendrían un rol en la resolución de la inflamación (118). Los animales depletados mostraron niveles más altos de citoquinas inflamatorias, como IL-6 e IFN- γ , un mayor número de células Th1 (CD4+IFN- γ) y Th17 (CD4+IL-17A+) sugiriendo que *T. cruzi* se beneficia de la presencia de las MDSCs para evitar la inducción de una respuesta inmune efectora más potente por parte del hospedador (118).

De este modo, el aumento de MDSCs observado durante la infección podría no constituir únicamente una consecuencia secundaria del proceso inflamatorio. Por el contrario, podría reflejar un mecanismo activo de modulación inmunológica manipulado por el parásito de modo de disminuir la respuesta efectora e inflamatoria, favoreciendo tanto la supervivencia del huésped como su propia persistencia.

Diseño racional de vacunas

La vacunación profiláctica tiene como objetivo principal inducir una respuesta inmune protectora contra un patógeno determinado sin generar la enfermedad y las posibles complicaciones que esta pueda conllevar (122). Por ende, con este fin, las vacunas profilácticas están diseñadas para activar el sistema inmune, de manera similar a la que ocurre en la interacción con un determinado agente infeccioso (123).

Las vacunas actúan iniciando una respuesta inmune innata, que a su vez activa una respuesta inmune adaptativa específica de antígeno. Dependiendo de la naturaleza de la infección y de la enfermedad, 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 el ingreso, la replicación o la producción de toxinas de los patógenos (124).

Las vacunas se consideran uno de los mayores logros en la salud pública en el último siglo. Se ha estimado que salvan más de 2 millones de vidas por año y han reducido en gran medida la incidencia de varias enfermedades importantes como la poliomielitis y el sarampión (125).

Las vacunas suelen considerarse como medios de protección individual, pero también ofrecen beneficios colectivos al reducir la transmisión del agente infeccioso y disminuir las probabilidades de exposición entre las personas no vacunadas. Este efecto indirecto, conocido como protección de rebaño o inmunidad comunitaria, se logra cuando una proporción significativa de la población (entre el 75 % y el 95 %, según el patógeno), o un grupo clave en la propagación de la enfermedad, recibe la vacunación (122).

Características de las vacunas

Existen tres factores claves a tener en cuenta a la hora de realizar el diseño de una vacuna, los cuales son: el inmunógeno, el adyuvante y el sistema de administración (Figura 13).



Figura 13: Triada fundamental de la formulación vacunal. Esquema representativo de los elementos clave de una vacuna: inmunógeno, adyuvante y sistema de administración, cuya interacción determina la magnitud, calidad y duración de la respuesta inmune inducida. Figura de autoría propia.

Inmunógeno: sustancia capaz de producir una respuesta inmune específica, con el fin de combatir cada patógeno puntual. Su elección es fundamental en el diseño de una vacuna, ya que debe considerarse la antigenicidad y la utilidad que tiene el inmunógeno para proteger contra distintas cepas de un patógeno. Pero solo la prueba empírica permite evaluar la funcionalidad de cada inmunógeno (124).

Adyuvante: sustancias que se agregan a la vacuna para potenciar al inmunógeno o redirigir su acción a un determinado perfil de respuesta inmune. Los adyuvantes se clasifican en vehículos, inmunoestimulantes, o aquellos que comparten ambas propiedades (Tabla 1). Los vehículos pueden transportar al antígeno y a la vez sirven de matriz, mientras que los inmunoestimulantes son capaces de actuar directamente sobre el sistema inmune (126).

Tabla 1: Clasificación de adyuvantes. Tabla extraída y adaptada de (126).

Tipo	Adyuvante / Formulación
Vehículos	
<i>Sales minerales</i>	• Sales de aluminio (alumbre) • Fosfato de calcio
<i>Emulsiones</i>	• Adyuvante incompleto de Freund (IFA) • MF59 • AS03
<i>Micropartículas</i>	• Virosomas • PLA (ácido poliláctico), PLGA (poli[ácido láctico-co-glicólico]) • Partículas tipo virus (VLPs)
Inmunostimulantes	
<i>Agonistas de PRR (TLR y NLR)</i>	• Monofosforil lípido A (MPL) • Lipopolisacárido (LPS) • Flagelina • Imidazoquinolinas: imiquimod (R837), resiquimod (R848) • Poly(I:C), Poly-ICLC • Oligodesoxinucleótidos CpG (ODN) • Dipéptido muramil (MDP) • Saponinas (QS-21)
Adyuvantes mucosales	
<i>Adyuvantes mucosales</i>	• Toxina colérica (CT) • Enterotoxina termolábil (LTK3 y LTR72) • Quitosano

Sistema de administración: Incluye la vía de administración y la dosis empleada. Existen diversas rutas empleadas por una vacuna, las cuales pueden ser subcutánea, intradérmica, intramuscular, nasal, oral, entre otras (127).

Tipos de vacunas

Existe una gran variedad de estrategias y pueden clasificarse de distintas maneras (Figura 14), incluyendo:

- **Vacunas vivas atenuadas:** estas vacunas se desarrollan a partir de microorganismos cuya virulencia ha sido reducida experimentalmente, de modo que su capacidad de provocar enfermedad queda prácticamente eliminada. Al replicarse en el organismo de manera similar a una infección natural, inducen una respuesta inmune robusta y duradera, comparable a la generada por el patógeno original, frecuentemente tras una única dosis (128). No obstante, presentan ciertas limitaciones y riesgos. En casos poco frecuentes, la vacunación puede ocasionar una forma leve de la enfermedad, con síntomas

atenuados respecto a los de la infección natural. Por ello, su uso está contraindicado en personas inmunocomprometidas, ya que existe el riesgo de una replicación no controlada del agente vacunal. Asimismo, no deben administrarse durante el embarazo debido al peligro de infección fetal y transmisión vertical, como se ha descrito en el caso de la rubéola o la varicela (122).

- **Vacunas no vivas y estrategias modernas:** como su nombre indica, estas vacunas no contienen partículas vivas ni infecciosas, por lo que no pueden causar enfermedad ni reactivarse, siendo seguras incluso en personas inmunodeprimidas (122). Su principal limitación es que la inmunogenicidad y la duración de la protección son, en general, menores que en las vacunas vivas, por lo que suelen requerir múltiples dosis o el empleo de adyuvantes. Estas vacunas impulsan las respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos y células a través de dosis primarias y refuerzos regulares, y pueden contener patógenos completos inactivados o únicamente componentes específicos de ellos (128,129).
 - **Vacunas inactivadas:** elaboradas con microorganismos enteros inactivados mediante métodos físicos o químicos —como calor, radiación o formaldehído—, de modo que no pueden multiplicarse ni diseminarse, pero conservan su inmunogenicidad y el sistema inmunitario puede reconocer al patógeno objetivo (122,129).
 - **Vacunas de subunidad:** se elaboran empleando componentes específicos del patógeno en lugar del microorganismo completo. Estos componentes funcionan como antígenos y pueden ser proteínas, polisacáridos o fragmentos virales capaces de autoensamblarse en partículas similares a virus. En general, provocan menos efectos adversos que las formuladas con patógenos vivos o inactivados; sin embargo, su inmunogenicidad suele ser menor dado el número limitado de antígenos incluidos y la posible eliminación de activadores de la inmunidad innata durante el proceso de purificación (122,128).
 - **Vacunas toxoides:** utilizadas frente a patógenos cuya patogenicidad depende de la liberación de exotoxinas —como el tétanos o la difteria—, estas vacunas consisten en toxinas inactivadas con formaldehído que conservan su capacidad antigénica. Su administración induce la producción de anticuerpos anti-toxoide capaces de neutralizar la toxina circulante, sin riesgo de infección ni reversión a la forma virulenta (128,129).
 - **Vacunas de polisacáridos y conjugadas:** algunos patógenos bacterianos capsulados son reconocidos principalmente por sus polisacáridos superficiales. Las vacunas de polisacáridos puros generan respuestas T-independientes de corta duración y escasa eficacia en menores de dos años; este problema se supera con las vacunas conjugadas, en las que el polisacárido se une covalentemente a una proteína transportadora, convirtiendo la respuesta en T-dependiente e induciendo memoria inmunológica de largo plazo (128).
 - **Partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés):** consisten en estructuras proteicas autoensambladas que imitan la morfología del virión nativo pero carecen de material genético,

por lo que no son infecciosas ni pueden replicarse. Su alta similitud estructural con el patógeno las hace especialmente inmunogénicas (128).

- **Vesículas de membrana externa (VME):** son nanovesículas esféricas liberadas naturalmente por bacterias gram negativas que contienen proteínas, lípidos y otros componentes de la membrana bacteriana externa. Al presentar múltiples PAMPs, actúan simultáneamente como antígeno y como adyuvante natural (128).
- **Vectores virales:** estas vacunas emplean un virus recombinante —replicante o no— modificado genéticamente para eliminar sus genes de virulencia e incorporar el gen que codifica el antígeno del patógeno objetivo. La presentación del antígeno en combinación con señales propias del vector mimetiza una infección natural e induce respuestas humores y celulares robustas, generalmente sin necesidad de utilizar un adyuvante exógeno (128).
- **Vacunas de ADN y ARN:** las vacunas de ADN se basan en plásmidos bacterianos que codifican antígenos del patógeno, regulados por promotores eucariotas. Para que sean funcionales, el ADN debe ingresar al núcleo de las células del huésped e inducir la expresión del antígeno *in vivo*, lo que permite su presentación en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el reconocimiento por parte de las células T (130). Esta estrategia implica un riesgo mínimo de integración en el ADN celular. En cambio, en las vacunas de ARN, el material genético no necesita ingresar al núcleo y el riesgo de integración en el genoma del huésped es mínimo (131). Existen dos tipos principales de ARN utilizados como vacunas: el ARNm no replicante y el ARN autoamplificador derivado de virus. Las vacunas basadas en ARNm codifican el antígeno de interés flanqueado por regiones no traducidas (UTR) 5' y 3', mientras que los ARN autoamplificadores codifican además la maquinaria de replicación viral, lo que permite la amplificación intracelular del ARN y una expresión proteica más abundante (129,131).
- **Vacunas basadas en células dendríticas (CDs):** esta plataforma se basa en primero obtener estas células —por ejemplo, a partir de médula ósea—, para luego activarlas *ex vivo* mediante estímulos inflamatorios como el lipopolisacárido (LPS) y cargarlas con antígenos específicos del patógeno. Una vez reintroducidas en el organismo, estas células activan directamente a los linfocitos T específicos, incluyendo a los CD8+ citotóxicos, para reconocer y eliminar al patógeno (132,133). Estudios recientes han demostrado que esta estrategia puede generar una memoria inmunológica y conferir protección parcial contra parásitos complejos como *T. cruzi*, aunque su efectividad puede variar según factores biológicos como el sexo del huésped (133).

Tipo de vacuna		Vacunas licenciadas que utilizan esta tecnología	Presentada por primera vez
Atenuada en vivo (debilitada o inactivada)		Sarampión, paperas, rubéola, fiebre amarilla, influenza, poliomielitis oral, tifoidea, encefalitis japonesa, rotavirus, BCG, varicela zóster	1798 (viruela)
Organismo entero muerto		Poliomielitis inactivada de célula entera (WCV), polio, influenza, encefalitis japonesa, hepatitis A, rabia	1896 (tifoidea)
Toxoide		Difteria, tétanos	1923 (difteria)
Subunidad (proteína purificada, proteína recombinante, polisacárido, péptido)		Tos ferina, influenza, hepatitis B, meningocócica, neumocócica, tifoidea, hepatitis A	1970 (ántrax)
Partícula similar a virus		VPH (Virus del papiloma humano)	1986 (hepatitis B)
Vesícula de membrana externa		Meningocócica del grupo B	1987 (meningocócica del grupo B)
Conjugado de proteína-polisacárido		<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B, neumocócica, meningocócica, tifoidea	1987 (<i>H. influenzae</i> tipo b)
Con vector viral		Ébola	2019 (Ébola)
Vacuna de ácido nucleico		SARS-CoV-2	2020 (SARS-CoV-2)
Con vector bacteriano		Experimental	—
Célula presentadora de antígeno		Experimental	—

Figura 14: Tipos de vacunas. Representación esquemática de los distintos tipos de vacunas contra patógenos. Figura modificada de (128).

Desarrollo de vacunas contra *T. cruzi*

En la actualidad existen diversas estrategias para controlar la EC, basadas principalmente en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento. El método más utilizado continúa siendo el control vectorial de *T. cruzi*, complementado con la vigilancia en bancos de sangre mediante técnicas serológicas (29,42). Sin embargo, a pesar de estas medidas, la erradicación y el control de la infección siguen enfrentando importantes dificultades debido a la persistencia de reservorios en animales domésticos, la cronicidad de la infección en personas afectadas y la falta de tratamientos de probada efectividad (134). Estos factores resaltan la necesidad de diseñar una vacuna preventiva que constituya una alternativa viable para el control de la enfermedad (135).

A pesar de que las vacunas han demostrado ser herramientas altamente efectivas para disminuir la morbilidad de numerosas enfermedades infecciosas, aún existe un número considerable de patógenos para los cuales no se dispone de formulaciones eficaces (124). Muchos de estos agentes comparten características como una marcada variabilidad genética, ciclos de vida complejos y la capacidad de evadir o modular la respuesta inmune del huésped (92), rasgos que se asocian en gran medida con *T. cruzi* y que podrían explicar, al menos en parte, el retraso en el desarrollo de una vacuna licenciada contra este patógeno.

Se ha mencionado que una vacuna eficaz debería considerar los dos estadios evolutivos de *T. cruzi* más relevantes en la infección en mamíferos: el amastigote intracelular y el tripomastigote extracelular. La generación de inmunógenos capaces de inducir respuestas protectoras frente a estos estadios permitiría atenuar o interrumpir la progresión de la enfermedad en los hospedadores (136). Asimismo, un conocimiento profundo de las interacciones entre el parásito y el sistema inmune resulta indispensable para el diseño racional de candidatos vacunales. Existe consenso en que una vacuna efectiva debería inducir una fuerte activación de la inmunidad celular tipo Th1, promover la activación adecuada de células presentadoras de antígeno (como CD₈ y macrófagos) y generar linfocitos T CD8⁺ citotóxicos funcionales, acompañados de una respuesta humoral eficaz y de mecanismos reguladores capaces de limitar el daño tisular (137).

Los primeros intentos de vacunación contra *T. cruzi* se remontan a 1912, cuando se observó que animales que superaban la fase aguda adquirían resistencia a nuevas infecciones. A partir de estas observaciones se ensayaron múltiples estrategias. Entre las más tempranas se incluyeron inmunizaciones con tripanosomas inactivados mediante procedimientos químicos (Timerosal, formalina) o físicos (sonicación, congelamiento, irradiación); sin embargo, los niveles de protección obtenidos fueron limitados (138). En la década de 1950 comenzaron a explorarse vacunas basadas en cepas atenuadas de *T. cruzi*, obtenidas mediante tratamientos farmacológicos o pasajes seriados en cultivo. Más recientemente, el avance en la ingeniería genética ha permitido el desarrollo de parásitos vivos con atenuación dirigida mediante la eliminación de genes específicos. Estas cepas genéticamente atenuadas (GAPs) representan una evolución frente a las aproximaciones clásicas, ya que buscan garantizar la seguridad biológica mediante mutaciones estables que impiden la reversión a la virulencia, al tiempo que mantienen la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria completa y duradera, mimetizando el curso de una infección natural (139,140). Aunque estas aproximaciones generaron respuestas inmunitarias robustas y duraderas, debido a los riesgos de seguridad estos avances no han alcanzado todavía fases clínicas (141). Hacia finales del siglo XX se evaluaron otras estrategias, como inmunizaciones con epimastigotes de *T. rangeli* o *Phytomonas serpens*, que lograron reducir la parasitemia en modelos animales (142,143). Paralelamente, se avanzó en la identificación y purificación de componentes inmunogénicos de *T. cruzi*, observándose que la fracción flagelar confería protección, así como diversas glicoproteínas y antígenos de membrana evaluados posteriormente (144).

En las últimas décadas se ha intensificado el desarrollo de candidatos vacunales, evaluándose prácticamente todas las plataformas disponibles (vacunas atenuadas, inactivadas, de subunidades, ADN,

vectores virales, entre otras) Estos esfuerzos han permitido delinear un panorama amplio de estrategias inmunizantes y han puesto de manifiesto los desafíos asociados a la compleja biología del parásito, su ciclo de vida, su extensa diversidad genética y la ausencia de correlatos inmunológicos de protección claramente establecidos (145).

El reconocimiento de las limitaciones de las terapias actuales, particularmente su eficacia restringida en la fase crónica y los efectos adversos asociados, ha reforzado la necesidad de una vacuna capaz de complementar o incluso sustituir la terapia. Los avances recientes en inmunología, la caracterización detallada de antígenos parasitarios y el desarrollo de nuevas plataformas vacunales han impulsado el diseño de prototipos capaces de inducir respuestas celulares robustas de tipo Th1 y mediadas por linfocitos T CD8⁺, fundamentales para controlar la replicación de *T. cruzi*. Entre los candidatos más prometedores se encuentran los antígenos Tc24, TSA-1, ASP-2 y diversas trans-sialidasas (TS), utilizados en combinación con vectores adenovirales, ADN plasmídico, ARN mensajero, y adyuvantes de cajas lipídicas, entre otros, que han sido ampliamente revisados en la bibliografía (141,146,147), con resultados alentadores tanto en estrategias profilácticas como terapéuticas (147).

Pese a estos avances, el desarrollo de una vacuna contra *T. cruzi* enfrenta desafíos persistentes. Entre los obstáculos más relevantes se encuentran la exigencia tradicional de lograr inmunidad estéril como criterio de eficacia, la falta de modelos animales que reproduzcan adecuadamente la patogenia humana, la dificultad para establecer parámetros confiables y la elevada variabilidad antigénica del parásito derivada de sus familias multigénicas. A ello se suman limitaciones regulatorias y económicas que han dificultado la transición hacia ensayos clínicos. No obstante, el progreso alcanzado en biología molecular, inmunología y plataformas de vacunación de nueva generación permite concebir vacunas cuyo objetivo no necesariamente sea la erradicación total del parásito, sino la reducción sostenida de la carga parasitaria, la modulación de la inflamación crónica y la prevención del daño tisular (148).

En conjunto, los resultados obtenidos hasta el momento, sumados a nuevas herramientas informáticas (149), aportan fundamentos para respaldar el desarrollo de una vacuna contra *T. cruzi*. Las estrategias modernas permiten considerar tanto formulaciones profilácticas dirigidas a poblaciones en riesgo como vacunas terapéuticas destinadas a modificar el curso de la infección crónica. Su implementación podría reducir la incidencia de nuevas infecciones, limitar la progresión hacia formas clínicas graves y complementar de manera efectiva las terapias existentes. Aunque varios candidatos han demostrado efectos protectores (como disminución de la parasitemia y aumento de la supervivencia en modelos experimentales), aún no han alcanzado fases avanzadas (II/III) de pruebas clínicas. De lograrse, una vacuna profiláctica representaría un avance fundamental en el control integral de la EC al ofrecer la posibilidad de prevenir la infección en humanos (114).

Candidato vacunal: *Trans-sialidasa*

Para establecer una infección persistente, *T. cruzi* debe evitar ser eliminado por el sistema inmune del huésped. Para ello, el parásito evolucionó múltiples mecanismos de evasión y subversión, entre los que se incluyen la capacidad de instalarse en un nicho intracelular de replicación y la generación de formas persistentes o latentes (150).

Una de las estrategias más relevantes de evasión es la manipulación del ácido siálico (AS) en la superficie celular. Los AS constituyen una familia de monosacáridos de nueve carbonos que, en los mamíferos, suelen localizarse en los extremos de las cadenas de oligosacáridos de glicoconjugados presentes en la membrana o secretados. Los dos tipos predominantes en vertebrados son el ácido N-acetilneuramínico y el ácido N-glicolilneuramínico. Mediante el aprovechamiento y remodelación de estas moléculas, *T. cruzi* modula su interacción con el hospedador y contribuye a evadir la respuesta inmune (151,152).

Dado que *T. cruzi* carece de la capacidad de sintetizar AS de novo, el parásito depende de su adquisición desde el hospedador mediante la actividad de una enzima exclusiva, la trans-sialidasa (TS). Esta enzima reconoce residuos terminales de AS unidos en configuración $\alpha 2,3$ a β -galactopiranosas (β Galp) presentes en glicoconjugados del hospedador, y los remueve para posteriormente transferirlos a aceptores en la superficie parasitaria (151,152).

A diferencia de las sialidasas clásicas, que solo hidrolizan estos enlaces, la TS cataliza la generación de estructuras AS $\alpha 2-3\beta$ Galp semejantes a los glicanos asociados a proteínas tipo mucina expuestas en la membrana del parásito, contribuyendo así a su revestimiento sialilado (151).

La presencia de estas estructuras ricas en AS en la superficie de los tripomastigotes es fundamental para su infectividad y protección frente a mecanismos efectores del hospedador. De hecho, las modificaciones inducidas por la TS en el sialilfenotipo del hospedador se han asociado con disfunciones inmunológicas, alteraciones hematológicas y una mayor susceptibilidad a la infección y progresión de la enfermedad de Chagas (151).

Considerando su papel central en la patogénesis y la ausencia de una enzima equivalente en mamíferos, la TS se destaca como un blanco particularmente atractivo para el diseño de nuevas terapias y estrategias vacunales contra *T. cruzi* (95).

La TS de *T. cruzi* constituye una extensa y altamente diversa superfamilia génica, integrada por más de 1400 genes polimórficos organizados en ocho grupos. Dentro de ellos, solo los miembros del grupo I poseen actividad trans-sialidasa propiamente dicha (153). Su actividad enzimática depende críticamente de una tirosina (Tyr) localizada en el residuo 342 o 343 de la proteína, cuya presencia es indispensable para la funcionalidad catalítica (154).

La expresión de la TS es predominantemente elevada en los tripomastigotes, etapa en la cual puede encontrarse asociada a la membrana parasitaria, incorporada en vesículas extracelulares liberadas por el parásito o secretada al medio, pudiendo detectarse también como proteína soluble en el torrente sanguíneo del hospedador (23).

La TS contiene un dominio repetitivo conocido como SAPA (“Shed Acute Phase Antigen”), que favorece una mayor vida media de la enzima cuando se encuentra libre en el espacio extracelular. Este dominio está constituido por múltiples repeticiones en tándem de doce aminoácidos localizadas en el extremo carboxilo de la proteína, lo que convierte a SAPA en un antígeno capaz de inducir anticuerpos específicos tanto durante la fase aguda como en la fase crónica de la infección (155). Dichos anticuerpos anti-SAPA no logran neutralizar la actividad de la TS. Por eso, se ha propuesto que la función de este dominio inmunodominante consiste en “desviar la atención” del sistema inmune, retrasando así la generación de una respuesta humoral neutralizante dirigida contra el sitio activo de la enzima (156).

La TS se ha empleado como candidato vacunal en diversos trabajos (93,157,158). Varios estudios se formularon con la forma activa de la proteína, logrando una reducción en la parasitemia, después del desafío con *T. cruzi*. Pero, al emplear la forma activa de la TS como inmunógeno, se puede producir un daño tisular similar al causado por la enzima durante la infección (159). Por dicho motivo, desde los estudios iniciales realizados en nuestro laboratorio, se emplearon como antígeno a variantes inactivas de la TS, y que además no contengan el dominio SAPA (93,157,160,161), formulados con adyuvantes basados en jaulas lipídicas como ISCOMATRIX™ e ISPA (162).

Estos desarrollos lograron resultados promisorios en términos de protección, logrando una supervivencia del 90% en modelos murinos, una reducción significativa de la parasitemia y una disminución del daño por fibrosis en el tejido cardíaco durante la fase crónica (161,163). Asimismo, al comparar la eficacia de este candidato con otras formulaciones, se determinó que la variante basada en la TS inactiva posee una capacidad protectora superior a otros antígenos del parásito, como la proteína flagelar repetitiva (FRA) o la cruzipaina (163).

Posteriormente, se avanzó en el desarrollo de un candidato vacunal con una secuencia menor, que permita la expresión en sistemas de entrega mediante bacterias recombinantes, ya que la eficiencia de expresión heteróloga mejora con secuencias menores a 1000 pares de bases. (163,164).

Con este fin se obtuvo un fragmento de la TS que incluyera una fracción de 290 aminoácidos (TSf, desde el residuo 338 al 627), con un 90% de identidad aminoacídica con la secuencia de referencia (GenBank AJ276679). La reducción del tamaño permitió generar una variante que careciera del dominio amino-terminal, necesario para unir galactosa como parte de su actividad catalítica, manteniendo una secuencia clave del extremo COOH terminal, denominada FLY (VTVXNVFLYNR) (165,166), que participa en el proceso de invasión de las células del huésped y que se ha descrito que aumenta la virulencia del parásito (167). Además,

se omitió completamente el dominio SAPA localizado en el extremo carboxilo (COOH), con el fin de evitar la respuesta de anticuerpos 'distractores' que genera dicha región, como ya se mencionó anteriormente (164).

El estudio de Prochetto y colaboradores (164) reportó que la inmunización con TSf-ISPA no solo indujo una respuesta efectora robusta (caracterizada por altos niveles de anticuerpos IgG2a, respuesta DTH y aumento de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ en el bazo), sino que también influyó sobre el brazo regulatorio del sistema inmune, afectando a poblaciones como las células CD11b+Gr-1⁺ con fenotipo de células MDSCs tanto durante la inmunización, como luego de la infección, y a las células Treg Foxp3⁺ luego de la infección (164).

Depleción de MDSCs durante la infección por *T. cruzi* de animales vacunados con TSf-ISPA

Como se describió anteriormente, la utilización experimental del 5FU como herramienta para la depleción de MDSCs ha aportado importante evidencia de la relevancia funcional de estas células durante la infección por *T. cruzi* (118). De acuerdo a este antecedente, en nuestro laboratorio comenzó a estudiarse si la vacuna TSf-ISPA tenía influencia sobre el brazo regulatorio del sistema inmune, analizando alteraciones de las Tregs Foxp3⁺ y MDSCs en los animales vacunados. En particular, se observó que los animales vacunados con TSf-ISPA y depletados de MDSCs durante la infección por *T. cruzi*, generaron una mayor respuesta inmune efectora, caracterizada por un aumento en la activación de linfocitos T CD8⁺, con mayor expresión de marcadores de activación y citotoxicidad, mayor producción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , y un cambio en el perfil de maduración de CDs, evidenciado por alteraciones en la expresión de moléculas coestimuladoras y del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (168). Incluso se observó un aumento de células Tregs Foxp3⁺ en los animales vacunados con TSf-ISPA, infectados, y depletados de MDSCs, en relación a los animales, infectados, vacunados, pero no depletados de dichas células. De acuerdo a esto, los resultados sugirieron que a pesar de que los animales vacunados alcanzan una mayor supervivencia y más respuesta efectora que los control no vacunados, las MDSCs remanentes, (que aumentan durante la infección, aunque menos de lo que aumentan en animales control infectados), aún son capaces de influir significativamente sobre la respuesta inmune del huésped (168).

Considerando el estudio previo de Prochetto y colaboradores, en el cual se observó que la inmunización con TSf-ISPA induce un incremento de células CD11b+Gr-1⁺ con fenotipo supresor (MDSC), y en función de los resultados obtenidos al depletar dichas poblaciones con 5FU durante la fase de infección, nuestro grupo inició una línea de investigación orientada a potenciar la eficacia de la vacuna mediante la administración de 5FU durante la etapa de inmunización (164). Los estudios iniciales demostraron que el pretratamiento con una dosis intraperitoneal de 5FU, administrada el día previo a cada dosis de la vacuna, resultó en una supervivencia del 100% en los animales vacunados frente al 0% observado en los controles (168).

Sobre la base de estos antecedentes, se planteó la siguiente hipótesis: la modulación transitoria del brazo regulador del sistema inmune durante el protocolo de vacunación, mediante la depleción con 5FU de células

con fenotipo MDSC (CD11b+Gr-1+), puede potenciar la respuesta inmune efectora inducida por el candidato vacunal TSf-ISPA, incrementando su capacidad protectora frente a la infección por *T. cruzi*, incluso en distintos modelos murinos.

Objetivos del trabajo

Objetivo general

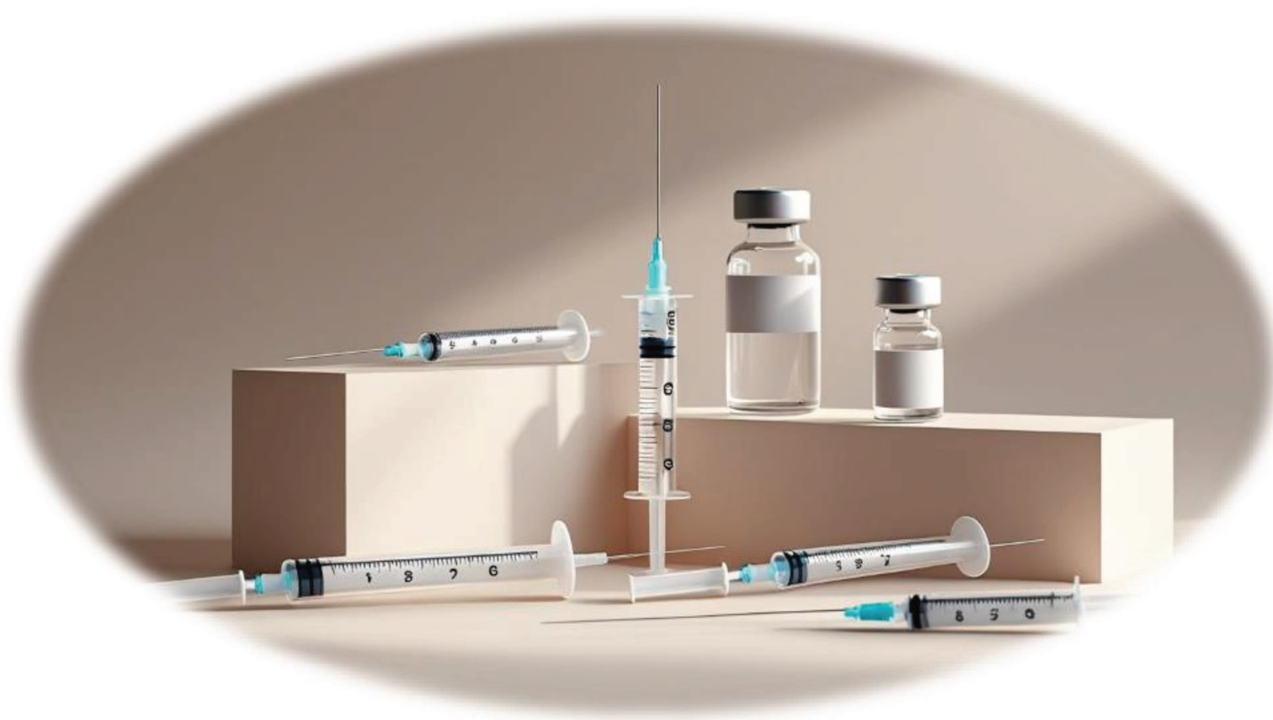
Por lo anteriormente expuesto, y de acuerdo a nuestros resultados previos, el objetivo general de este trabajo es emplear 5-fluorouracilo para optimizar el candidato vacunal TSf-ISPA contra *T. cruzi* y evaluar la capacidad protectora en diferentes modelos murinos.

Objetivos específicos

- 1) Seleccionar una estrategia de administración de los compuestos 5FU y TSf-ISPA en base a la respuesta inmune y la capacidad protectora contra *T. cruzi*.
- 2) Evaluar en diferentes modelos murinos la capacidad protectora contra *T. cruzi* de los compuestos 5FU y TSf-ISPA.
- 3) Analizar los mecanismos inmunológicos que permiten potenciar el candidato vacunal TSf-ISPA al usar 5FU en la etapa de inmunización.

Capítulo 1

"Selección de una estrategia de administración de los compuestos 5FU y TSf-ISPA en base a la respuesta inmune y la capacidad protectora contra T. cruzi"



Introducción

Rol de las MDSC en infecciones

Las MDSCs son un componente clave en la regulación de la respuesta inmune durante las infecciones. Su impacto final sobre el curso de la enfermedad depende del tipo de patógeno, la carga infecciosa, el contexto inflamatorio y el momento de la respuesta. Comprender en profundidad los mecanismos que regulan la expansión y función de las MDSC en infecciones resulta fundamental para el diseño de estrategias terapéuticas que permitan limitar la inmunopatología sin comprometer la eliminación del patógeno (102).

Debido a su funcionalidad, las MDSCs pueden participar en muchos casos cumpliendo un rol dual que debe ser finamente regulado. Por un lado, su expansión puede resultar beneficiosa para el hospedador al limitar el daño tisular causado por una respuesta inflamatoria excesiva. Sin embargo, su potente capacidad supresora puede interferir con la eliminación efectiva del patógeno, favoreciendo la persistencia y el establecimiento de infecciones crónicas, e incluso pueden ser un blanco a manipular por patógenos con capacidad para subvertir la respuesta inmune del huésped (102).

La participación de MDSCs en infecciones ha sido documentada con patógenos bacterianos, virales, fúngicos y parasitarios (96) (Figura 15). En infecciones como la tuberculosis, la hepatitis C y la infección por VIH, la expansión de MDSCs se ha asociado con la supresión de respuestas T protectoras y la progresión de la enfermedad. En contraste, en ciertos contextos como infecciones por *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans* las MDSCs pueden contribuir a la resolución de la inflamación y al control del patógeno (102).

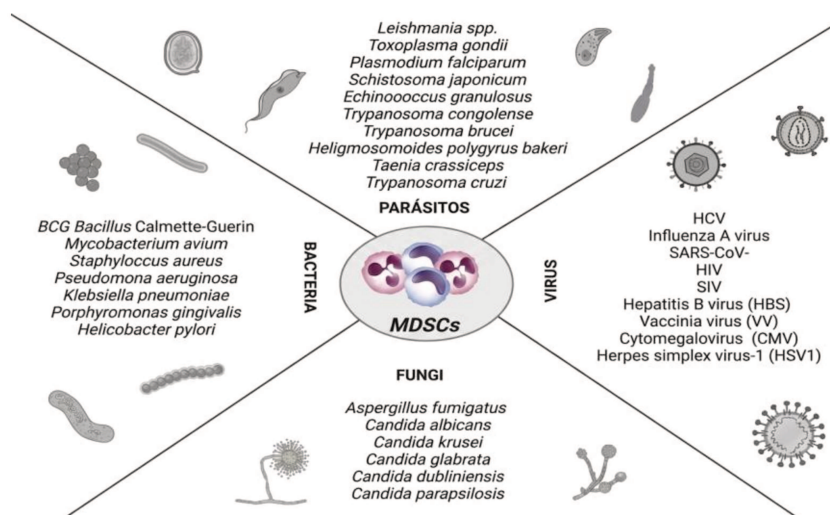


Figura 15: Infecciones por patógenos y MDSCs. La expansión de MDSCs se ha descrito en diversos contextos de infección por patógenos, incluyendo bacterias, parásitos, virus y hongos. Figura modificada de (96).

MDSCs en infecciones virales

Se han descrito aumentos significativos de MDSCs durante infecciones por virus de ARN (Hepatitis C, Influenza A, SARS-CoV-2, retrovirus (HIV, SIV), y ADN (Hepatitis B, Vaccinia y Citomegalovirus)) incluyendo infecciones tanto agudas como crónicas (96,169).

Diversos componentes virales han sido asociados a la expansión de MDSCs. La proteína Core del HCV y el antígeno HBeAg del HBV participarían en el pasaje a cronicidad de la infección mediante la vía STAT3 y la inducción de tolerancia (170). En retrovirus como el VIH, se ha reportado que las proteínas de la envoltura (gp120) y accesorias (Nef, Tat) serían capaces de transformar monocitos en células supresoras (171). Por último, en infecciones agudas como el COVID-19, la proteína Spike y la liberación masiva de alarminas (S100A8) tendrían un rol provocando una expansión mieloide que correlaciona con un pronóstico grave (172).

MDSCs en infecciones bacterianas

Se han descrito varios patógenos bacterianos, tanto gram positivos como gram negativos, que en modelos *in vitro* o bien *in vivo*, principalmente durante infecciones que cursan con inflamación sistémica o cronicidad, inducen una expansión robusta de MDSCs tanto en modelos experimentales como en humanos (96,173).

El Bacilo de Calmette-Guerin, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* son algunas de las bacterias que podrían inducir MDSCs como parte de sus interacciones huésped patógeno (96,172). El lipopolisacárido, los lipopéptidos, la flagelina y el ADN con secuencias CpG son algunos de los componentes involucrados en la expansión de MDSCs (173).

La vacuna BCG es la inmunización más extensamente utilizada a nivel global desde su primera aplicación clínica en 1921 (174). Resulta de gran interés que tanto la inoculación con BCG como la infección por *Mycobacterium tuberculosis* pueden inducir un incremento en las poblaciones de MDSCs; este fenómeno se ha postulado como una de las causas por las cuales la vacunación con BCG no logra conferir una inmunidad esterilizante (175). En este sentido, estudios de inoculación intradérmica en el pabellón auricular de ratones han demostrado que la BCG promueve el reclutamiento de estas células supresoras al sitio de infección y a los ganglios linfáticos drenantes, limitando la respuesta efectora de las células T (175). Además, en modelos de tuberculosis, por ejemplo, la acumulación de MDSCs se correlaciona con mayor carga bacteriana y progresión de la enfermedad (169).

Por otra parte, en infecciones bacterianas agudas severas, como sepsis, se ha descrito que las MDSCs podrían contribuir a la inmunopatogénesis, caracterizada por una etapa de marcada inmunosupresión (102,176).

MDSCs en infecciones fúngicas

Las MDSCs también participan en la respuesta inmune frente a patógenos fúngicos. En infecciones por *Candida* y *Aspergillus*, se ha observado la expansión de MDSCs (102). Los beta glucanos de los hongos participarían en la inducción de estas células a través del receptor Dectin-1 (177).

En este contexto, las MDSCs pueden contribuir a la persistencia del hongo, al limitar la activación de células efectoras y la producción de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, su presencia también podría reducir el daño tisular asociado a una inflamación excesiva. En este sentido, experimentos de transferencia adoptiva y supervivencia han mostrado que las MDSCs podrían ser protectoras durante la infección invasiva por *C. albicans*, pero no en la infección por *A. fumigatus*, destacando nuevamente su rol dual (102).

MDSCs en infecciones parasitarias

En infecciones parasitarias, como las causadas por *Plasmodium falciparum*, Helmintos, *Leishmania* y *T. cruzi*, entre otros, las MDSCs desempeñan un rol particularmente relevante en la regulación del equilibrio entre el control del parásito y la inmunopatología. En malaria humana experimental por *Plasmodium falciparum*, se ha demostrado una expansión temprana y funcional de PMN-MDSCs en sangre periférica, incluso en fases subclínicas de la infección (178). Esto podría explicar, al menos en parte, la tolerancia inmunológica observada en infecciones crónicas o repetidas por *Plasmodium*, así como la disminución en la eficacia de respuestas vacunales en individuos expuestos en zonas endémicas (178).

Las infecciones por helmintos se caracterizan por su cronicidad y por la inducción de potentes redes inmunorreguladoras. Los helmintos inducen activamente la expansión de MDSCs como parte de su estrategia de evasión inmune (179). Se ha observado que moléculas como oligosacáridos inmunorreguladores, específicamente lacto-N-fucopentaosa III y lacto-N-neotetraosa, presentes en antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni*, son capaces de inducir MDSCs, así como ciertos glicanos de *Taenia crassiceps* (179).

Tanto M-MDSCs como PMN-MDSCs suprimen respuestas Th1 y Th2, interfiriendo con la eliminación del parásito y favoreciendo la supervivencia a largo plazo del hospedador y del helminto.

MDSCs en inmunizaciones

Considerando que la vacunación intenta reproducir, al menos en parte, eventos semejantes a los que tienen lugar durante la infección misma, existe la posibilidad, dependiendo de la estrategia de vacunación elegida, de que si la infección causa aumentos de MDSCs, la inmunización también. De hecho, los primeros indicios de que la inmunización puede inducir células mieloides con capacidad supresora se obtuvieron realizando estudios con la vacuna BCG, previos incluso al establecimiento de la nomenclatura de MDSCs, en

los que se observó que la administración sistémica de BCG activaba células de médula ósea con fenotipo supresor (89). Utilizando la terminología actual, Martino y colaboradores (175) reportaron que la inmunización con BCG en un modelo murino reclutó MDSCs al sitio de inoculación, donde las células $CD11b^+Ly-6C^{int}Ly-6G^-$ produjeron óxido nítrico e inhibieron la estimulación de linfocitos T en el ganglio linfático. Más recientemente, y en línea con estos trabajos, se describió que la inmunización con bacterias de *M. tuberculosis* inactivadas por calor genera aumentos de MDSCs con capacidad de matar CD⁺s (116), aportando importante evidencia de que no solo las infecciones, sino también las inmunizaciones pueden causar aumento de MDSCs, con capacidad de limitar la efectividad esperada de las vacunas.

Asimismo, cabe resaltar que esta característica no se ha visto restringida a vacunas contra un solo tipo de patógeno, como los bacterianos, sino que también se ha observado en inmunizaciones contra virus, hongos y parásitos(114).

En cuanto al efecto de la vía de administración, utilizando un modelo de macacos, se observó que la inmunización con un vector viral MVA (*Modified Vaccinia Ankara*), causó aumentos significativos de MDSCs en sangre periférica, incluso si se utilizaban diferentes vías de inoculación, como intradérmica, intramuscular, y subcutánea (180).

Por lo tanto, evidencia creciente sugiere que los incrementos de MDSCs que tienen lugar durante la etapa de inmunización no son exclusivos de un modelo puntual, sino que serían una respuesta frecuente de numerosas y diversas plataformas vacunales, incluyendo formulaciones emulsionadas, vectores virales, vacunas recombinantes, vacunas de ácidos nucleicos y partículas de tipo ISCOM (114).

Depleción de las MDSCs

Debido a que la acumulación de MDSCs ha mostrado generar una influencia marcada sobre el sistema inmune en contextos muy diferentes, se han desarrollado diversas estrategias orientadas a reducir su presencia de modo de incrementar la respuesta inmune efectora. Estas alternativas se han estudiado fundamentalmente en el campo de la oncología, de acuerdo a la importancia de estas células en dicha patología, pero también se han reportado ejemplos en otros marcos de estudio (181). Entre las opciones que se han probado, se incluyen las siguientes vías principales:

Quimioterapia a bajas dosis: El uso de fármacos como la gemcitabina y el 5FU ha sido ampliamente utilizado para reducir poblaciones enriquecidas en MDSCs, logrando una reducción de su presencia en el bazo y en microambientes tumorales sin comprometer la viabilidad de los linfocitos T (182).

Inhibidores de Tirosina Quinasa (TKI): El sunitinib destaca por su capacidad dual; no solo bloquea la señalización de STAT3 necesaria para la expansión de las MDSCs, sino que también induce su muerte celular al inhibir receptores como c-kit (182).

Anticuerpos y Aptámeros: La utilización de anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos (como Gr-1 en modelos preclínicos) o el uso de aptámeros contra el receptor IL4R- α permite una depleción más dirigida, minimizando efectos sistémicos (182).

Un hallazgo crítico para entender por qué la depleción natural o inducida a veces falla es el mecanismo de compensación en la médula ósea. Si bien los tratamientos promueven la muerte de las MDSCs en la periferia, simultáneamente la médula ósea comienza una producción acelerada para reponer dichas células (112).

Este proceso crea un ciclo de alto recambio donde las células mueren rápidamente pero son reemplazadas de forma masiva, manteniendo un flujo constante de células supresoras. Este mecanismo sugiere que cualquier estrategia de depleción efectiva no solo debe atacar a las células maduras, sino también considerar la inhibición de este "rebote" o expansión compensatoria (112,182).

5-fluorouracilo y su mecanismo de acción

El 5-fluorouracilo (5FU) es uno de los compuestos ampliamente utilizados para depletar MDSCs. Es un antimetabolito, estructuralmente análogo al uracilo, en el cual un átomo de flúor sustituye al hidrógeno en la posición C-5 del anillo pirimidínico. Este cambio estructural le confiere la capacidad de interferir con procesos esenciales del metabolismo de los ácidos nucleicos. La principal vía de catabolismo del 5FU está mediada por la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), que convierte al fármaco en dihidrofluorouracilo (DHFU). Más del 80 % del 5FU administrado es degradado por esta vía, principalmente en el hígado, donde la expresión de DPD es elevada.

El 5FU que no es degradado, puede ingresar rápidamente a las células a través de los mismos mecanismos de transporte facilitado que el uracilo y, una vez en el interior celular, es metabolizado a diferentes compuestos activos, entre ellos el monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), el trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) y el trifosfato de fluorouridina (FUTP). Cuando el blanco son células cancerosas, el 5FU se ha administrado en elevadas concentraciones para generar los metabolitos mencionados para que interfieran con la síntesis de ARN y ADN (183).

Además, el FdUMP tiene como blanco particular la enzima timidilato sintasa, a la cual inhibe luego de su unión. Se ha descrito que las células MDSCs presentan una baja expresión de dicha enzima, lo que las volvería particularmente sensibles al 5FU, promoviendo la activación de la apoptosis al no poder sintetizar correctamente ácidos nucleicos (121).

Estudios realizados por Vincent y colaboradores mostraron que, a una concentración apropiada, el 5FU induce una depleción selectiva de MDSCs tanto *in vitro* como *in vivo*, sin afectar significativamente a otras poblaciones inmunes como linfocitos T, células NK, células dendríticas o linfocitos B (121).

Adicionalmente, se ha descrito que el 5FU activa la vía de la proteína supresora tumoral p53 en MDSCs, lo que conduce a un aumento en la expresión del receptor de muerte Fas (CD95) en su superficie. Este fenómeno incrementa la susceptibilidad de las MDSCs a la apoptosis mediada por FasL, contribuyendo así a su eliminación selectiva (121). En contextos tumorales, se ha descrito que el 5FU también podría activar el inflamósoma NLRP3 (NLR family, pyrin domain containing 3) en las MDSCs, lo cual podría contribuir a efectos inmunomoduladores adicionales que continúan bajo estudio (184).

Por otro lado, aunque aún debe ser estudiado en mayor profundidad, también se ha descrito que el 5FU puede estimular la captura antigénica y la presentación cruzada en CDs de tipo I, y se ha utilizado incluso para potenciar vacunas basadas en CDs (185).

Estos mecanismos posicionan al 5FU como un agente modulador de la respuesta inmune, con potencial para ser utilizado como un potenciador de diferentes candidatos vacunales que estén asociados a la expansión de MDSCs.

Objetivo del capítulo 1

Seleccionar una estrategia de administración de los compuestos 5FU y TSf-ISPA en base a la respuesta inmune y la capacidad protectora contra *T. cruzi*.

Materiales y métodos

Animales

Para los diferentes estudios se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, las cuales fueron adquiridas en el Centro de Medicina Comparada de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza-Santa Fe). Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Laboratorio de Tecnología Inmunológica, bajo condiciones controladas de luz y temperatura, con disponibilidad de agua y comida *ad libitum*.

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 Estados Unidos de Norteamérica) y fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL (CAESI CE2022-26).

Formulación del candidato vacunal TSf-ISPA

Se utilizó el fragmento proteico TSf purificado, previamente descrito (163), que abarca la región entre los aminoácidos 338 y 627 (GenBank AJ276679.1). Este fragmento fue formulado con un adyuvante de cajas lipídicas denominado Immunostimulating Particle (ISPA), desarrollado inicialmente por nuestro grupo de trabajo en colaboración con Lipomize SRL, Santa Fe (162). El adyuvante ISPA consiste en partículas lipídicas con forma de cajas, compuestas por fosfatidilcolina (DPPC), colesterol (CHOL), esterilamina (STEA), tocoferol (TOCOP) y saponina (162).

Tratamiento con 5FU

Se utilizó 5-fluorouracilo (5FU) (Sigma) en una dosis final de 50-60 mg/kg de ratón (118,121), administrada por vía intraperitoneal (168). Inicialmente, las inoculaciones de 5FU se realizaron siguiendo dos protocolos diferentes, en los cuales se variaba el momento de la administración de 5FU. En uno de los protocolos, el 5FU se administró intraperitonealmente (i.p.) el día anterior a cada dosis de TSf-ISPA (estrategia prevacuna 5FU TSf-ISPA), mientras que en el otro protocolo, ambos compuestos se administraron simultáneamente, de forma subcutánea (s.c.), (estrategia conjunta o covacuna 5FU TSf-ISPA).

Luego se ensayó también la estrategia doble 5FU TSf-ISPA, la cual es similar a la estrategia prevacuna, pero agregando una segunda dosis i.p. de 5FU a los 7 días de cada inoculación con TSf-ISPA.

Inmunizaciones

Los grupos experimentales utilizados en este capítulo consistieron en 5 a 8 ratones cada uno y se definieron de la siguiente manera:

Grupo TSf-ISPA: El protocolo de inmunización (Figura 16) consistió en la administración de tres dosis subcutáneas de 10 µg de TSf junto con 3 µl de adyuvante ISPA, en un volumen final de 100 µl de Buffer Fosfato Salino (PBS), con un intervalo de 15 días entre cada dosis (grupo TSf-ISPA).

Grupo 5FU prevacuna TSf-ISPA: Inmunizado como el grupo TSf-ISPA con una inoculación de 5FU i.p. el día previo a cada dosis de TSf-ISPA.

Grupo 5FU covacuna TSf-ISPA: Inmunizado como el grupo TSf-ISPA con una inoculación simultánea s.c. de 5FU.

Grupo doble 5FU TSf-ISPA: Inmunizado como el grupo TSf-ISPA con una inoculación de 5FU i.p. el día previo y a los 7 días de cada dosis de TSf-ISPA.

Grupo 5FU solo: Inoculado con PBS en los días correspondientes a dosis de TSf-ISPA e inoculado con 5FU i.p. los días de inoculación como el grupo prevacuna.

Grupo control PBS (las inmunizaciones se realizaron con PBS en lugar de la formulación y el 5FU).

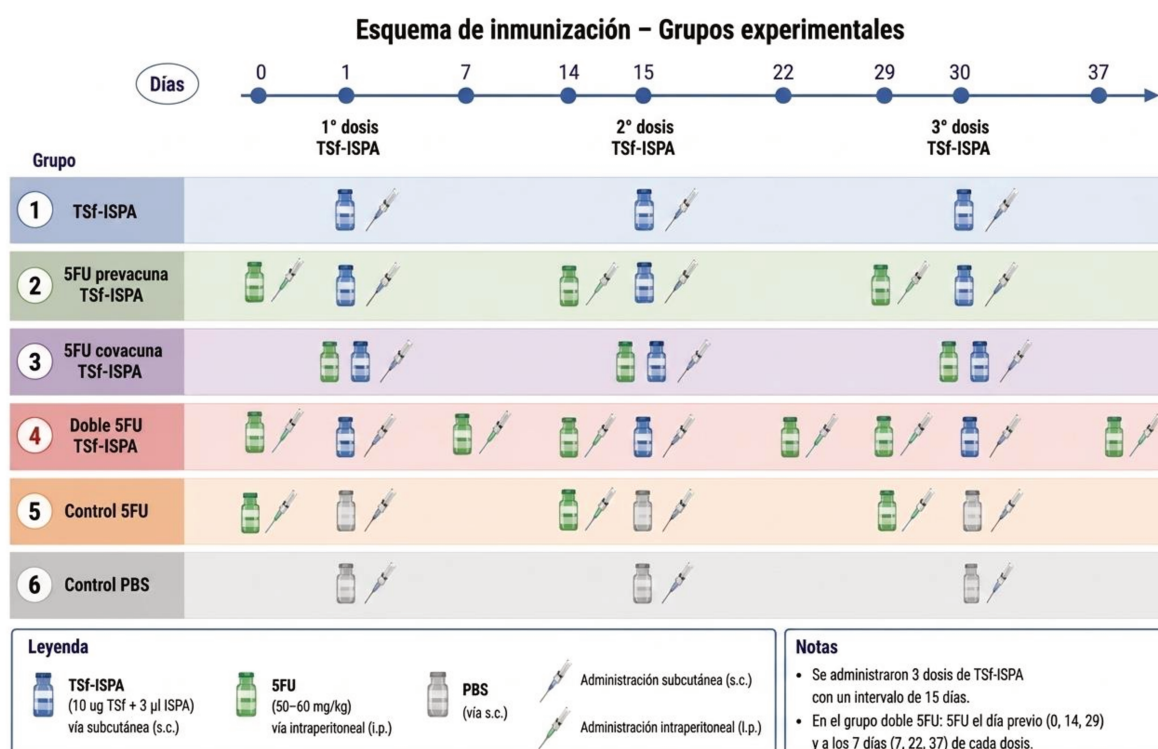


Figura 16: Línea de tiempo del esquema de vacunación, que muestra los diferentes protocolos de inmunización empleados a lo largo de este trabajo de Tesis y descritos en el texto.

Evaluación de la respuesta inmune generada

Evaluación de anticuerpos específicos mediante la técnica ELISA

Para la evaluación de la respuesta humoral se tomaron muestras de sangre periférica de la vena facial (186). Las muestras se centrifugaron 10 min a 10.000 rpm, se separó el plasma de cada una de ellas, y fueron almacenadas a -20 °C hasta ser utilizadas.

Mediante la técnica de ELISA indirecto (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) se evaluó la presencia de anticuerpos específicos IgG totales anti-TSf de las muestras obtenidas de los ratones. Para llevar a cabo esta técnica, se emplearon microplacas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, las cuales fueron sensibilizadas con 0,5 µg/pocillo de antígeno TSf en buffer carbonato (Tabla 2), durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día las placas se lavaron con una solución de lavado (Tabla 2), y se bloquearon agregando 100 µl en cada pocillo de una solución de bloqueo (Tabla 2) durante 45 min a 37 °C. Pasado este tiempo, se volvieron a lavar los pocillos 5 veces con la solución de lavado empleada anteriormente, y luego de finalizada esa etapa, se agregaron los plasmas murinos diluidos 1/100 en solución de incubación (Tabla 2) durante 45 min a 37 °C. Finalizado el tiempo correspondiente, se volvieron a realizar lavados sucesivos en los pocillos y se agregó el anticuerpo anti-IgG total ratón conjugado (Abcam), diluido 1/2000 en solución de incubación. La placa nuevamente fue mantenida a 37 °C durante 45 min, se volvió a lavar y se procedió a revelar agregando 1 gota (50 µl) de TMB (tetrametil-bencidina) (Life Technologies™) a cada pocillo. Se dejó en oscuridad a temperatura ambiente entre 5-15 min hasta la aparición de color azul. Luego se agregó una gota (50 µl) de solución de stop (Tabla 2) para frenar la reacción colorimétrica. Los resultados obtenidos, se leyeron con un lector de ELISA (Molecular Device Emax) a 450 nm, y fueron expresados como densidad óptica (DO).

Tabla 2: Soluciones utilizadas para el ensayo de ELISA.

Solución	Reactivos	Concentración
Solución de sensibilización	Na ₂ CO ₃	15 Mm
	NaHCO ₃	35 mM
	NaN 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 stopper	H ₂ SO ₄	0,5 N

Evaluación de la respuesta celular: reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

La respuesta celular específica generada tras las inmunizaciones se evaluó mediante la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH), la cual fue realizada a los 5 días de finalizado el protocolo de inmunización establecido. Para tal fin, se inocularon 5 µg de TSf sin adyuvante en 20 µl de PBS, en la almohadilla plantar trasera derecha de cada ratón. Se midió el grosor de la almohadilla plantar antes de inocular 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 en mm. (164).

Cinética de cambio de la población MDSCs con los tratamientos de una dosis de 5FU prevacuna y covacuna

Citometría de flujo para evaluar depleción de células CD11b+Gr-1+ a los 7 y 15 días post-inmunización

Los animales recibieron dosis de 5FU dependiendo al grupo al cual pertenecían (covacuna o prevacuna), tal como se describió anteriormente en la sección de inmunizaciones de este capítulo. Diferentes grupos de ratones fueron sacrificados a los 7 o 15 días posteriores a la última dosis de vacuna, y se analizó por citometría de flujo el porcentaje y número absoluto de células CD11b+Gr-1+ en el bazo de los animales.

Luego del sacrificio, se prepararon suspensiones individuales de las células de cada bazo mediante homogeneización empleando una malla de acero inoxidable usando PBS con suero fetal bovino al 3% (SFB, Internegocios SA, Argentina). Los números absolutos del bazo se determinaron contando las células en cámara de Neubauer utilizando solución de Turk y de acuerdo al volumen final luego de la homogeneización. A continuación se eliminaron los glóbulos rojos por lisis con buffer NH₄Cl comercial (Thermofisher) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para el estudio de citometría, 0.5×10^6 células se incubaron con anti-FcR γ II/III durante 15 minutos y luego se tiñeron con los siguientes anticuerpos de BD-Biosciences (USA) en combinaciones apropiadas de fluoróforos: anti-CD11b y anti-Gr-1. Después de una incubación de 40 minutos a 4°C y en oscuridad, las muestras fueron lavadas 2 veces con solución PBS 3% SFB, 0,1% azida y fueron adquiridas en un citómetro Accuri C6 plus disponible en la Unidad Tecnológica Multipropósito (UTM) de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL. Los análisis se realizaron utilizando el software FlowJo.

Capacidad supresora de las células Gr-1⁺ de inhibir la maduración de CDs derivadas de médula ósea

Las CDs derivadas de médula ósea (BMDCs) se obtuvieron de ratones BALB/c sanos. Se extrajeron los fémures de los ratones y las células de médula ósea se recolectaron lavando el interior del hueso con medio RPMI 1640 (Gibco™). Las células obtenidas se incubaron en medio de cultivo completo (RPMI 1640 conteniendo 10% de SFB, 2% de penicilina (100 mg/mL) y estreptomicina (100 U/mL) (Gibco™)) suplementado con 30% de sobrenadante de la línea celular J588-GM (medio de diferenciación), cedido gentilmente por la Dra. Mónica Vermeulen, del IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Nunc) ($0,75 \times 10^6$ células/pocillo) a 37 °C y 5% de CO₂. En los días 3 y 5 se agregó medio de diferenciación fresco. En el día 8, las BMDCs se recolectaron para su análisis por citometría de flujo y para los cultivos.

La obtención de BMDCs se controló evaluando la expresión de moléculas coestimuladoras en células CD11c⁺ estimuladas con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (ThermoFisher). Para ello, se cultivó 1×10^5 BMDCs en placas de 96 pocillos (Nunc) en medio de cultivo completo durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS (1 µg/mL). Se realizó citometría de flujo con anticuerpos anti-CD11c (Miltenyi Biotec), anti-CD80 (BD-Biosciences) y anti-MHCII (Miltenyi Biotec), en combinaciones apropiadas de fluoróforos, confirmando la obtención de células CD11c⁺ con capacidad de respuesta a LPS, evidenciada por un aumento en la expresión de MHC-II y CD80.

Paralelamente, células Gr-1⁺ fueron purificadas mediante separación magnética de células a partir de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el protocolo TSf-ISPA, utilizando el kit de aislamiento de células supresoras derivadas de mieloides (Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El día 7 post-inmunización (post-inm.), los ratones inmunizados con TSf-ISPA fueron sacrificados, los bazo se extrajeron en condiciones asépticas y se obtuvieron los esplenocitos como se describió previamente. Tras la purificación, la pureza de las células Gr-1⁺ fue superior al 90%, según se evaluó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-Gr-1 (BD Biosciences).

Para el ensayo de supresión de BMDCs por células Gr-1⁺ purificadas de animales inmunizados, se cocultivaron 1×10^5 BMDCs con 1×10^5 células Gr-1⁺ purificadas, en placas de 96 pocillos (Nunc), en medio de cultivo completo (RPMI 1640 (Gibco™), 10% de SFB (Internegocios), 2% de penicilina (100 mg/mL) y estreptomicina (100 U/mL) (Gibco™)). Se agregó LPS (1 µg/mL, ThermoFisher). Para completar el número total de células por pocillo, se agregaron BMDCs en lugar de células Gr-1⁺ en los cultivos control sin células purificadas Gr-1⁺. Luego de 72 horas a 37 °C y 5% de CO₂, las células fueron recolectadas y se evaluó la actividad supresora de las células Gr-1⁺ por citometría de flujo empleando los anticuerpos descritos anteriormente: anti-CD11c (Miltenyi Biotec), anti-CD80 (BD-Biosciences) y anti-MHCII (Miltenyi Biotec). La preparación, adquisición y análisis de la citometría de flujo se realizó de manera similar a la descrita más arriba.

Capacidad supresora sobre la proliferación de linfocitos T CD4+

También se analizó la capacidad de las células Gr-1⁺ purificadas de animales inmunizados de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4⁺. Para este fin, esplenocitos de ratones BALB/c no infectados fueron marcados con 10 μ M de 5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) (Molecular Probes, Eugene, OR), siguiendo las instrucciones del fabricante. El correcto marcado con CFSE fue verificado por citometría de flujo. Luego, 1×10^5 esplenocitos marcados fueron agregados a los cultivos conteniendo BMDCs y células purificadas Gr-1⁺. Los cultivos se realizaron en medio de cultivo completo, con concanavalina A (ConA, Sigma, 5 μ g/mL). Al cabo de 48-72 hs de cultivo se realizó citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti-CD4 conjugado a PE (BD-Biosciences). Se cuantificó la proliferación en presencia o ausencia de células Gr-1⁺ mediante el análisis de la dilución del colorante CFSE dentro de las células CD4⁺.

Infección con T. cruzi

Para las infecciones se emplearon parásitos tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén, los cuales fueron extraídos de ratones Cb1 de 25 a 30 días de edad, cedidos por la Dra. Ana Rosa Pérez del Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), Santa Fe, Argentina.

Para la extracción de los parásitos, los ratones infectados fueron anestesiados con solución de ketamina-xilacina y se extrajo alrededor de 1 ml de sangre entera por punción cardíaca, tras lo cual los animales fueron sacrificados. Las muestras de sangre entera fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, y luego se separó el sobrenadante conteniendo los parásitos. El mismo fue lavado agregando 10 ml de PBS y tras una nueva centrifugación a 2500 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la muestra con parásitos en 1 ml de PBS. Por último, se determinó la concentración de los mismos utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó la cantidad de parásitos de modo tal de inocular la cantidad necesaria de parásitos por ratón en un volumen final de 100 μ l de PBS. Las infecciones se realizaron por vía intraperitoneal quince días después de la última inmunización.

Parasitemia

Luego de la infección se estudió la parasitemia a los 15 y 20 días post-infección, mediante recuento en portaobjeto de 5 μ l de sangre entera extraída de la punta de la cola de cada ratón. Por cada muestra se contaron un total de 20-50 campos aleatorios al microscopio óptico.

Supervivencia

La supervivencia de cada grupo experimental fue registrada diariamente hasta el día 35 después de la infección.

Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para la comparación entre grupos se emplearon las pruebas no paramétricas de Mann–Whitney (para la comparación de dos grupos independientes) o Kruskal–Wallis (para comparar más de dos grupos), dado que estos tests son adecuados para tamaños muestrales pequeños o para datos que no cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad (187). En los casos donde se empleó Kruskal–Wallis como test omnibus, se realizaron comparaciones múltiples mediante el test de Dunn (188). Para controlar la tasa de falso descubrimiento (FDR) en estas comparaciones, se aplicó el método de Benjamini-Hochberg (189), exceptuando del análisis al grupo PBS, el cual se incluyó únicamente como referencia de los valores basales.

En determinados casos se realizó una única comparación planificada a priori entre dos grupos de interés biológico específicos, empleando el test de Mann–Whitney; este enfoque permitió realizar los contrastes principales sin aumentar el riesgo de error de tipo I asociado a la multiplicidad de pruebas (190). En el uso de Mann–Whitney, se utilizaron pruebas de una cola cuando existía evidencia previa que respaldara la direccionalidad de la hipótesis, y de dos colas en ausencia de dicha información (191). Las curvas de supervivencia fueron evaluadas mediante el test de Log-rank (192). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $*p < 0,05$.

El tamaño muestral empleado en los distintos experimentos se determinó considerando la literatura disponible en modelos murinos de infección y vacunación con *T. cruzi*, el conocimiento de experimentos preliminares del grupo, y consideraciones éticas vinculadas al uso de animales de experimentación, en concordancia con el principio de reducción de las 3Rs.

Resultados

Estrategias de Administración de 5FU y TSf-ISPA: Proceso de Selección y Análisis

Previamente hemos descrito que el tratamiento con 5FU por vía i.p. el día anterior a la inmunización con TSf-ISPA permite potenciar la capacidad protectora de dicho candidato vacunal (estrategia Prevacuna, también abreviado Prevac) (168). Considerando que una administración simultánea de ambos compuestos resultaría beneficiosa desde un punto de vista práctico, en este trabajo se analizó, en primer lugar, la posibilidad de desarrollar un protocolo conjunto que permita unificar la dosis de 5FU junto con la dosis de TSf-ISPA (estrategia Conjunta, también denominada Covac).

Para tal fin, se evaluó la producción de anticuerpos plasmáticos IgG totales anti-TSf y la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) en los grupos experimentales correspondientes a las estrategias de administración prevac y covac, empleando como controles de referencia al grupo TSf-ISPA y al grupo control tratado solo con PBS. Los niveles de anticuerpos plasmáticos se determinaron mediante ELISA indirecto utilizando sangre periférica obtenida al día 7 post-inmunización (post-inm), luego de la última dosis de vacuna. Por su parte, la respuesta DTH se evaluó inoculando TSf (sin adyuvante) en la almohadilla plantar de los ratones al día 5 post-inm, y se midió la diferencia en el grosor de la almohadilla plantar al día 7 post-inm utilizando un calibre Vernier. Ambas técnicas se realizaron siguiendo los procedimientos detallados en la sección de Materiales y Métodos.

Como controles se utilizaron animales tratados con TSf-ISPA o PBS. Todos los tratamientos que incluyeron TSf-ISPA generaron una respuesta importante de anticuerpos IgG totales específicos contra TSf, así como una marcada respuesta DTH. La Figura 17 A y 17 B muestran los resultados expresados como el ratio de los valores experimentales obtenidos para cada grupo en relación a los valores promedios de DO y delta DTH del grupo PBS. En ambas mediciones se observó una tendencia ascendente en el orden TSf-ISPA < 5FU Covac TSf-ISPA < 5FU Prevac TSf-ISPA, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

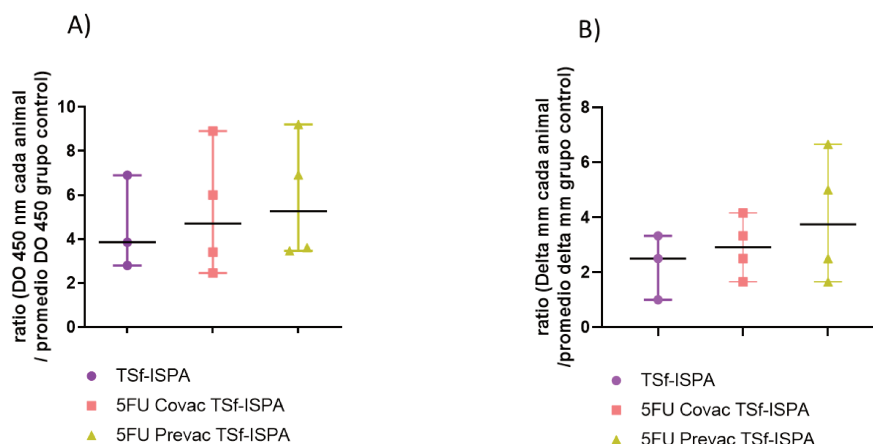


Figura 17: Evaluación de la producción de anticuerpos IgG anti-TSf y DTH a los 7 días post-inm. Ratones BALB/c fueron tratados con PBS, TSf-ISPA, 5FU Covac TSf-ISPA y 5FU Prevac TSf-ISPA. **A)** Se analizaron muestras de plasma para detectar anticuerpos IgG totales específicos contra TSf mediante ELISA a los 7 días post-inm. Se calculó el promedio de la DO del grupo control PBS y se obtuvo el ratio para cada grupo luego de dividir cada valor por dicho promedio (ratio DO 450 nm cada animal de cada grupo/ promedio DO 450 nm del grupo control PBS) **B)** A los 5 días post-inm se evaluó la respuesta de DTH en los mismos grupos experimentales. Se calculó el promedio DTH del grupo control PBS y se obtuvo el ratio para cada grupo luego de dividir cada valor por dicho promedio (ratio delta mm cada animal de cada grupo/ promedio delta mm grupo control PBS) (n=3-4 ratones por grupo). Los datos se presentan como medianas $\pm$ IC 95%. Test de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$.

Cinética de las células CD11b+Gr-1+: Caracterización Post-inm

Dado que la depleción de células CD11b+Gr-1+ mediante el tratamiento con 5FU Prevac fue fundamental para mejorar la capacidad protectora de nuestro candidato vacunal TSf-ISPA (168), en esta etapa se analizó la cinética de cambio de estas células en el bazo comparando las diferentes estrategias de administración de 5FU implementadas en los protocolos Prevac y Covac, descritas en materiales y métodos.

Se evaluó, a los 7 y 15 días post-inm, el porcentaje y número absoluto de esplenocitos CD11b+Gr-1+ utilizando citometría de flujo, siguiendo protocolos previamente descritos (114,163).

Como se muestra en la Figura 18, los grupos 5FU Covac TSf-ISPA y 5FU Prevac TSf-ISPA presentaron diferencias significativas en comparación con el grupo TSf-ISPA, tanto en el porcentaje (Figura 18 A y 18 B) como en el número absoluto de esplenocitos CD11b+Gr-1+ (Figura 18 C y 18 D) a los 7 y 15 días post-inm. Sin embargo, el grupo 5FU Prevac TSf-ISPA mostró una tendencia más pronunciada en esta diferenciación, e incluso dicha tendencia alcanzó significancia estadística a los 15 días post-inm, momento en el cual se observó un incremento significativo en el número absoluto de células CD11b+Gr-1+ en el grupo 5FU Prevac TSf-ISPA en comparación con el grupo 5FU Covac TSf-ISPA.

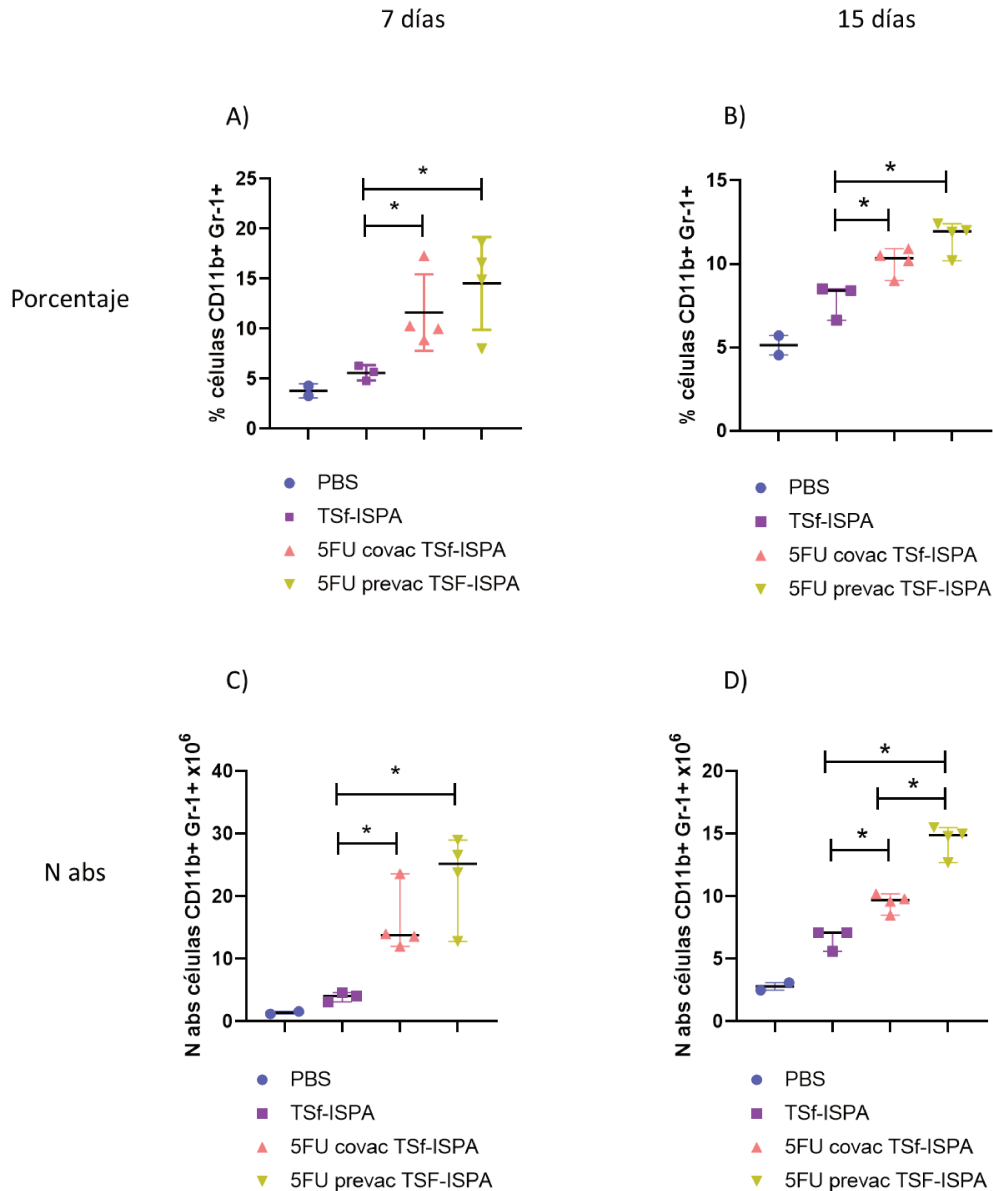


Figura 18: Alteraciones en la población de células CD11b+ Gr-1+ en el bazo de ratones, a los 7 y 15 días después de la última inmunización. Los animales se sacrificaron en los días establecidos, y tras la extracción del bazo, se evaluaron las alteraciones en la población de esplenocitos CD11b+Gr-1+ de los diferentes grupos experimentales mediante citometría de flujo. **A)** y **B)** Porcentaje de células CD11b+Gr-1+ en los grupos PBS, TSf-ISPA, 5FU Covac TSf-ISPA y 5FU Prevac TSf-ISPA a los 7 y 15 días post-inmunización. **C)** y **D)** Número absoluto de células CD11b+Gr-1+ ($\times 10^6$). Los datos se presentan como medianas $\pm$ IC 95%, con un tamaño de muestra de n=2-4 ratones por grupo. *p < 0,05 test de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones por pares con el test de Dunn, utilizando la corrección de Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de falso descubrimiento (FDR) entre todos los grupos. Se exceptuó del análisis comparativo al grupo PBS, el cual se incluyó únicamente como referencia de los valores basales. *p < 0,05 indica significancia estadística entre los grupos señalados.

Considerando que el tratamiento con 5FU Prevac TSf-ISPA mejoró la capacidad protectora contra *T. cruzi* en comparación del grupo tratado solo con TSf-ISPA (168), y que de los dos tratamientos con 5FU (Prevac y Covac), el tratamiento 5FU Covac mostró niveles más similares al grupo de menor protección en cuanto a producción de anticuerpos anti-TSf, respuesta DTH, y niveles de células CD11b+Gr-1+, se optó por continuar empleando el protocolo 5FU Prevac, como el más promisorio de los tratamientos que incluyen 5FU, de acuerdo a la mayor protección obtenida y las mayores diferencias observadas en relación al grupo tratado solo con TSf-ISPA.

Control de la efectividad del 5FU para depletar células CD11b+Gr-1+

Considerando que los ratones tratados con 5FU para depletar células MDSCs mostraron un aumento de dichas células al día 7 post-inm, para confirmar que el tratamiento estuviera funcionando de acuerdo con lo esperado, se realizó un ensayo adicional para evaluar el porcentaje y número absoluto de las células CD11b+Gr-1+ a los 2 días post-inm. Como se muestra en la Figura 19, el grupo tratado con 5FU Prevac TSf-ISPA presentó una disminución significativa tanto en el porcentaje (Figura 19 A) como en el número absoluto (Figura 19 B) de esplenocitos CD11b+Gr-1+, en comparación con el grupo tratado únicamente con TSf-ISPA, lo cual está en línea con el efecto descrito del 5FU y su capacidad para depletar células CD11b+Gr-1+.

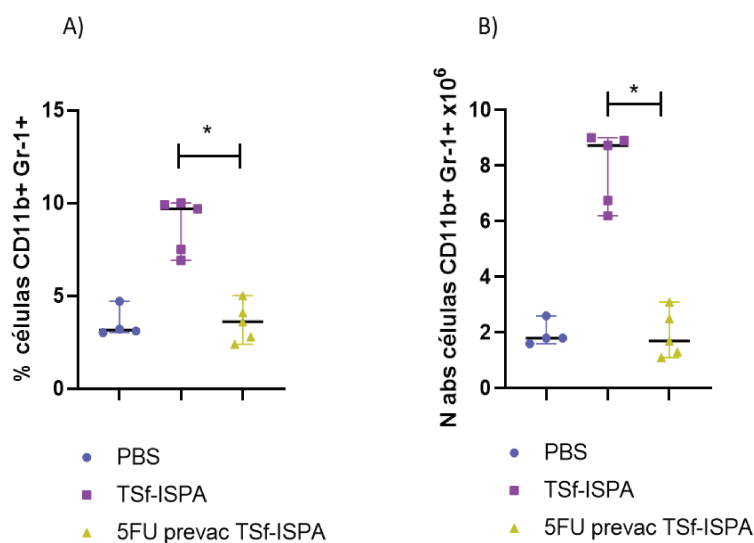


Figura 19: Cambios en la población de células CD11b+Gr-1+ a los 2 días post-inm con TSf-ISPA y 5FU Prevac TSf-ISPA. Al tiempo establecido, los animales fueron sacrificados, y se le midieron las alteraciones en los esplenocitos CD11b+Gr-1+ de los diferentes grupos experimentales mediante citometría de flujo. **A)** Porcentaje de esplenocitos CD11b+Gr-1+ en los grupos PBS, TSf-ISPA y 5FU prevac TSf-ISPA. **B)** Número absoluto de células CD11b+Gr-1+ ($\times 10^6$) en los grupos en estudio. Los datos se expresan como medianas $\pm$ IC 95% con un n=4-5 ratones por grupo. *p < 0,05, test de Mann-Whitney entre los grupos indicados.

Cinética de las células MDSCs en el grupo experimental 5FU solo

Adicionalmente, si bien no está descrito que el 5FU genere aumento de células CD11b+Gr-1+, se analizó como un control adicional, que no se produjera un aumento de dichas células en los animales tratados solo con 5FU en relación al grupo tratado solo con PBS, a los 7 días post-inm, momento en el cual se observó el mayor aumento de dichas células en los animales vacunados.

La Figura 20 muestra que los animales tratados solo con 5FU no presentan alteraciones en el porcentaje (A) ni número absoluto de esplenocitos CD11b+Gr-1+ (B) en comparación del grupo control tratado con PBS.

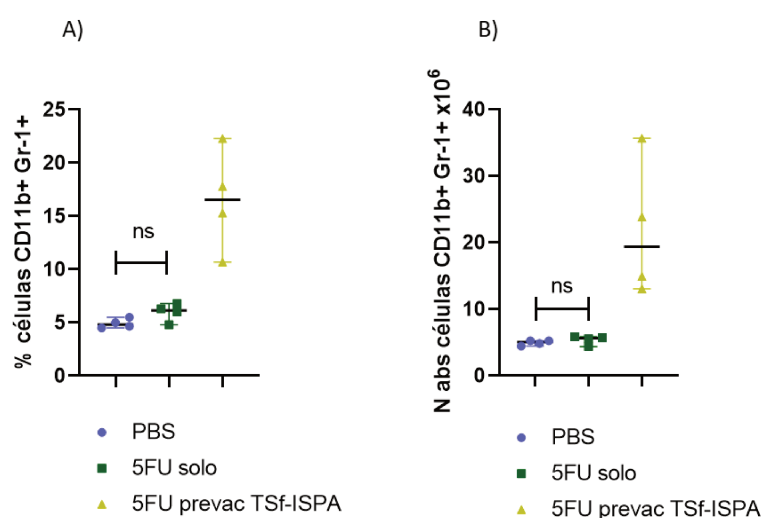


Figura 20: Células CD11b+Gr-1+ a los 7 días luego de tratamiento con 5FU solo, 5FU TSf-ISPA o PBS.

Al tiempo establecido, los animales fueron sacrificados, y se le midieron las alteraciones en los esplenocitos CD11b+Gr-1+ de los diferentes grupos mediante citometría de flujo. **A)** Porcentaje de esplenocitos CD11b+Gr-1+ en los grupos PBS, 5FU solo y 5FU prevac TSf-ISPA. **B)** Número absoluto de células CD11b+Gr-1+ ($\times 10^6$) en los grupos en estudio. Los datos se expresan como medianas $\pm$ IC 95% con un $n=4$ ratones por grupo. ns, test no significativo luego de Mann-Whitney entre los grupos indicados.

Capacidad supresora de las células MDSCs

Si bien en nuestro modelo ya hemos confirmado que los esplenocitos CD11b+Gr-1+ que aumentan luego de la infección con *T. cruzi* poseen capacidad supresora, incluyendo MDSCs (168) y numerosos trabajos han mostrado que distintos protocolos de inmunización pueden generar aumentos de células CD11b+Gr-1+ MDSCs (114) se realizaron ensayos para aportar evidencia de que en nuestro modelo de trabajo los esplenocitos CD11b+Gr-1+ que aumentan durante la etapa de inmunización también incluyen células que poseen función supresora y por lo tanto contienen MDSCs.

Con esta finalidad, se purificaron células Gr-1+ de ratones inmunizados con TSf-ISPA a los 7 días posteriores a la última dosis de vacuna, y se llevaron a cabo cultivos en dos condiciones: en cocultivo con células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC), para evaluar su efecto inhibitorio sobre estas, y en cocultivo

con BMDCs más esplenocitos marcados con CFSE, con el fin de examinar la supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+.

Capacidad Supresora de las células Gr-1+ sobre células dendríticas derivadas de médula ósea

Los esplenocitos Gr-1+ se purificaron mediante separación magnética a partir de ratones inmunizados con TSf-ISPA, siete días después de la administración de la última dosis de inmunización. Las BMDCs se generaron *in vitro* siguiendo protocolos estándar, cuyo desarrollo y metodología fueron descritos previamente (193,194). Posteriormente, las células Gr-1+ y las BMDCs fueron co-cultivadas en presencia de LPS (1 µg/ml) durante 3 días a generaron *in vitro* siguiendo protocolos estándar, cuyo desarrollo y metodología se describió previamente 37 °C y 5 % de CO₂. La capacidad supresora de las células Gr-1+ se evaluó midiendo su efecto inhibitorio sobre la expresión de los marcadores de activación MHCII y CD80 en células dendríticas CD11c^{high}+, mediante análisis por citometría de flujo. La Figura 21 muestra que las CDs co-cultivadas en presencia de células Gr-1+ purificadas presentaron menor porcentaje de expresión de MHCII y CD80 en las células dendríticas CD11c^{high}+, y menor MFI (intensidad de fluorescencia media) de MHCII y CD80 en dichas CDs, aportando evidencia de que las células purificadas tienen la capacidad de inhibir la maduración de las BMDCs.

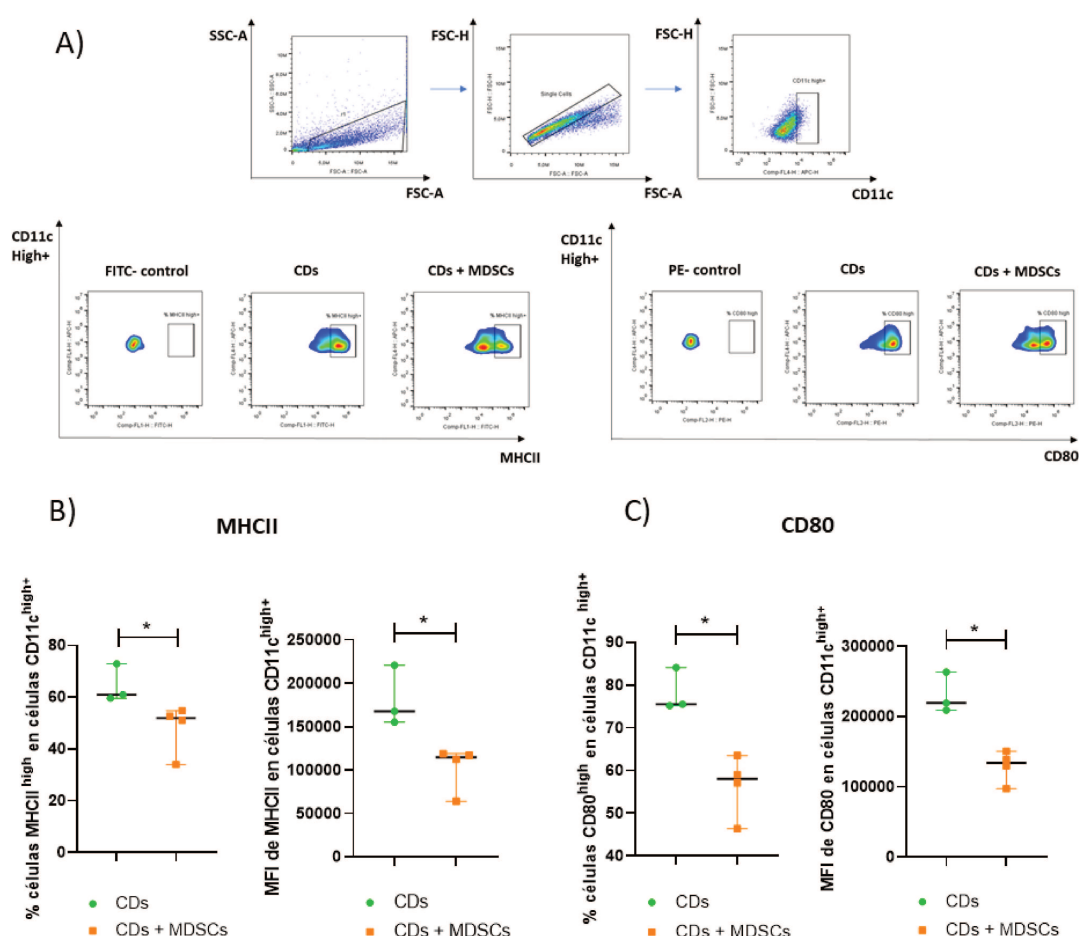


Figura 21: Capacidad supresora de las MDSCs sobre las BMDCs. Los esplenocitos Gr-1+ se purificaron mediante separación celular magnética a partir de esplenocitos de ratones inmunizados con TSf-ISPA, siete días después de la última dosis de inmunización. Las BMDCs se generaron *in vitro* utilizando protocolos estándar. Las células BMDCs y las células Gr-1+ se cocultivaron en presencia de LPS (1 µg/ml) durante 3 días a 37 °C y 5 % de CO₂, y posteriormente se recuperaron y tiñeron para citometría de flujo. **A)** Gráficos de puntos representativos que muestran la estrategia de selección de células CD11chigh+ y el posterior análisis de la capacidad supresora de las células Gr-1+, evaluando la expresión de moléculas coestimuladoras como MHCII y CD80 en las células CD11chigh+ co-cultivadas con células Gr-1+ (CDs + MDSCs) o no co-cultivadas con células Gr-1+ (CDs). **B)** Porcentaje de células MHCIIhigh dentro de las células CD11chigh+ y MFI de MHCII dentro de las células CD11chigh+ en los pocillos cocultivados con células Gr-1+ (CDs + MDSCs) o no cocultivados con células Gr-1+ (CDs) (Los datos se expresan como mediana ± IC 95%). **C)** Porcentaje de células CD80high dentro de las células CD11chigh+ y MFI de CD80 dentro de las células CD11chigh+ en los pocillos cocultivados con células Gr-1+ (CDs + MDSCs) o no cocultivados con células Gr-1+ (CDs) (Los datos se expresan como mediana ± IC 95%) (n = 3-4 pocillos por grupo). El resultado es representativo de dos experimentos independientes. *p < 0,05, test de Mann-Whitney de una cola, debido a evidencia previa de capacidad supresora de las células Gr-1+.

Capacidad supresora de las células Gr-1+ sobre la proliferación de linfocitos T CD4+

Para analizar la capacidad supresora de las células Gr-1+ purificadas sobre la proliferación de los linfocitos T CD4+, se agregaron esplenocitos de ratones sanos marcados con CFSE a los cocultivos descritos en el ítem anterior. Los cultivos fueron estimulados con LPS (1 µg/ml) y Con A (5 µg/mL), y tras un periodo de incubación de 48 a 72 horas, se realizó un análisis por citometría de flujo para determinar la dilución del CFSE en las células CD4+ (193). La Figura 22 A muestra la estrategia de selección de regiones aplicada, mientras que la Figura 22 B muestra histogramas representativos de la proliferación de células CFSE+ dentro de la población de células CD4+. En línea con los resultados obtenidos sobre CDs, la Figura 22 C muestra que se produjo una reducción en el porcentaje de proliferación de las células CD4+ cuando se incorporaron células Gr-1+ purificadas a los cultivos que contienen BMDCs y esplenocitos marcados con CFSE.

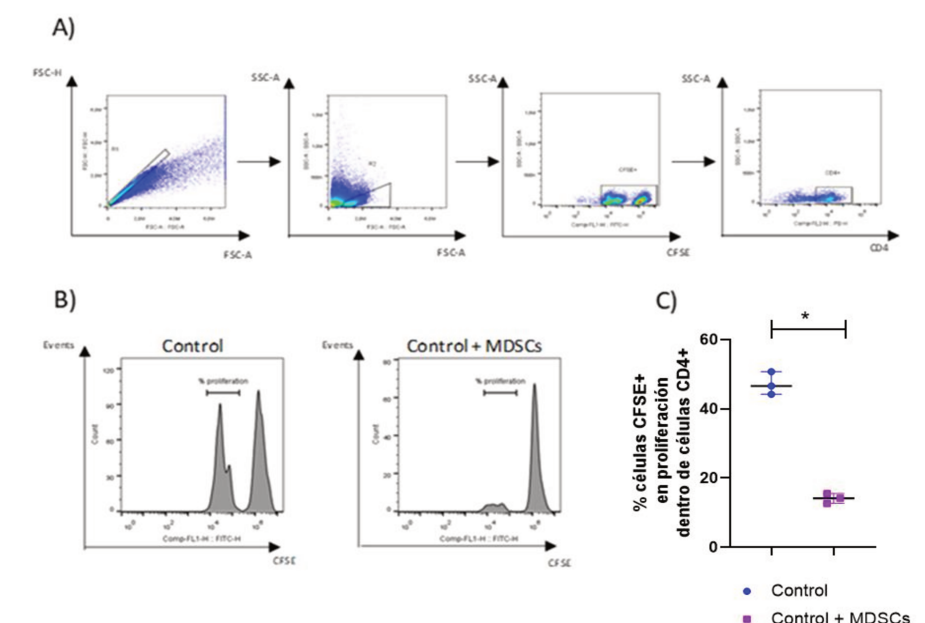


Figura 22: Supresión de la proliferación de células CD4+ por células Gr-1+ purificadas. **A)** Dot plots representativos de la toma de regiones para el análisis de la citometría de flujo. **B)** Histogramas representativos de la dilución del CFSE dentro de las células CD4+ en los pocillos control y en presencia de las células Gr-1+ purificadas, y **C)** porcentaje de proliferación de las células CFSE+ dentro de las células CD4+ en el grupo control vs el grupo experimental en presencia de células Gr-1+. n= 3 pocillos por grupo, p<0,05, Test de Mann-Whitney de una cola, debido a evidencia previa de capacidad supresora de las células Gr-1+. El ensayo se repitió dos veces con resultados similares.

En su conjunto, los resultados aportan evidencia de que las células Gr-1+ purificadas el día 7 post-inm con el protocolo TSf-ISPA incluyen células MDSCs, inhibiendo la maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea, así como la proliferación de linfocitos T CD4+.

Selección entre estrategia de una o dos dosis de 5FU para potenciar la formulación TSf-ISPA

Una vez seleccionada la estrategia de administración 5FU prevac TSf-ISPA, se procedió a completar el análisis de la cinética de las MDSCs en el bazo, repitiendo el ensayo e incluyendo no solo los días 7 y 15, (como se mostró previamente en la Figura 18), sino también a los 2 días post-inm, completando de ese modo la cinética de dichas células durante los 15 días post-inm luego de la última dosis de vacuna. Para mayor claridad, en adelante, la formulación “5FU Prevac TSf-ISPA” se denominó “5FU TSf-ISPA”.

La Figura 23 (A y B) muestra que el porcentaje y número absoluto de las células CD11b+Gr-1+ de los animales inmunizados y tratados con 5FU TSf-ISPA efectivamente se mantienen bajos, y al mismo nivel de los animales tratados con PBS al día 2 post-inm. Sin embargo, luego aumentan significativamente al día 7 post-inm

y se mantienen o disminuyen ligeramente al día 15 post-inm, pero manteniéndose por encima del grupo control tratado con PBS.

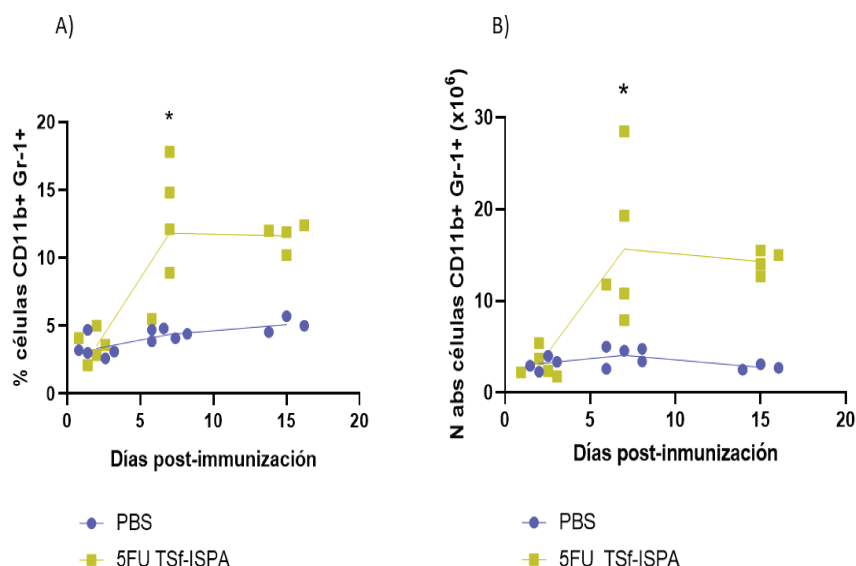


Figura 23: Alteraciones de los esplenocitos CD11b⁺ Gr-1⁺ en distintos días post-inm con 5FU TSf-ISPA. Los ratones fueron tratados con 5FU TSf-ISPA o PBS tres veces cada dos semanas y sacrificados para obtener esplenocitos en distintos días después de la última dosis de inmunización. Cinética del porcentaje (A) y número absoluto (n abs) (x10⁶) (B) de células CD11b⁺Gr-1⁺ en distintos días post-inmunización (2, 7 y 15 días) en esplenocitos de ratones tratados con PBS o 5FU TSf-ISPA. (Los datos se expresan como medianas y valores individuales (n = 3–5 ratones por grupo)). *p < 0,05, test de Mann-Whitney entre los grupos y días indicados.

Estos resultados sugieren fuertemente que si bien el 5FU es capaz de disminuir las células CD11b+Gr-1+ al día 2 post-inm a los niveles basales, no es capaz de evitar una expansión hacia el día 7 post-inm. Considerando que se ha descrito que puede ocurrir un efecto rebote al depletar esta población en un contexto inflamatorio (195), se procedió a analizar la factibilidad de administrar una dosis adicional de 5FU el día 8 post-inm, para tratar de controlar el aumento observado al día 7 post-inm.

Este protocolo denominado doble 5FU TSf-ISPA mantuvo niveles bajos de MDSCs al día 2 post-inm y logró además disminuir significativamente el porcentaje y número absoluto de dicha población hacia el día 15 post-inm, de forma que retornen a niveles similares a los animales tratados con PBS (Figura 24 A y B)

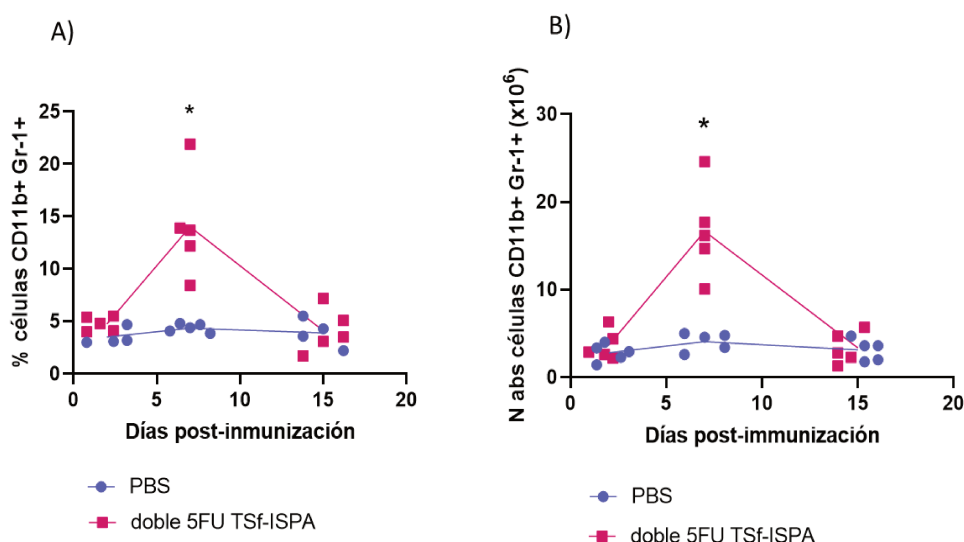


Figura 24: Alteraciones de los esplenocitos CD11b⁺ Gr-1⁺ en distintos días post-inm con doble 5FU TSf-IPSA. Los ratones fueron tratados con doble 5FU TSf-IPSA o PBS tres veces cada dos semanas y sacrificados para obtener esplenocitos en distintos días después de la última dosis de inmunización. Cinética del porcentaje (A) y número absoluto (n abs) (x10⁶) (B) de células CD11b⁺Gr-1⁺ en distintos días post-inm (2, 7 y 15 días) en esplenocitos de ratones tratados con PBS o doble 5FU TSf-IPSA. (Los datos se expresan como medianas y valores individuales (n = 5 ratones por grupo)). *p < 0,05, test de Mann-Whitney entre los grupos y días indicados.

A partir de los resultados obtenidos, se generó una comparación relativizando los valores de porcentaje y número absoluto de los esplenocitos CD11b+Gr-1+ de los grupos tratados con 5FU TSf-IPSA sobre los valores del grupo control PBS. Además se incluyó en la comparación y como referencia, valores disponibles de la relativización de los valores de CD11b+Gr-1+ en el grupo TSf-IPSA relativizado también al PBS.

La Figura 25 A y B muestra que al día 2 post-inm, ambos grupos tratados con 5FU disminuyen significativamente los niveles de células MDSCs en comparación del grupo tratado solo con TSf-IPSA, (coincidente con la depleción causada por el 5FU), mientras que al día 15, el grupo doble 5FU TSf-IPSA disminuye significativamente el ratio de células MDSCs en comparación del grupo tratado con una sola dosis de 5FU TSf-IPSA, aportando evidencia de que dos dosis de 5FU permiten reducir dicha población hacia el día 15 post-inm.

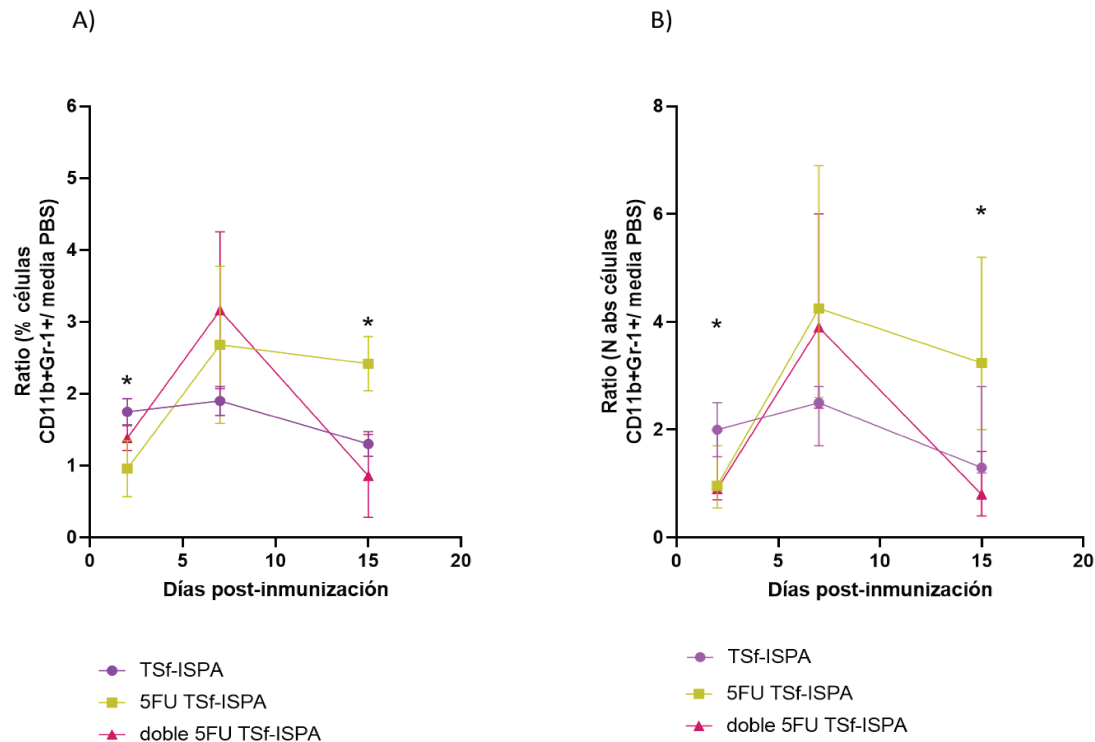


Figura 25: Alteraciones en el ratio de los esplenocitos CD11b⁺ Gr-1⁺ en distintos días post-inm entre los grupos TSf-ISPAs, 5FU TSf-ISPAs y doble 5FU TSf-ISPAs relativizados al valor promedio del grupo control PBS en cada experimento. Los ratones de cada grupo experimental fueron sacrificados para obtener esplenocitos en distintos días después de la última dosis de inmunización. Cinética del ratio del porcentaje **A)** y número absoluto (n abs) (x10⁶) **B)** de células CD11b⁺Gr-1⁺ en distintos días post-inm (2, 7 y 15 días) en esplenocitos de ratones tratados TSf-ISPAs, 5FU TSf-ISPAs y doble 5FU TSf-ISPAs, relativizados a los valores promedio del PBS en cada experimento. (Los datos se expresan como medianas $\pm$ IC 95%; n = 3-5 ratones por grupo). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn con corrección de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples. En el Día 2, se indican diferencias significativas (*p < 0,05) en el porcentaje y número absoluto para las comparaciones TSf-ISPAs vs. 5FU TSf-ISPAs y TSf-ISPAs vs. doble 5FU TSf-ISPAs. En el Día 15, se indican diferencias significativas (*p < 0,05) tanto en el porcentaje como en el número absoluto para las comparaciones 5FU TSf-ISPAs vs. doble 5FU TSf-ISPAs.

Respuesta humoral y celular en los grupos vacunados con TSf-ISPAs y tratados con una o dos dosis de 5FU

Paralelamente al análisis de la cinética de células MDSCs, se evaluó la producción de anticuerpos plasmáticos IgG anti-TSf y la respuesta DTH, en los grupos experimentales.

La Figura 26 muestra los resultados expresados como el ratio de los valores experimentales obtenidos para cada grupo en relación a los valores promedios de DO y delta DTH del grupo PBS. En ambas mediciones se observó una tendencia ascendente en el orden TSf-ISPAs < 5FU TSf-ISPAs < doble 5FU TSf-ISPAs,

observándose un aumento significativo en la respuesta DTH del grupo doble 5FU TSf-ISPA con respecto a los grupos TSf-ISPA y 5FU TSf-ISPA.

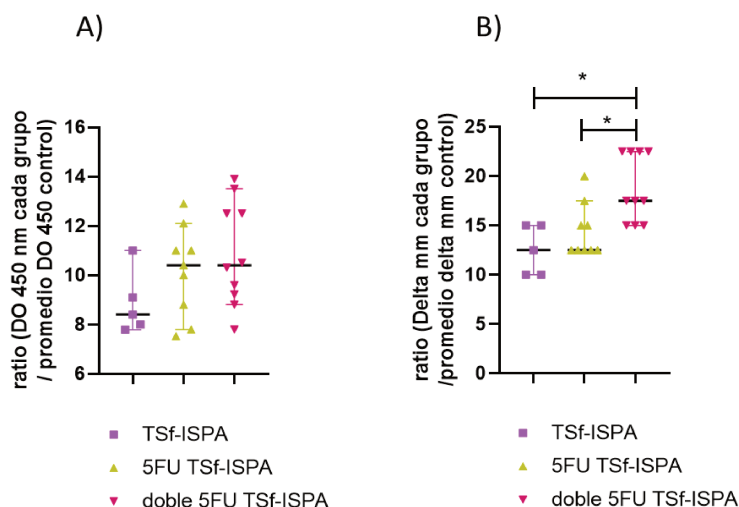


Figura 26: Evaluación de producción de anticuerpos IgG anti-TSf y respuesta DTH a los 7 días post-inmunización.

Ratones BALB/c fueron tratados con PBS, TSf-ISPA, 5FU TSf-ISPA y doble 5FU TSf-ISPA. (A) Se analizaron muestras de plasma para detectar anticuerpos IgG totales específicos contra TSf mediante ELISA a los 7 días post-inm. Se calculó el promedio de la DO del grupo control PBS y se obtuvo el ratio para cada animal de cada grupo luego de dividir los valores individuales por dicho promedio (ratio DO 450 nm cada animal de cada grupo/ promedio DO 450 nm grupo control PBS). (B) A los 5 días post-inm se evaluó la respuesta de DTH en los mismos grupos experimentales. Se calculó el promedio DTH del grupo control PBS y se obtuvo el ratio para cada animal de cada grupo luego de dividir los valores por dicho promedio (ratio delta mm cada animal de cada grupo/ promedio delta mm grupo control PBS) (n=3-10 ratones por grupo). Los datos se presentan como medianas ± IC 95%. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn con corrección de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples, *p<0,05 entre los grupos indicados.

Evaluación de la capacidad protectora. Desafíos con *T. cruzi*

Para definir la mejor estrategia de inmunización, se comparó la capacidad protectora de los grupos tratados con TSf-ISPA y una o dos dosis de 5FU ante desafíos con distintas dosis letales de *T. cruzi* de la cepa Tulahuén. Dado que los protocolos de vacunación con 5FU han logrado generar 100% de supervivencia ante dosis de 1000 parásitos Tulahuén (168), en este caso los animales se desafiaron i.p. con dosis letales elevadas de 2000 o 3000 parásitos, con el fin de poder distinguir diferencias en la capacidad protectora de ambas formulaciones.

Como se muestra en la Figura 27 A, B, C y D, la formulación doble 5FU TSf-ISPA logró mejor capacidad protectora en ambos casos, en relación a una disminución en la parasitemia (A y B), como de la supervivencia (C y D), por lo que se seleccionó dicha formulación como la más promisoría para seguir en los próximos estudios de protección en diversos modelos murinos.

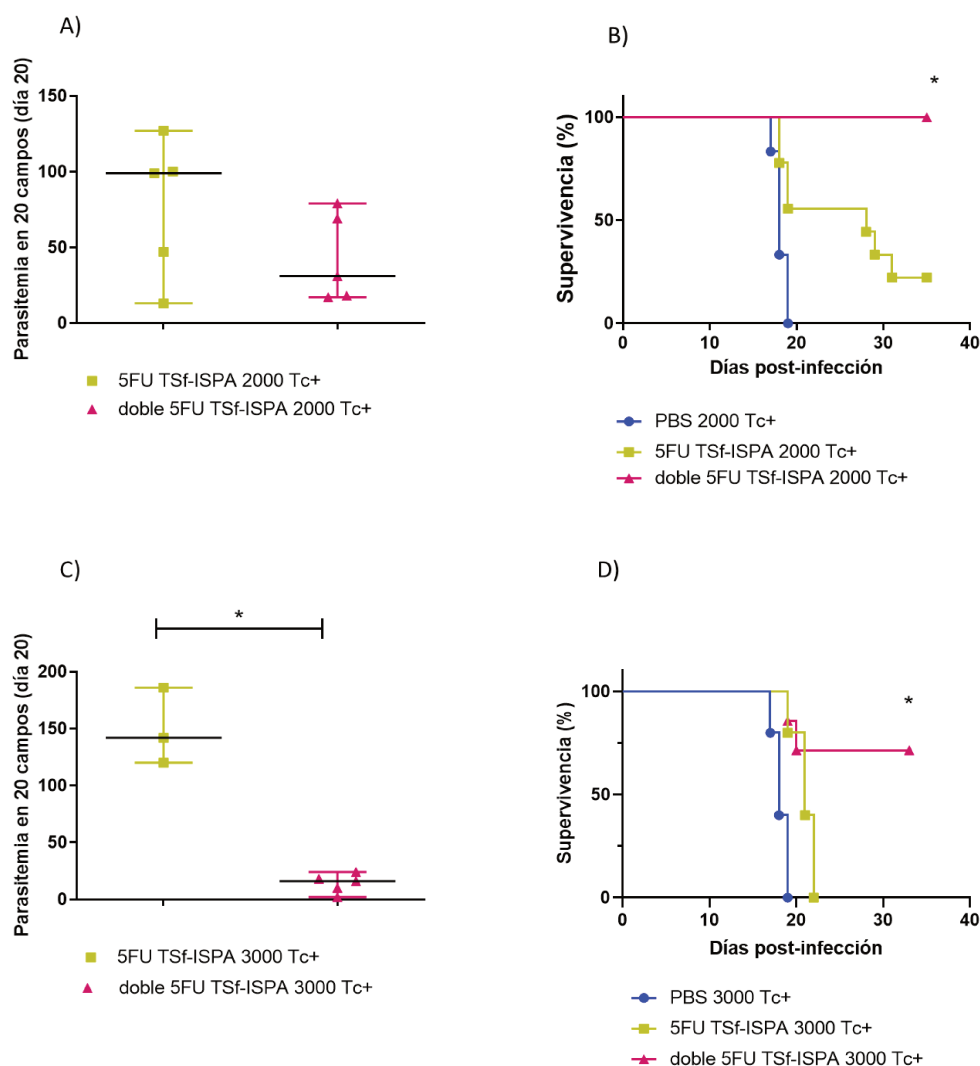


Figura 27: Evaluación de la parasitemia y supervivencia de ratones BALB/c inmunizados con 5FU TSf-ISPAs o doble 5FU TSf-ISPAs, infectados con 2000 y 3000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén. Parasitemia **A)** y supervivencia. **B)** de ratones inmunizados con 5FU TSf-ISPAs y doble 5FU TSf-ISPAs, infectados con 2000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* 15 días después de la última dosis de inmunización. La parasitemia se muestra al día 20 post-infección (los datos se expresan como medianas $\pm$ IC 95%). Debido a la elevada dosis empleada, todos los ratones del grupo PBS murieron antes del día 20 post-infección. La supervivencia se muestra hasta el día 35 post-infección (n=5-7). * $p < 0,05$ entre doble 5FU TSf-ISPAs vs. 5FU TSf-ISPAs o PBS, test de Log-rank. Parasitemia **C)** y supervivencia **D)** de ratones inmunizados con 5FU TSf-ISPAs y doble 5FU TSf-ISPAs, infectados con 3000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. La parasitemia se muestra al día 20 post-infección (los datos se expresan como medianas $\pm$ IC95%, * $p < 0,05$, Mann-Whitney para comparación de parasitemias (todos los ratones del grupo PBS murieron antes del día 20 post-infección). La supervivencia se muestra hasta el día 35 post-infección (n=5-9). * $p < 0,05$ entre doble 5FU TSf-ISPAs vs. 5FU TSf-ISPAs o PBS (test de Log-rank).

Discusión

Un objetivo central de la vacunación se relaciona con la capacidad de generar una respuesta inmune con el perfil adecuado para enfrentar posteriormente al patógeno contra el cual fue diseñada la vacuna. En el caso de *T. cruzi*, cuyo ciclo de vida es complejo e incluye estadios intra y extracelulares en el huésped, la evidencia acumulada apoya la necesidad de inducir una respuesta inmune integral, que contemple tanto componentes humorales como celulares (57). En este sentido, resulta de particular interés la generación de una respuesta que incluya presentación cruzada por parte de CDs, de modo que se estimule una respuesta de linfocitos T CD8⁺ dirigida contra los epítomos incluidos en el inmunógeno (48,70).

Los adyuvantes de cajas lipídicas, como ISPA, han demostrado poseer esta capacidad (93,161,162), lo que les confiere un alto potencial para el diseño racional de vacunas contra este parásito. Debido a que la inducción de una respuesta inmune potente puede acompañarse de incrementos en poblaciones de células MDSCs, no solo en el caso de ISPA, sino en diferentes modelos de inmunización (96), en estudios previos evaluamos la posibilidad de depletar dichas células, con el fin de potenciar aún más el brazo efector del sistema inmune.

Considerando la evidencia que avala el uso de 5FU para depletar de manera selectiva a las células MDSCs, y su uso aprobado por la FDA en humanos, del 5FU o bien de precursores, y con la finalidad de depletar MDSCs en pruebas clínicas (196), e incluso en el contexto de la infección por *T. cruzi* (118,120), nuestro grupo de trabajo inició una línea de investigación orientada a optimizar racionalmente la formulación vacunal TSf-ISPA, incorporando una dosis intraperitoneal de 5FU el día previo a cada dosis de vacuna, en concordancia con los esquemas experimentales previamente descritos. Luego de controlar que en nuestro modelo no se produjeran diferencias significativas en otras poblaciones celulares como células B, CD4⁺, CD8⁺ o CDs, presentado en un trabajo de tesina previo (197) y en línea con los reportes de la dosis empleada en modelos murinos (118,120,121), el protocolo empleado potenció la capacidad protectora del candidato vacunal (168). Si bien no puede descartarse que el tratamiento con 5FU haya afectado otros parámetros biológicos no evaluados, el hecho de que se haya logrado aumentar la protección contra *T. cruzi*, en base a la estrategia racional diseñada, reforzó la posibilidad de ensayar nuevos diseños vacunales basados en el uso de 5FU.

De acuerdo con este resultado previo, en esta tesis se analizaron en primer lugar otras alternativas de administración de 5FU para acompañar a la formulación TSf-ISPA, de un modo que permitiera mejorar la aplicación práctica o la respuesta inmune generada. La comparación entre la administración i.p. de 5FU el día previo a la vacuna TSf-ISPA (Prevac) y la inoculación s.c. conjunta de 5FU y TSf-ISPA (Covac), la cual sería una manera más práctica de administrar ambos componentes, mostró una tendencia a mayor respuesta en la primera estrategia, en relación a la producción de anticuerpos IgG anti-TSf y respuesta DTH, pero sin alcanzar diferencias significativas.

Sin embargo, el análisis de la cinética de cambio de los esplenocitos CD11b⁺Gr-1⁺ aportó evidencia de que el tratamiento Covac genera cambios más similares a los causados por la administración de TSf-ISPA sola, mientras que la inoculación Prevac se diferenció más del grupo TSf-ISPA, e incluso de la administración Covac, de manera significativa en cuanto al número absoluto de células CD11b⁺Gr-1⁺ al día 15 post-inm.

Considerando que el grupo Prevac mostró mayor supervivencia que el grupo TSf-ISPA, y que el grupo Covac se diferenció menos que el grupo Prevac del grupo TSf-ISPA, en este trabajo de tesis se optó por continuar con el empleo de la administración i.p. de 5FU el día previo para potenciar la formulación TSf-ISPA, de manera de trabajar con el modelo más promisorio en cuanto a la generación de la máxima capacidad protectora.

No obstante, cabe resaltar que la administración conjunta, si bien no fue seleccionada, no mostró resultados negativos, por lo que eventualmente podría retomarse en caso de que en futuros estudios se decida priorizar una estrategia más práctica, como se comentará también más adelante.

El hecho de que la formulación con mayor capacidad protectora haya mostrado mayores incrementos de células CD11b⁺Gr-1⁺, está en línea con otros estudios que han reportado que la depleción abrupta de células MDSCs genera un estímulo capaz de inducir una mayor liberación de estas células desde médula ósea, en lo que se ha descrito como un *efecto rebote* (118). De todas formas, para analizar que en nuestro modelo efectivamente se esté produciendo la depleción esperada por la administración de 5FU, se midieron los niveles de dichas células en el bazo a las 72 hs después de la administración del 5FU, coincidente con las 48hs posteriores al tratamiento con TSf-ISPA.

Los resultados mostraron una muy significativa disminución de células CD11b⁺Gr-1⁺ en el grupo tratado con 5FU previo a la inoculación de TSf-ISPA, en comparación al grupo tratado solo con TSf-ISPA, aportando evidencia de que el tratamiento de depleción se produce de acuerdo a lo esperado y que efectivamente el mayor incremento de dichas células observado al día 7 post-inm, podría estar causado por un efecto rebote, como se mencionó anteriormente.

Por otra parte, antes de continuar con la caracterización y optimización del diseño racional de nuestro candidato vacunal, se realizaron ensayos de purificación y evaluación de la capacidad supresora de las células CD11b⁺Gr-1⁺, con el objetivo de aportar evidencia de que esta población se comporta de manera semejante a lo descrito en otros modelos de inmunización (114,118,119).

Ribechini y colaboradores han reportado, por ejemplo, que las células CD11b⁺Gr-1⁺ que aumentan luego de la inmunización con *M. tuberculosis* inactivado por calor son capaces de afectar la respuesta inmune, incluso induciendo la muerte de CD4. En la misma dirección de dicho reporte, nuestros resultados mostraron que las células Gr-1⁺ purificadas de ratones tratados con TSf-ISPA fueron capaces de disminuir la maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea, evidenciado por la disminución en la expresión de CD80 y

MHC II en comparación con los cultivos realizados en ausencia de células Gr-1+. Asimismo, el agregado de esplenocitos marcados con CFSE mostró que la presencia de células Gr-1+ purificadas de animales inmunizados disminuye la proliferación de esplenocitos CD4+ estimulados con Con A. Por lo tanto, en su conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que al menos parte de las células CD11b+Gr-1+ que se expanden de manera notoria al día 7 post-inm poseen la capacidad de suprimir la respuesta inmune efectora, afectando tanto a CD8 como a linfocitos T CD4+, directa o indirectamente. Si bien esta población es heterogénea y no es posible determinar qué proporción de sus células posee individualmente capacidad supresora, en adelante se denominará MDSCs, en concordancia con el uso habitual una vez demostrada la capacidad supresora de la población total ((100,109).

A continuación, con el fin de disponer de mayor información para explorar nuevas alternativas orientadas a mejorar la estrategia vacunal, se caracterizó la cinética de cambio de las células MDSCs durante los primeros 15 días post-inm (de la última dosis). Estos resultados mostraron que el tratamiento con 5FU disminuye las células MDSCs al día 2 post-inm, que sin embargo, aumentan hacia el día 7 post-inm y que incluso dichas células permanecen elevadas al menos hasta el día 15 pos-imm. El esclarecimiento de esta cinética abrió la posibilidad a la administración de dosis adicionales de 5FU destinadas a contrarrestar el aumento observado al día 7-post-inm. Inicialmente se realizó un ensayo preliminar de doble dosis al día 4 post-inm, pero el mismo no logró mejorar los resultados ya obtenidos (datos no mostrados). Considerando que la administración de refuerzo en la primera semana post-inm no fue productiva, se procedió a evaluar la administración de una segunda dosis, al día 8 post-inm con el fin de disminuir las células expandidas al día 7, en un protocolo que se denominó doble 5FU TSf-ISPA. El análisis de esta cinética mostró que este protocolo con dos dosis de 5FU fue capaz de disminuir significativamente la población de células MDSCs hacia el día 15 post-inm, generando una estrategia con potencial para mejorar el protocolo de vacunación.

Para nuestro conocimiento, este tipo de estudio focalizado en comprender la cinética de cambio de las células MDSCs no ha sido llevado a cabo anteriormente. Si bien se ha determinado en muchos casos la expansión de esta población, sugiriendo que podría restringir la respuesta efectora, no se ha profundizado sobre el cambio en el periodo de tiempo posterior a la inmunización.

Para iniciar una comparación entre los protocolos con 1 y 2 dosis de 5FU en la etapa de inmunización con TSf-ISPA, se midieron los anticuerpos específicos IgG anti-TSf y la respuesta DTH. En este caso, los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa en los niveles de anticuerpos, sugiriendo que el cambio en la cinética de MDSCs no incidiría sobre esta variable inmune. Estos resultados no descartan que la respuesta humoral participe con un rol protector similar en todos los candidatos vacunales ensayados: TSf-ISPA, 5FU TSf-ISPA y doble 5FU TSf-ISPA.

En cambio, se observó un aumento leve pero significativo de la respuesta DTH con el protocolo basado en dos dosis de 5FU, en comparación de 1 dosis, sugiriendo que la respuesta celular podría incrementarse al disminuir las células MDSCs durante la segunda semana post-inm.

A continuación, para obtener información que apoyara la elección de una u otra estrategia vacunal basada en 1 o dos dosis de 5FU, se realizaron experimentos de infección con dosis letales y elevadas de parásitos. Dado que previamente se observó que una dosis de 1000 parásitos Tulahuén resulta 100% letal en ratones PBS, pero los animales vacunados con una dosis de 5FU y TSf-ISPA mostraron supervivencia del 100% (168), se decidió emplear dosis de 2000 y 3000 parásitos de modo de causar una mortalidad significativa en los grupos vacunados, que permitiera discernir si alguno de los dos protocolos posee mayor capacidad protectora. Los resultados mostraron que los animales tratados con dos dosis de 5FU lograron mayor protección en ambos casos, tanto con respecto a la supervivencia como a la parasitemia, en cuyo caso la tendencia fue siempre la misma, y alcanzó diferencia significativa en los ratones inoculados con 3000 parásitos.

En conjunto, estos resultados aportan evidencia sobre la amplitud de eventos en que las MDSCs pueden estar involucradas. Estudios de otros grupos y del nuestro han aportado evidencia del papel dual desempeñado por las MDSCs durante la infección por *T. cruzi*: por un lado, controlan la inflamación y restringen la respuesta efectora, pero al mismo tiempo cumplen un papel no menor en la supervivencia del huésped, dado que la depleción de estas células aumenta significativamente la mortalidad de los animales infectados (118–120,164,168,193,198). Asimismo, se ha observado que, a pesar de que los niveles de MDSCs disminuyen en los animales vacunados durante la infección, en comparación de los controles no vacunados e infectados, las células remanentes aún son capaces de modelar la respuesta inmune generada (168). Ampliando el espectro de acontecimientos en que estas células pueden participar, y en consonancia con otros reportes en distintos sistemas vacunales, los resultados presentados en esta Tesis describen que las MDSCs participan también durante la etapa de inmunización con la formulación TSf-ISPA. Profundizando en las alteraciones de esta población, se observó que las MDSCs siguen una cinética particular durante la inmunización y que el tratamiento con 5FU como estrategia para controlar dicha expansión es capaz de modificar significativamente esa cinética, hecho que correlacionó con una mayor capacidad protectora frente a la infección por *T. cruzi*.

De esta manera, si bien no puede descartarse que otros efectos inmunológicos adicionales derivados del uso del 5FU hayan contribuido parcialmente en la protección observada los resultados permiten proponer nuevas perspectivas para el diseño racional de candidatos vacunales contra *T. cruzi*, dirigidas no solo a potenciar la respuesta efectora, sino también a incorporar una visión integral del sistema inmune que incluya componentes del brazo regulatorio, como las MDSCs, como blancos complementarios para la optimización de una vacuna contra la EC.

Conclusiones Parciales

- El protocolo Covac (administración simultánea de TSf-ISPA y 5FU) generó una respuesta inmune más similar a la obtenida con la formulación simple de TSf-ISPA, en términos de niveles de anticuerpos, respuesta DTH y cinética de esplenocitos CD11b⁺Gr-1⁺, y diferente de la inducida por el protocolo Prevac, el cual ha demostrado previamente mayor capacidad protectora que TSf-ISPA.
- Las células Gr-1⁺ purificadas durante el protocolo de vacunación mostraron capacidad supresora *in vitro*, evidenciada por la inhibición de la maduración BMDCs y de la proliferación de linfocitos T CD4⁺, lo que aporta evidencia sobre su rol supresor en el contexto de la inmunización.
- A diferencia del protocolo Prevac basado en una única dosis de 5FU, el esquema con doble dosis de 5FU TSf-ISPA logró disminuir la población de esplenocitos CD11b⁺Gr-1⁺ hacia el día 15 post-inm.
- No se obtuvo evidencia de que el tratamiento con dos dosis de 5FU aumente la respuesta humoral en relación al uso de una dosis 5FU, mientras que se observó un incremento de la respuesta celular, medida en términos de la respuesta DTH, la cual se asoció con una mayor capacidad protectora frente al desafío empleando dosis letales de *T. cruzi* (cepa Tulahuén).
- El protocolo doble 5FU TSf-ISPA logró mayor capacidad protectora ante dosis elevadas de *T. cruzi*, en comparación del protocolo 5FU TSf-ISPA, en términos de parasitemia y supervivencia.

Por lo tanto, en función de estos resultados, se seleccionó el protocolo doble 5FU TSf-ISPA para avanzar con los siguientes objetivos de la tesis.

Capítulo 2

"Evaluación en diferentes modelos murinos de la capacidad protectora contra T. cruzi de los compuestos 5FU y TSf-ISPA"



Introducción

T. cruzi es predominantemente diploide y típicamente se reproduce de forma asexual a través de la división binaria, pero existe evidencia de hibridación natural, intercambio genético entre cepas y reproducción sexual (199).

La diversidad genética y biológica de *T. cruzi* motivó durante décadas la búsqueda de un sistema unificado de clasificación que permitiera agrupar las cepas en clases evolutivas estables y comparables entre estudios. Ante esta necesidad, un comité internacional de expertos propuso en 2009 una nomenclatura basada en Unidades Discretas de Tipificación (*Discrete Typing Units*, DTUs), definidas como conjuntos de poblaciones parasitarias más similares entre sí que respecto de cualquier otro grupo, y distinguibles mediante marcadores moleculares reproducibles (10).

Inicialmente, *T. cruzi* se dividió en dos grandes grupos (*T. cruzi* I y *T. cruzi* II) sustentados en diferencias biológicas, bioquímicas y genéticas. Sin embargo, el avance de la genotipificación multilocus reveló que esa clasificación era insuficiente y que la diversidad real del parásito comprendía seis linajes principales, denominados TcI–TcVI, a los cuales posteriormente se sumó un séptimo, TcBat, hallado inicialmente en murciélagos.

Origen evolutivo de las DTUs

La evidencia filogenética indica que TcI y TcII representan linajes ancestrales, que han evolucionado de manera independiente durante largos periodos evolutivos. Por otra parte, TcV y TcVI son linajes híbridos, originados por eventos de recombinación entre ancestros de TcII y TcIII. Aunque aún se debate si estos híbridos surgieron por un único evento o por eventos independientes, existe consenso en que sus orígenes son evolutivamente antiguos (12).

La evolución de TcIII y TcIV ha sido discutida extensamente, y aunque algunos modelos proponen que son híbridos, otros estudios sugieren que se derivan de un ancestro común relacionado con TcI (5). Finalmente, TcBat, estrechamente emparentado con TcI, representa un linaje que circula principalmente en murciélagos y cuyo rol ecoepidemiológico aún se investiga (5).

Criterios genéticos y moleculares para la identificación de DTUs

El uso del rRNA 24S α , la región intergénica del mini-exon, el ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), entre otros, permitió diferenciar de forma robusta a los linajes DTU I y II de *T. cruzi*. Luego, la DTU II fue subdividida en cinco (DTU II–VI), utilizando información filogenética derivada de marcadores RAPD y MLEE (Electroforesis de enzimas multilocus) (5,10).

Además, a partir de la secuenciación se dividió el genoma en dos compartimentos: el núcleo (conservado) y el disruptivo (variable en longitud y con familias de genes multicopia entre las cepas (199). La región disruptiva de *T. cruzi* incluye un alto contenido de secuencias repetidas y familias multigénicas altamente expandidas (TS, mucinas, MASP), elementos que presentan variaciones cuantitativas características entre DTUs. Por ejemplo, los genomas TcI tienden a ser más pequeños y presentan menor expansión de estas familias respecto de los linajes híbridos como TcV y TcVI, que muestran mayor plasticidad genómica y variabilidad de antígenos de superficie (12).

A pesar de la estabilidad de las DTUs como linajes genéticos, existe una marcada heterogeneidad genética y biológica entre cepas pertenecientes a una misma DTU. En consecuencia, la asignación a un DTU determinado no implica homogeneidad fenotípica ni funcional, lo que debe ser considerado al interpretar resultados experimentales y epidemiológicos (200).

Distribución eco-epidemiológica de las DTUs

T. cruzi es capaz de infectar más de 100 especies de mamíferos, entre ellas zarigüeyas, armadillos, murciélagos, carnívoros, roedores y primates, muchas de las cuales se encuentran en el ambiente silvestre. La diversidad está estrechamente ligada a su compleja red de transmisión, que involucra múltiples reservorios y vectores en distintos biomas americanos. La evidencia indica asociaciones preferenciales entre determinados mamíferos y DTUs (5):

TcI: ampliamente distribuida en América y se asocia fuertemente a zarigüeyas (*Didelphis spp.*), donde presenta una alta adaptación biológica.

TcII: se asocia predominantemente a ciclos de transmisión domésticos, con alta prevalencia en regiones del centro y sudeste de Brasil, y escasa presencia en ambientes silvestres.

TcIII: se encuentra frecuentemente en armadillos, especialmente en regiones del Chaco sudamericano, donde es dominante en el ciclo silvestre.

TcIV: predomina en primates no humanos en la Amazonia y en carnívoros silvestres del hemisferio norte como mapaches y mofetas.

TcV: presenta escasos reservorios silvestres conocidos, con detecciones puntuales en armadillos, pero muestra una marcada asociación con ciclos domésticos y una alta prevalencia en poblaciones humanas del Cono Sur, especialmente en Bolivia, Paraguay, Chile, Uruguay y Argentina.

TcVI: al igual que TcV, posee pocos reservorios silvestres documentados y se asocia principalmente a la transmisión doméstica, siendo altamente prevalente en infecciones humanas del Cono Sur.

TcBat: circula principalmente en murciélagos y se ha detectado en insectos asociados a colonias de quirópteros, aunque rara vez en otros mamíferos (5).

Estas asociaciones sugieren que cada DTU ha experimentado presiones selectivas específicas según los hospederos y ambientes en los que circula, lo que contribuyó a la diversificación del parásito.

La distribución de las DTUs refleja procesos de adaptación ecológica y coevolución con los hospedadores vertebrados, más que una simple segregación geográfica, contribuyendo a la estructuración genética de las poblaciones de *T. cruzi* (200).

Importancia clínica y epidemiológica de las DTUs

Si bien todas las DTUs son capaces de causar la EC, TcI, TcII, TcV y TcVI son las DTUs más prevalentes en pacientes de América Latina. La clasificación en DTUs permitió avanzar en la comprensión del vínculo entre genotipo parasitario, reservorios, distribución geográfica y patrones clínicos de la EC. Aunque la evidencia no es concluyente, diversos estudios indican:

TcI: predominante en Mesoamérica y norte de Sudamérica, se asocia con mayor frecuencia a formas cardíacas.

TcII, TcV y TcVI: predominantes en el Cono Sur, se han vinculado a mayor frecuencia de megaesófago y megacolon.

TcIII y TcIV: raros en humanos; más frecuentes en ciclos silvestres.

Sin embargo, la progresión clínica depende tanto del parásito como de la respuesta inmune del huésped, por lo que resulta difícil establecer relaciones causales directas entre DTU y formas clínicas (12,200). A pesar de esta limitación, el reconocimiento y la caracterización de las DTUs de *T. cruzi* han tenido un impacto significativo en el control, diagnóstico y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la EC, ya que permitieron comprender mejor la dinámica de transmisión del parásito en distintas regiones geográficas, las diferencias en la susceptibilidad a fármacos entre cepas y la importancia de considerar la diversidad genética del parásito en los ensayos preclínicos. Asimismo, este enfoque puso en evidencia las dificultades para el desarrollo de vacunas y terapias efectivas, derivadas de la marcada variabilidad de los antígenos de superficie y de las sofisticadas estrategias de evasión del sistema inmune que presenta *T. cruzi*. En este contexto, la existencia de una considerable variabilidad genética incluso dentro de una misma DTU refuerza la necesidad de incluir múltiples cepas representativas en los estudios farmacológicos y de vacunas, a fin de obtener resultados más robustos y transnacionalmente relevantes (12).

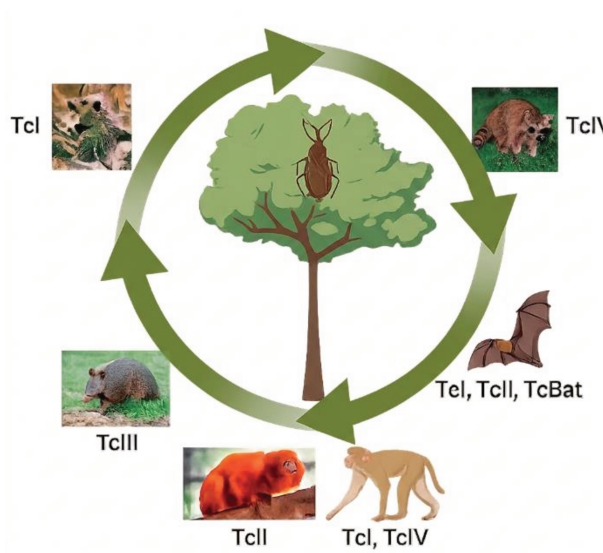


Figura 28: Reservorios selváticos de unidades discretas de tipificación (DTUs) de *T. cruzi*. La figura ilustra el consenso sobre la asociación preferencial, pero no exclusiva, de las DTU con ciertas especies de mamíferos silvestres. Figura modificada de (5).

Análisis Comparativo de las Cepas Dm28c y Tulahuén de *T. cruzi*

En la clasificación actual de *T. cruzi* en siete DTUs, las cepas Dm28c y Tulahuén representan características muy diferentes en la estructura poblacional del parásito.

La cepa Dm28c es un clon de referencia del linaje TcI, mientras que la cepa Tulahuén pertenece al linaje TcVI (5,12).

La diversidad genética de estas cepas está íntimamente ligada a sus ciclos de transmisión. La cepa Dm28c (TcI) se asocia frecuentemente con vectores del género *Rhodnius* y reservorios como los zarigüeyas (*Didelphis*), aunque su presencia en ciclos domésticos es creciente (5). En contraste, Tulahuén (TcVI) ha sido históricamente vinculada al ciclo doméstico en el Cono Sur de Sudamérica, transmitida principalmente por *Triatoma infestans*, y está fuertemente asociada a las manifestaciones clínicas crónicas de la enfermedad de Chagas en humanos (12).

En el ámbito experimental, la virulencia es un factor diferenciador clave. Mientras que Tulahuén es reconocida por su alta agresividad y mortalidad en modelos experimentales, Dm28c presenta una virulencia moderada. Por pertenecer a linajes genéticamente divergentes, presentar perfiles de virulencia contrastantes y constituir cepas de referencia ampliamente utilizadas en estudios preclínicos de vacunas contra *T. cruzi*, ambas cepas fueron seleccionadas para evaluar la capacidad protectora de la formulación vacunal en el presente trabajo.

La tabla 3 contiene diferencias entre ambas cepas.

Tabla 3: Comparación de propiedades genómicas y fenotípicas entre los linajes TcI (Dm28c) y TcVI (Tulahuén) de *T. cruzi*. (12,201–203).

Característica	Dm28c	Tulahuén
Linaje (DTU)	TcI	TcVI
Origen Biológico	<i>Didelphis marsupialis</i> (Zarigüeya)	Humano
Lugar Geográfico preponderante	Norte de Sudamérica / Centroamérica	Cono Sur (Chile/Argentina)
Estado de Ploidía	Diploide (Aprox. 2n = 80-90 Mb)	Diploide Híbrido (Mayor contenido de ADN)
Tipo de Genoma	No híbrido. Genoma "base" de TcI	Híbrido natural (de TcII y TcIII)
Genes Trans-sialidasa (TS)	~1,200 - 1,400 copias	~2,500 - 3,000+ copias (mucho mayor)
Genes MASP	Menor cantidad (~500-600)	Mayor expansión (~1,000+)
Genes Mucinas (TcMUC)	Proporcionalmente menor	Altamente expandido (característico de TcVI)
Compartimento Disruptivo	Menos complejo	Extremadamente complejo por hibridación
Parasitemia (BALB/c)	Baja a moderada, Suele cronificar	Alta
Parasitemia (C57BL/6)	Controlada (resistencia del ratón)	Alta
Severidad de Infección	Moderada. Foco principal en miocardio	Grave/Aguda. Alta carga en múltiples órganos
Tropismo Tisular	Principalmente cardíaco	Cardíaco, muscular y digestivo
Metaciclogénesis In Vitro	Excelente (estándar para estudios moleculares)	Pobre o irregular
Sensibilidad a Drogas	Sensibilidad variable (a veces resistencia natural)	Generalmente sensible a Benznidazol (estándar)

Comparación de la respuesta inmune en modelos BALB/c y C57BL/6 infectados con *T. cruzi*

Existe amplia evidencia de que la respuesta inmune en la interacción huésped-parásito no depende únicamente de la cepa de *T. cruzi*, sino también de la base genética del huésped. Numerosos estudios han caracterizado las diferencias en la respuesta inmune al emplear distintos modelos murinos, mostrando que prácticamente todos sus componentes pueden variar cuando se utiliza una misma cepa del parásito en diferentes huéspedes, e incluso ante la inmunización con antígenos parasitarios en distintas cepas de ratón.

En este sentido, se han realizado ensayos enfocados en caracterizar diferencias en la respuesta inmune innata, como en la respuesta adaptativa. Las diferencias observadas entre cepas de ratón infectado ocurren desde la primera instancia del reconocimiento de *T. cruzi* a través de PRRs (204), la participación diferencial de células del sistema inmune innato como los macrófagos, neutrófilos y células MDSCs (205,206), la producción de citoquinas (207) y la participación de las CDs (206), nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Asimismo, también se han descrito diferencias en el brazo adaptativo, observándose respuestas distintas en cuanto a la participación de linfocitos T CD4+, CD8+ y células B productoras de anticuerpos (208,209).

En términos generales, se ha descrito que los ratones BALB/c desarrollan preferencialmente una activación más compatible con un fenotipo Th2 (con mayor participación de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-10 y TGF- β), mientras que los ratones C57BL/6 desarrollan, en general, una respuesta más compatible con un perfil Th1, caracterizada por altos niveles de IFN- γ , IL-6, y TNF- α y bajos niveles de IL-4 (206,210).

En relación a la participación del brazo regulatorio del sistema inmune, y en línea con estos perfiles, se ha descrito que los ratones BALB/c logran reclutar un número significativamente mayor de MDSCs en el bazo y el hígado en comparación con los C57BL/6, que desarrollan una respuesta con menor participación de MDSCs y con una respuesta inflamatoria más fuerte. Las MDSCs de los ratones BALB/c mostraron una función supresora efectiva sobre la proliferación de esplenocitos, contribuyendo a una menor inflamación (118).

Variabilidad de *T. cruzi* y desarrollo de vacunas

En línea con lo expuesto anteriormente, se ha resaltado que el desarrollo de una vacuna contra *T. cruzi* debe ser capaz de resolver los desafíos causados por su complejo ciclo de vida, y por la diversidad genética del parásito (145). Sin embargo, un aspecto adicional que debe considerarse, se relaciona con la presencia de familias multigénicas, las cuales codifican antígenos de superficie altamente variables. Las tres familias multigénicas más grandes de *T. cruzi* codifican los antígenos de superficie trans-sialidasas (TSs), proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASPs) y mucinas (TcMUCs), y pueden afectar la respuesta inmune. El hecho de que estas familias hayan evolucionado de esta forma, sugiere que la variabilidad de las secuencias entre los antígenos de superficie del parásito representa un mecanismo más de evasión inmunitaria, lo cual agrega un plano extra de complejidad al diseño de candidatos vacunales, tal como ha sido remarcado (149).

El uso de herramientas bioinformáticas y datos de secuenciación de un número cada vez mayor de genomas de *T. cruzi* ha permitido comparar regiones de estos genes que también se mantienen constantes entre varios linajes (147). En este sentido, se ha descrito que las secuencias de TS indexadas en GenBank, correspondientes en muchos casos a las principales DTUs infectivas del ser humano, comparten más del 92% de identidad. Se observó también la existencia de epítomos de células T y B, que no solo están conservadas en la mayoría de dichas secuencias, sino que podrían ser reconocidas de forma cruzada por moléculas MHC-I y por diversos backgrounds genéticos murinos, lo que avala su uso para mejorar y facilitar el desarrollo de nuevas vacunas basadas en TS, sugiriendo un potencial inmunogénico y protector en humanos (211).

A pesar de que en las últimas décadas se han ensayado numerosos candidatos vacunales contra *T. cruzi*, revisados ampliamente en la bibliografía (135,145,147,212), y pese a que diferentes cepas de ratón pueden responder con componentes de la respuesta efectora y regulatoria de un modo muy diferente, son muy escasos los estudios que evaluaron si un candidato vacunal es capaz de conferir protección frente a cepas de distintas DTUs, en ratones de diferente base genética y mediante distintas vías de infección. En este sentido, la existencia de epítomos de células T y B conservados entre las principales DTUs infectivas para el ser humano sustenta la hipótesis de que una vacuna basada en la TS podría conferir protección cruzada en múltiples modelos murinos.

Objetivo del capítulo 2

Evaluar en diferentes modelos murinos la capacidad protectora contra *T. cruzi* de los compuestos 5FU y TSf-ISPA.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones hembras BALB/c y C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, las cuales fueron adquiridas en el Centro de Medicina Comparada de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza-Santa Fe) y mantenidas en nuestro bioterio del Laboratorio de Tecnología Inmunológica, bajo condiciones controladas de luz y temperatura, con disponibilidad de agua y comida *ad libitum*.

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 Estados Unidos de Norteamérica) y fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.

Formulación del candidato vacunal e inmunizaciones

Se empleó el fragmento proteico TSf purificado, formulado con ISPA, más las dosis de 5FU, de acuerdo a los protocolos descritos previamente en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

Los grupos experimentales consistieron en 5 a 8 ratones de los grupos: TSf-ISPA, 5FU TSf-ISPA (denominado Prevac en el capítulo 1), grupo doble-5FU TSf-ISPA, grupo control PBS, todos tratados de manera semejante a como se describió en el capítulo 1 y se observa en la Figura 29.

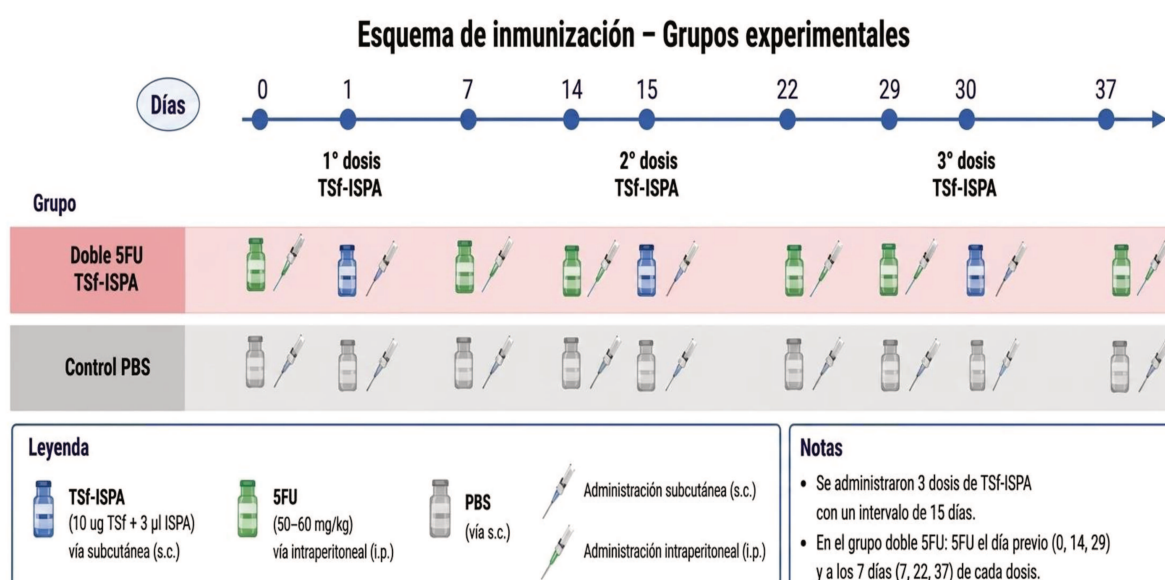


Figura 29: Línea de tiempo del esquema de vacunación, que muestra los diferentes protocolos de inmunización empleados en este capítulo de Tesis y descritos en el texto.

Evaluación de anticuerpos específicos mediante la técnica ELISA y de la respuesta celular: Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

Ambas respuestas fueron evaluadas según el procedimiento detallado en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

Infección con diferentes cepas de *T. cruzi*

Se emplearon parásitos tripomastigotes sanguíneos de diferentes unidades discretas de tipificación (DTUs): Tulahuén (Tc VI), Dm28c (TcI).

Para las infecciones con la cepa Tulahuén, se utilizaron tripomastigotes sanguíneos, cuya obtención ya ha sido descrita en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

En los experimentos que involucraron la cepa Dm28c, los tripomastigotes fueron suministrados por la Dra. Pamela Cribb del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), CCT-CONICET, Santa Fe, Argentina (202).

Los animales fueron infectados 15 días después de la última dosis de vacuna TSf-ISPA, a excepción de los experimentos de memoria inmunológica, en que la infección se realizó a los 45 y 60 días post-inm.

Las infecciones fueron llevadas a cabo por dos vías de inoculación:

- **Intraperitoneal (i.p.):**

- De la cepa Tulahuén se inocularon 2000 o 3000 tripomastigotes en los experimentos de comparación de protocolos de 5FU (Capítulo 2), y 1500 tripomastigotes para los experimentos de memoria inmunológica (45 y 60 días post-inmunización) en los ratones BALB/c. Se inocularon 1000 tripomastigotes en el modelo C57BL/6.
- De la cepa Dm28c se inocularon 20.000 tripomastigotes obtenidos de cultivo en ambas cepas de ratón BALB/c y C57BL/6

- **Intradérmica (i.d.):**

- Se inocularon 2500 tripomastigotes de la cepa Tulahuén en ambas cepas de ratón (BALB/c y C57BL/6). La inoculación intradérmica se realizó en la almohadilla plantar.

En todos los casos, las infecciones se realizaron 15 días después de la última dosis de inmunización, salvo los experimentos de memoria inmunológica.

Parasitemia

Después de la infección, se evaluó la parasitemia dependiendo de la cepa de *T. cruzi* utilizada, de acuerdo a como se realizó previamente (164,202). Este procedimiento se realizó conforme a lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 1. La parasitemia de los animales infectados con la cepa Tulahuén

se realizó a los 20 o 21 días post-infección. La parasitemia de los animales infectados con la cepa Dm28c se realizó a los 12 y 14 días post-infección (202).

Supervivencia

El porcentaje de supervivencia de cada grupo experimental fue registrado diariamente hasta el día 35 después de la infección.

Citometría de flujo de MDSCs post-infección

Los animales C57BL/6 infectados con la cepa Tulahuén fueron sacrificados a los 21 días post-infección para determinar los subtipos de esplenocitos MDSCs (M-MDSCs y PMN-MDSCs), en consonancia con estudios previos llevados a cabo en la cepa BALB/c (164). Para este fin se realizó un análisis mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos anti-CD11b, anti-Ly6G y anti-Ly6C, en combinaciones apropiadas de fluoróforos y siguiendo un protocolo similar al descrito en materiales y métodos del capítulo 1.

Estadística

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 8.0 Software (GraphPad), y con las mismas consideraciones descritas para el capítulo anterior. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $*p \leq 0,05$.

Resultados

Modelo de inmunización e infección basado en ratones C57BL/6

Debido a que la línea de trabajo se desarrolló íntegramente en ratones de la cepa BALB/c, para avanzar en la evaluación de la capacidad protectora de la formulación vacunal en otros modelos, en primer lugar, se realizó una caracterización de la respuesta inmune generada por la inmunización con el candidato vacunal doble 5FU TSf-ISPA en la cepa de ratones C57BL/6.

La Figura 30 A muestra que la inmunización de acuerdo al protocolo establecido logró generar elevados niveles de anticuerpos plasmáticos IgG anti-TSf, a los 7 días post-inm, de manera similar a lo observado durante la inmunización de ratones BALB/c. Asimismo, se confirmó también que la inmunización permitió obtener respuesta celular, medida a través de la respuesta DTH luego de la administración de TSf en la almohadilla plantar de los ratones, de forma semejante a la observada previamente en la cepa BALB/c (Figura 30 B).

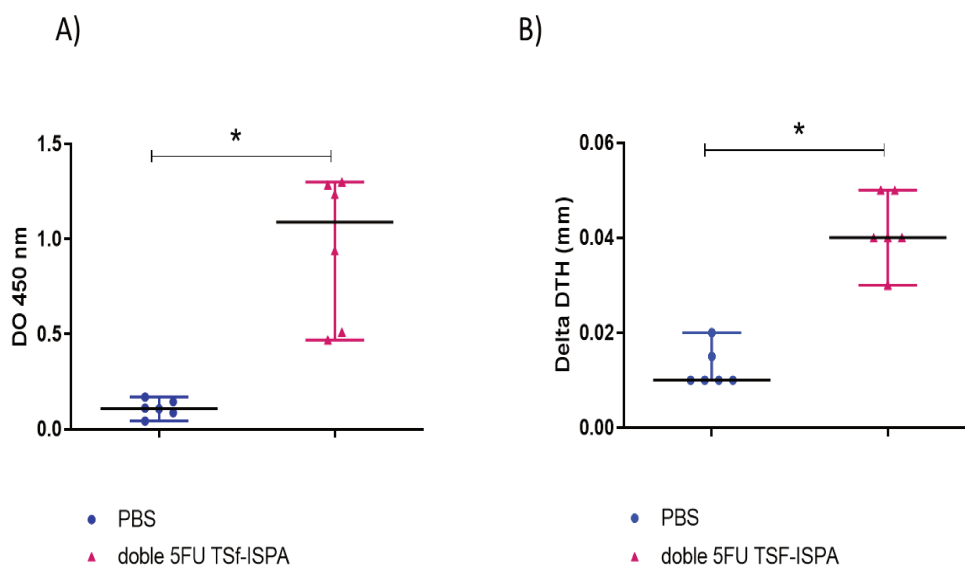


Figura 30: Parámetros inmunológicos de la respuesta inmune inducida por inmunización con doble 5FU TSf-ISPA en ratones C57BL/6. **A)** Los ratones C57BL/6 fueron inoculados con PBS o con doble 5FU TSf-ISPA, y las muestras de plasma fueron analizadas a los 7 días post-inm para detectar anticuerpos IgG específicos anti TSf mediante ELISA. * $p < 0,05$, prueba de Mann-Whitney. **B)** Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratones inmunizados: el grosor de la almohadilla plantar se midió antes y 48 h después de la inoculación de 5 ug de TSf, siete días después de completar el esquema de inmunización. Los resultados se expresan como “delta DTH (mm)”, que corresponde a la diferencia entre los valores obtenidos antes y después de la inoculación. * $p < 0,05$, prueba de Mann-Whitney. Los datos se expresan como mediana $\pm$ IC 95%. (n =6 ratones por grupo).

Infección en el modelo C57BL/6-Tulahuén

De acuerdo a estos resultados, se procedió a evaluar la capacidad protectora de la formulación vacunal ante un desafío inicial estándar de 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén (DTU VI). Con esta dosis de parásitos se observó una tendencia clara en donde los animales vacunados mostraron una menor parasitemia en relación al control ($p=0,0504$ Mann-Whitney, una cola), pero no fue suficiente para causar mortalidad en ninguno de los dos grupos de animales infectados.

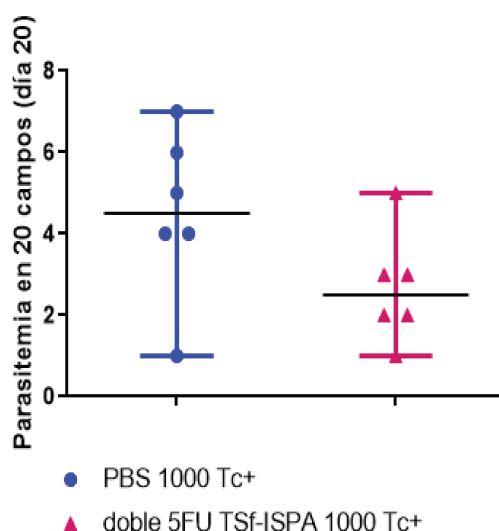


Figura 31: Parasitemia de ratones C57BL/6 inmunizados con PBS o con doble 5FU TSf-ISPA, que fueron infectados (Tc^+) con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* (DTU VI), 15 días después de la última dosis de inmunización. La parasitemia se muestra al día 20 post-infección (los datos se expresan como mediana $\pm$ IC 95%. ($n = 6$ por grupo)).

El ensayo fue utilizado para caracterizar la respuesta de células MDSCs de ambos subtipos, CD11b+Ly6G+Ly6C+/*low* (MDSCs granulocíticas PMN-MDSCs) y CD11b+Ly6G-Ly6C+ (MDSCs monocíticas, M-MDSCs), al día 21 post-infección. En línea con lo observado en el modelo de infección de ratones BALB/c, los animales vacunados presentaron una disminución significativa del número absoluto de ambas poblaciones PMN-MDSCs, y M-MDSCs, lo cual hemos reportado que correlaciona con mayor respuesta efectora y mayor capacidad protectora en los animales vacunados (164,168).

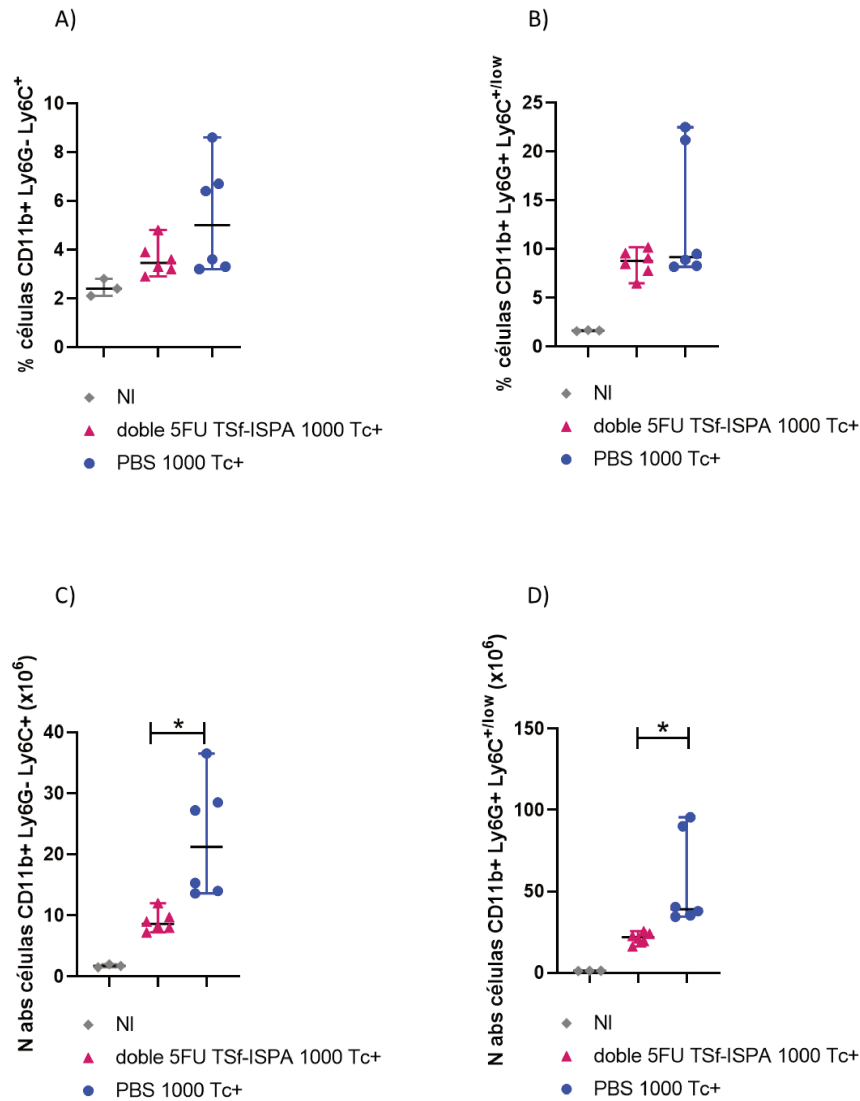


Figura 32: Alteraciones en las PMN-MDSCs y M-MDSCs esplénicas al día 21 post-infección con *T. cruzi* en ratones C57BL/6. Los ratones C57BL/6 inmunizados con PBS o con doble 5FU TSf-ISPA, fueron infectados (Tc⁺) con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* (DTU VI), 15 días después de la última dosis de inmunización. La expresión de CD11b, Ly6G y Ly6C se analizó por citometría de flujo en ratones no inmunizados y no infectados (NI), en animales tratados con PBS, y en animales inmunizados con doble 5FU TSf-ISPA. **A)** Porcentaje de células CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺ (M-MDSCs), **B)** porcentaje de células CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{+/low} (PMN-MDSCs). **C)** Número absoluto de células CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺ (M-MDSCs) (x10⁶), **D)** Número absoluto de células CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{+/low} (PMN-MDSCs) (x10⁶), *p < 0,05 Test de Mann-Whitney entre los grupos indicados. Los datos se expresan como medianas ± IC 95% (n = 3–6 por grupo).

Modelos de infección basados en *T. cruzi* de DTU I

A continuación, se procedió a evaluar la capacidad protectora en ambas cepas (BALB/c y C57BL/6) de la formulación vacunal contra la cepa Dm28c de *T. cruzi* perteneciente a la DTU I.

La Figura 33 A y B muestran que tanto al día 12 como 14 post-infección los animales BALB/c vacunados presentan menor parasitemia que los animales control, llegando esta diferencia a ser significativa al día 14 post-inm.

En línea con dichos resultados, los animales C57BL/6 vacunados e infectados mostraron una tendencia a disminuir los valores de parasitemia en ambos días post-infección (12 y 14), en relación a los animales control infectados, aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística (Figura 33 A y B).

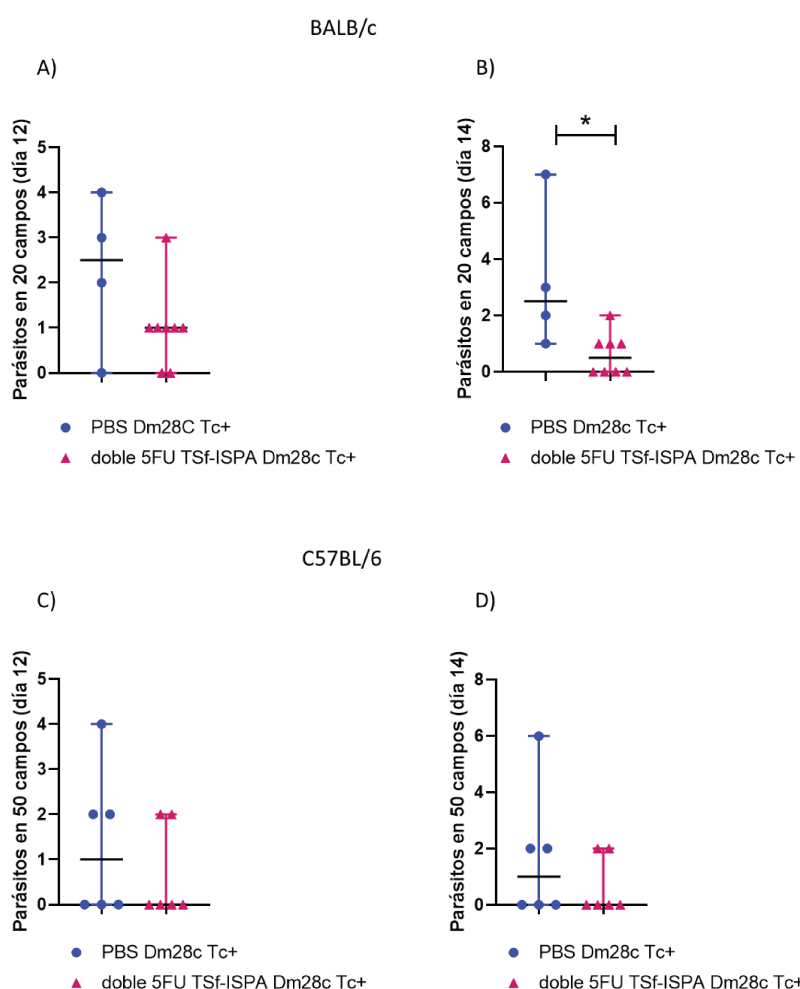


Figura 33: Cambios en la parasitemia a los días 12 y 14 post-infección con la cepa Dm28c de *T. cruzi* en ratones BALB/c y C57BL/6. (A, B) Tras la infección con la cepa Dm28c de *T. cruzi* en ratones BALB/c tratados con PBS o ratones inmunizados con doble 5FU TSf-ISPA, se midió la parasitemia a los días 12 y 14 post-infección; *p < 0,05, test de Mann-Whitney (los datos se expresan como medianas ± IC95%, n=4-8 por grupo). (C, D) Tras la infección con la cepa Dm28c

de *T. cruzi* en ratones C57BL/6 tratados con PBS o ratones inmunizados con doble 5FU TSf-ISPA, se midió la parasitemia a los días 12 y 14 post-infección (los datos se expresan como mediana $\pm$ IC95% (n = 6 por grupo)).

Modelo basado en infección intradérmica

Luego, en ambas cepas de ratón se evaluó la capacidad protectora de la formulación doble 5FU TSf-ISPA, empleando la vía intradérmica de infección, empleando 2500 parásitos de la cepa Tulahuén.

En la cepa BALB/c se observó una tendencia a disminuir la parasitemia y la mortalidad, siendo de 80% la supervivencia en los animales vacunados e infectados y de 40% en los animales control infectados. En la cepa C57BL/6, la dosis no fue suficiente para afectar la supervivencia de los ratones, pero se observó también una tendencia a disminuir la parasitemia en los animales vacunados e infectados en comparación de los animales control.

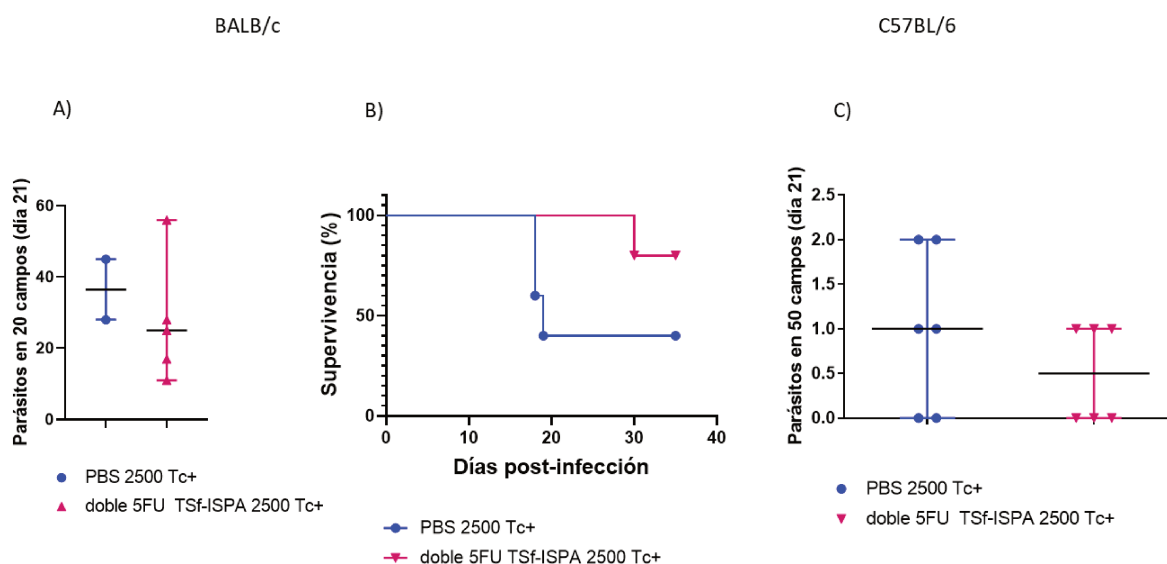


Figura 34: Parasitemia y supervivencia de ratones BALB/c tratados con doble 5FU TSf-ISPA e infectados intradérmicamente (i.d) con parásitos Tulahuén *T. cruzi*. Los ratones fueron tratados con PBS o doble 5FU TSf-ISPA e infectados 2500 tripomastigotes Tulahuén quince días después de la última inmunización. **A)** Parasitemia de ratones BALB/c inmunizados con PBS y doble 5FU TSf-ISPA el día 21 después de la infección (datos expresados como mediana $\pm$ IC95%). **B)** La supervivencia se muestra al día 35 después de la infección en ratones BALB/c, (n=5). **C)** Parasitemia de ratones C57BL/6 inmunizados con PBS y doble 5FU TSf-ISPA el día 21 después de la infección. (Datos expresados como mediana $\pm$ IC95% (n = 6 animales por grupo)).

Análisis de la capacidad protectora a largo plazo de la formulación doble 5FU TSf-ISPA

Por último, en el modelo BALB/c–Tulahuén se realizaron dos experimentos destinados a evaluar la protección a largo plazo, como indicador de memoria inmunológica. Para ello, los animales fueron desafiados con una dosis letal de 1500 parásitos por vía i.p. a los 45 y 60 días posteriores a la última dosis de inmunización, intervalos en los que se espera que la respuesta inmune causada por la vacuna haya disminuido y predomine la memoria inmunológica.

Como se observa en la Figura 35 A, los animales desafiados a los 45 días post-inmunización mostraron diferencias significativas en parasitemia y supervivencia respecto al grupo control, aportando evidencia de que el protocolo de doble 5FU TSf-ISPA es capaz de generar memoria inmunológica con capacidad protectora. Por otra parte, cuando el desafío se realizó a los 60 días post-inmunización, se observó una reducción de la capacidad protectora, sugiriendo que ciertos componentes de la memoria inmunológica decaen con el tiempo (Figura 35). Estos resultados abren la posibilidad de explorar estrategias adicionales, como dosis de refuerzo para extender la eficacia vacunal.

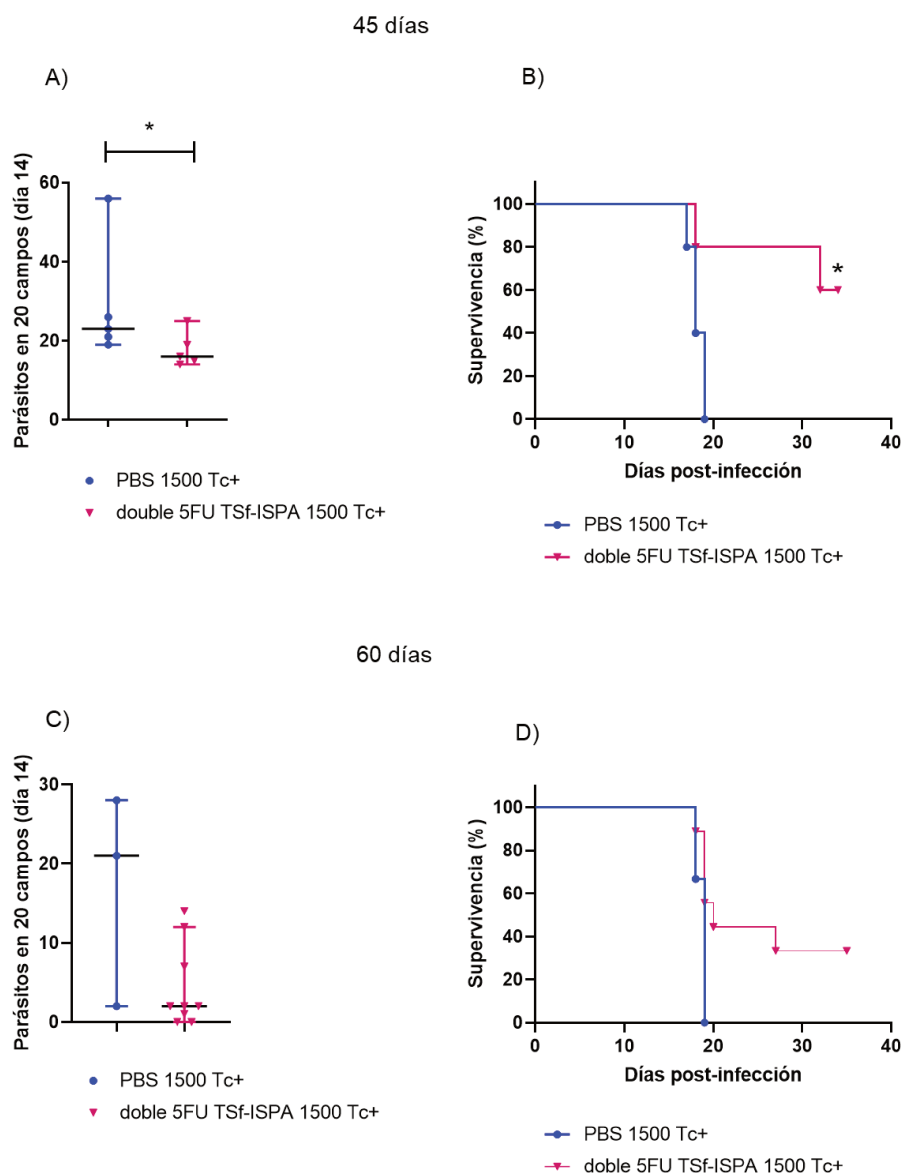


Figura 35: Parasitemia y supervivencia de ratones BALB/c tratados con doble 5FU TSf-ISPA e infectados i.p. con parásitos Tulahuén *T. cruzi*. **A–B)** Ratones desafiados a los 45 días posteriores a la última inmunización: **(A)** parasitemia determinada a los 14 días post-infección y **(B)** supervivencia hasta los 35 días post-infección (n=5). **C–D)** Ratones desafiados a los 60 días post-inm: **(C)** parasitemia a los 14 días post-infección y **(D)** supervivencia (n=3-9). Los datos de parasitemia se expresan como mediana $\pm$ IC 95% (n = 3–9). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante test de Mann-Whitney para las parasitemias y logrank-test para las supervivencias, considerándose significativas cuando $*p < 0,05$.

Discusión

La diversidad genética del parásito es uno de los factores que muy posiblemente han dificultado el desarrollo de una vacuna efectiva contra *T. cruzi* (145). Sin embargo, a pesar de que este tipo de evaluación resultaría de gran importancia para respaldar a un candidato vacunal, hasta el momento, son muy limitados los estudios que han realizado este abordaje, analizando la capacidad protectora de las formulaciones contra distintas DTUs del parásito (213,214). Asimismo, debido a que la base genética del huésped, así como la vía de infección, pueden influir en el tipo de respuesta inmune generada, resulta también de interés evaluar si los candidatos vacunales conservan capacidad protectora al ser empleados en condiciones inmunológicas diferentes, utilizando distintos modelos preclínicos que permitan obtener resultados más robustos.

En el caso de este trabajo de Tesis, una vez seleccionada la mejor formulación, se procedió a iniciar un análisis orientado a evaluar el desempeño del candidato vacunal doble 5FU TSf-ISPA en condiciones experimentales muy diferentes a las empleadas en la evaluación inicial. Luego de confirmar que la formulación generaba una respuesta inmune humoral y celular significativa también en el *background* genético de los ratones C57BL/6, se realizó un desafío de infección intraperitoneal con 1000 parásitos de la cepa Tulahuén. La dosis empleada no fue suficiente para causar mortalidad ni en el grupo vacunado ni en el grupo control, pero se observó una tendencia a reducir la parasitemia en el grupo vacunado en comparación del control. En línea con este resultado se observó que los animales vacunados tuvieron un menor incremento en el número absoluto de células MDSCs de ambos subtipos, M-MDSCs y PMN-MDSCs en el bazo, al día 21 post-infección, de manera similar a lo observado en ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén (164). Un menor aumento de esplenocitos MDSCs post-infección ha correlacionado con mejor respuesta efectora y capacidad protectora en el modelo BALB/c/ Tulahuén (164), respaldando, en conjunto, que la formulación vacunal también genera capacidad protectora en el modelo C57BL6/Tulahuén. Dado que recientemente se ha reportado que dosis de 2000 parásitos Tulahuén inoculados por vía intraperitoneal generan mortalidad en modelo murino de ratones macho y hembras, permitiendo analizar la capacidad protectora de un candidato vacunal basado en la inmunización con células dendríticas derivadas de médula ósea, pre-activadas *in vitro* hacia un epítipo inmunodominante (TsKb20) de la TS (133), en el futuro se realizarán desafíos con dosis mayores de parásitos con el fin de aportar evidencia que confirme la capacidad protectora de la formulación doble 5FU TSf-ISPA.

La diferencia de susceptibilidad contra el *T. cruzi* entre las cepas de BALB/c y C57BL6 ha sido asociada, al menos en parte, con diferente producción de citoquinas (207,215), e incluso se ha descrito que la respuesta inmune podría depender en mayor medida de la base genética del huésped que de la cepa de parásito (215). Al respecto, se ha descrito que la modulación de la respuesta de citoquinas con α -tocoferol puede remodelar la respuesta inflamatoria/regulatoria en los ratones C57BL/6, permitiendo un mejor control de la infección (216). Sin embargo, cabe destacar también que se ha observado dimorfismo sexual y variabilidad en la respuesta inmune generada, así como en la protección, al utilizarse ratones macho y hembras infectados con

Tulahuén, tanto en la cepa BALB/c (217) como en la C57BL/6 (133), sugiriendo que este es otro aspecto relevante a considerar en la evaluación y el diseño racional de candidatos vacunales.

Además de la DTU VI, la DTU I es otro de los linajes comúnmente encontrados en personas infectadas y que por lo tanto reviste importancia para el desarrollo de una vacuna útil que genere protección cruzada contra diferentes DTUs. Este linaje no suele causar infección letal en modelos murinos, y genera baja parasitemia (5,12). Estudios recientes de la Dra. Pamela Cribb, han mostrado que la cepa Dm28c si bien no es letal, genera parasitemia baja pero medible (202), lo cual resulta valioso como un parámetro que puede ser medido de manera práctica. De acuerdo a esto, se estableció una colaboración para implementar el modelo de infección con la cepa Dm28c a partir de parásitos obtenidos de cultivo, cedidos gentilmente por la Dra. Cribb, y se evaluó la capacidad protectora de la formulación doble 5FU TSf-ISPA tanto en el *background* de ratones BALB/c como C57BL/6, ante un desafío de 20000 parásitos inoculados por vía i.p.

En la misma línea con los resultados obtenidos en los modelos BALB/c/Tulahuén y C57BL/6/Tulahuén, se observó una tendencia a generar capacidad protectora por el candidato vacunal en los días post-infección medidos (12 y 14), que incluso alcanzó significancia estadística a los 14 días post-infección en el modelo de los ratones BALB/c/Dm28c. Para nuestro conocimiento este es el único estudio hasta el momento que ha evaluado protección vacunal ante la cepa Dm28c en modelos preclínicos, lo cual resulta de interés porque complementa los resultados obtenidos con la DTU VI, aportando evidencia no solo *in silico*, sino también *in vivo*, de que efectivamente el uso de un candidato vacunal basado en una proteína que se conserva de manera importante entre distintas DTUs como la TS, puede ser útil para el diseño racional de vacunas, considerando tanto la diversidad genética del parásito como sus mecanismos de evasión (211,218).

Si bien el modelo de infección i.p. resulta muy útil para obtener información y ha sido ampliamente estudiado en distintos candidatos vacunales, la vía de inmunización intradérmica se encuentra más relacionada con la vía de infección natural del parásito, por lo que se llevaron a cabo estudios de protección en ambas cepas de ratón, empleando parásitos del linaje DTU VI que genera alteraciones más marcadas. Una vez más, los ratones BALB/c inmunizados e infectados mostraron una tendencia a desarrollar protección contra *T. cruzi*, tanto en términos de reducción de la parasitemia como de la supervivencia, ya que alcanzaron un 80% de supervivencia en comparación del 40% del grupo control. Asimismo, si bien la supervivencia de los ratones C57BL/6 no se vio afectada en ningún grupo, ya que la vía de infección es incluso menos virulenta que la vía i.p., también se observó una tendencia a una disminución de la parasitemia en el grupo vacunado en comparación del grupo control, sugiriendo que, en ambos casos, el candidato vacunal confiere capacidad protectora a los animales inmunizados, en línea con el conjunto de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de Tesis.

Además de la diversidad genética relacionada con las DTUs, la existencia de familias de proteínas de superficie con alta variabilidad, también ha sido remarcado como una posible estrategia de evasión del sistema inmune empleada por el parásito y que podría dificultar el desarrollo de un candidato vacunal (5,49). En este sentido, el uso de un inmunógeno basado en la proteína TS podría ser de utilidad, ya que ha sido descrito que,

a pesar de su variabilidad, esta proteína presenta elevada identidad entre diferentes DTUs, y contiene epítomos que pueden ser presentados por moléculas HLA humanas y también por moléculas de histocompatibilidad murinas (211). Incluso, en estudios comparativos, se ha descrito que formulaciones basadas en la TS han mostrado mayor capacidad protectora en comparación de otras proteínas utilizadas como antígenos (163).

Por último, en el modelo que permite observar cambios de manera más notoria BALB/c- Tulahuén se evaluó la capacidad de la formulación doble 5FU TSf-ISPA de generar memoria inmunológica y protección de largo plazo, incluso ante dosis letales de parásito. Los resultados mostraron que luego de un mes y medio posterior a la última inmunización, los animales todavía mantienen una significativa protección ante el desafío con *T. cruzi*, respaldando la generación de memoria inmunológica por parte de la formulación vacunal. A más largo plazo, comenzó a observarse una disminución de la capacidad protectora de la formulación, abriendo la posibilidad a estudios que permitan seguir optimizando el candidato vacunal con el fin de lograr incluso memoria a más largo plazo.

En la literatura son limitados los estudios que han analizado la memoria de largo plazo mediante desafíos con el parásito. Por ejemplo, Rigato y colaboradores (219) realizaron una estrategia de vacunación heteróloga tipo *prime-boost* en modelos murinos, utilizando ratones A/Sn inmunizados con un plásmido de ADN codificante para ASP-2 seguido de un refuerzo con un adenovirus recombinante (AdHu5) expresando el mismo antígeno. Luego de un desafío a más de 90 días post-inm con la cepa Y de *T. cruzi*, observaron una reducción significativa de la parasitemia y un aumento en la supervivencia de 90% en los grupos inmunizados en relación al control, apoyando la capacidad de conferir protección de largo plazo bajo las condiciones experimentales empleadas (219).

Más recientemente, Castro y colaboradores (213), continuando en esta línea de investigación, estudiaron la capacidad protectora de un candidato vacunal basado también en ASP-2 pero formando una quimera con la TS. Luego del desafío a los 30 y 90 días post-inm, empleando dosis subletales de la cepa Y de *T. cruzi*, reportaron que la vacunación causó un aumento de la supervivencia de un 40% y 60% en los animales vacunados versus los animales control, hasta los 25 días post-infección (213).

Por otra parte, un estudio del año 2011 basado en la inmunización con el gen de la proteína TS, coadministrada con un plásmido que codifica IL-15 en ratones BALB/c, mostró protección frente al desafío subcutáneo con una dosis letal de tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén. La protección fue evaluada incluyendo el análisis de supervivencia, y se reportó que la coadministración de IL-15 mejoró la persistencia de la respuesta protectora, con efectos detectables hasta 6 meses post-vacunación (220). Este estudio mostró una mejora de la supervivencia de hasta el 100% con respecto al control, siendo uno de los más destacados en este aspecto en la bibliografía, pero no se han encontrado estudios que hayan continuado posteriormente con esta línea de investigación (220).

En una aproximación diferente, Gupta, S, 2015, inmunizaron ratones C57BL/6 con protocolos de prime con ADN codificante para los antígenos TcG2 y TcG4, seguido de un *boost* con las proteínas recombinantes correspondientes formuladas con saponina, evaluando la protección a los 120 y 180 días post-vacunación, pero al infectar con la cepa SilvioX10, que no genera mortalidad, los cambios observados de protección estuvieron relacionados con carga parasitaria en tejidos y no con la supervivencia (221).

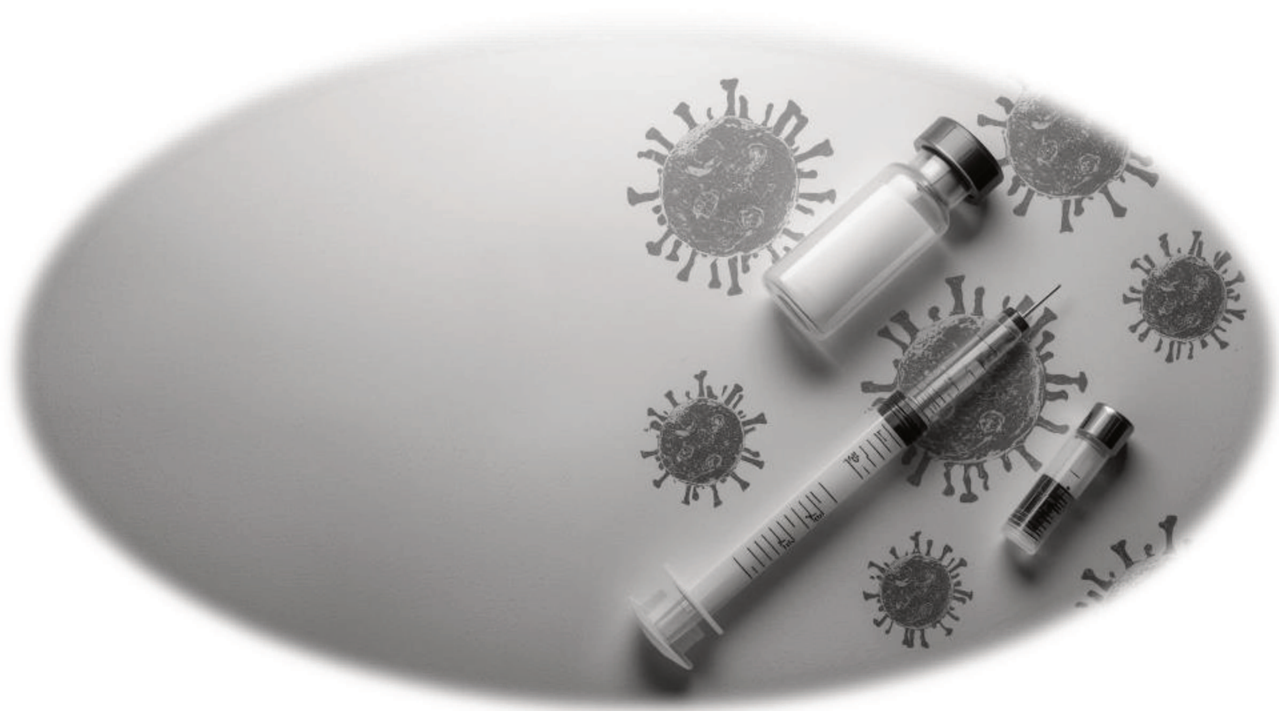
En su conjunto, los resultados respaldan que es posible generar inmunidad de largo plazo contra *T. cruzi*, mediante distintas aproximaciones, lo cual es promisorio para continuar profundizando en el desarrollo de candidatos vacunales que puedan ser exitosos para avanzar a estadios clínicos de evaluación.

Conclusiones Parciales

- La formulación doble 5FU TSf-ISPA generó respuestas inmunes humorales y celulares en ratones C57BL/6, aportando evidencia de que la inmunogenicidad del candidato vacunal se conserva en distintos *backgrounds* genéticos.
- En el modelo C57BL/6/Tulahuén, la vacunación no permitió evaluar supervivencia, pero mostró una tendencia a reducir la parasitemia y a limitar la expansión de células MDSCs post-infección, en concordancia con asociaciones previamente descriptas entre estos parámetros y la capacidad protectora.
- La formulación doble 5FU TSf-ISPA disminuyó la parasitemia luego del desafío con la cepa Dm28c (DTU I) en ratones BALB/c, lo que apoya la capacidad de generar protección cruzada de la formulación seleccionada.
- La formulación doble 5FU TSf-ISPA indujo protección frente al desafío con dosis letales de *T. cruzi* a mediano plazo (≈ 45 días post-inmunización), observándose una disminución de dicha capacidad a tiempos más prolongados.
- En conjunto, los resultados indican que la formulación vacunal doble 5FU TSf-ISPA presenta capacidad de inducir respuestas inmunes y efectos protectivos en distintos modelos preclínicos, con magnitud variable según las condiciones experimentales evaluadas.

Capítulo 3

“Análisis de los mecanismos inmunológicos para la potenciación del candidato vacunal TSf-ISPA al usar 5FU en la etapa de inmunización”



Introducción

Caracterización de la respuesta inmunológica en la etapa de inmunización

La caracterización de la respuesta inmune inducida por cada vacuna resulta de vital importancia para identificar qué perfil de respuesta y qué componentes celulares y humorales son estimulados por el antígeno y adyuvante empleados para conferir protección contra un patógeno puntual. Este tipo de análisis es clave para asistir en el diseño racional, en la optimización de nuevos candidatos vacunales y para la identificación de potenciales correlatos de protección inmunológica (222,223).

Considerando que la generación de anticuerpos específicos es el principal biomarcador empleado en correlatos de protección (223), esta variable es uno de los principales componentes medidos durante los protocolos de inmunización de diversos candidatos vacunales así como en el estudio de vacunas contra *T. cruzi* (93,135).

Dado que la evidencia acumulada sugiere fuertemente que una vacuna contra *T. cruzi* no solo debe estar basada en la producción de anticuerpos efectivos sino también en la inducción de la respuesta celular, la respuesta DTH es otra de las variables habitualmente medidas para caracterizar la capacidad de los candidatos vacunales de estimular esta respuesta (164,193).

Además de estas dos variables, las alteraciones de las CDs en cuanto a la expresión de moléculas coestimuladoras, y las poblaciones T CD4+ y T CD8+, en relación a su estado de perfil de activación, especificidad y memoria, son también frecuentemente analizadas, ya que permiten evaluar en mayor profundidad la capacidad de las vacunas para estimular el brazo adaptativo, en relación al antígeno específico empleado, como la TS (Figura 36).

Por otro lado, la medición de citoquinas asociadas a los diferentes perfiles inmunológicos puede aportar evidencia que respalde las observaciones sobre la generación de uno u otro tipo de respuesta inmunológica, siendo medidas principalmente citoquinas como IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10, asociadas fundamentalmente con perfiles Th1, Th2, Th17 o Treg (224–227).

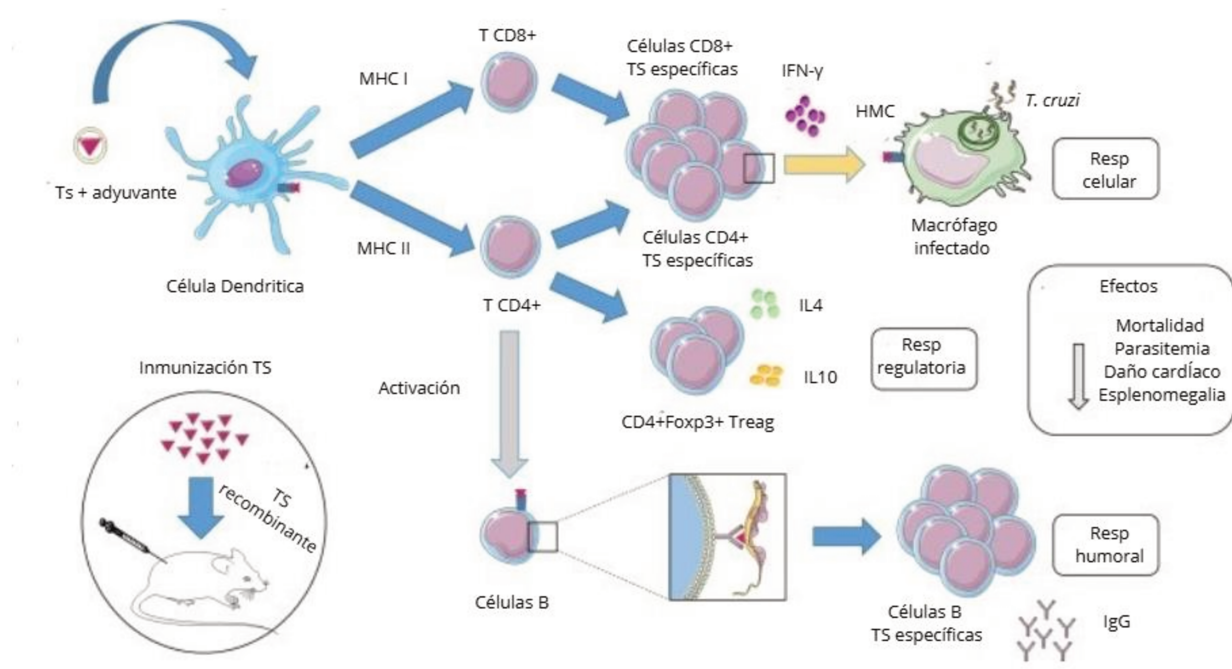


Figura 36: Esquema de la respuesta inmune inducida por las vacunas de TS recombinante. La inmunización activa vías clave de activación de la respuesta humoral (producción de anticuerpos IgG por células B), y la respuesta celular efectora (linfocitos T CD4+ y T CD8+ para eliminar macrófagos infectados). Además, las vacunas también pueden afectar la respuesta supresora/regulatoria, como se evalúa en esta tesis en cuanto a la participación de las células MDSCs, y también potencialmente por el control que pueden ejercer las células T Foxp3+. En el conjunto, estos mecanismos tienen como finalidad reducir la parasitemia, el daño tisular y la mortalidad por *T. cruzi*. Figura modificada de (228).

Análisis de poblaciones celulares en sangre periférica entera

Si bien para estudios en seres humanos es metodológicamente simple analizar las poblaciones celulares a partir de muestras de sangre periférica, en el caso de estudios preclínicos en modelos murinos resulta un desafío la obtención de suficiente cantidad de sangre para llevar a cabo el análisis inmunológico correspondiente, de una forma que no implique el sacrificio del animal, minimizando el estrés y preservando la estabilidad hemodinámica. En este contexto, la punción de la vena facial destaca sobre otros métodos (como la punción retroorbital o la amputación de la punta de la cola) por ser un procedimiento mínimamente traumático y de rápida ejecución (186).

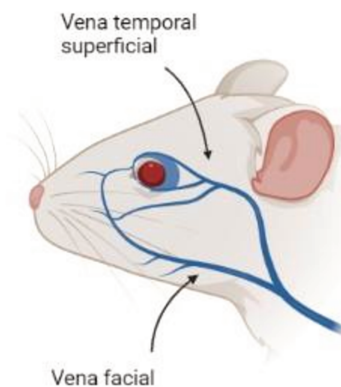


Figura 37: Representación esquemática del sitio de punción en la vena facial. La ilustración detalla la ubicación anatómica para la recolección de sangre periférica en el modelo murino. Figura modificada de (186).

Esta metodología permite recolectar volúmenes de sangre reducidos pero suficientes para el análisis, sin comprometer la viabilidad del animal. La preservación del estado fisiológico es fundamental en muchos casos, como durante estudios de vacunas, ya que permite la realización de análisis correlativos posteriores, tales como la medición de parámetros inflamatorios sistémicos o el seguimiento de las curvas de supervivencia en el marco de la patología en estudio (149,193).

Por otro lado, una vez obtenida la muestra, una aproximación convencional implica el cultivo y la estimulación *in vitro* con *pools* de péptidos para efectuar la citometría de flujo, permitiendo la detección de citoquinas intracelulares o marcadores de activación (229,230). Sin embargo, este enfoque conlleva un grado de manipulación *ex vivo* que puede distorsionar el perfil inmunitario original, alejándose de una medición directa del estado celular. Además, en el caso de modelos murinos, resulta metodológicamente complicado obtener una cantidad suficiente de células mononucleares de sangre periférica para caracterizar respuestas frente a antígenos sin comprometer la salud del animal. Debido a esto, la mayoría de los estudios optan por el uso de esplenocitos tras el sacrificio, lo que permite alcanzar umbrales de eventos necesarios para un análisis robusto de subpoblaciones de células T CD4+ y T CD8+, pero impide realizar un seguimiento longitudinal de cada individuo (229,231).

En ese sentido, la optimización de un protocolo de monitorización de poblaciones inmunes a partir de un mínimo volumen de sangre periférica constituiría una herramienta diagnóstica y experimental de alto valor. Asimismo, además de la medición de alteraciones en el brazo inmune efector, como células T CD4+ y CD8+, dado que las células CD11b+Gr-1+ pueden expandirse durante la inmunización (96), la evaluación de sus alteraciones en sangre periférica representa un paso preliminar valioso antes de proceder a la caracterización de su capacidad supresora.

Objetivo del capítulo 3

Analizar los mecanismos inmunológicos que permiten potenciar el candidato vacunal TSf-ISPA al usar 5FU en la etapa de inmunización.

Materiales y métodos

Caracterización de la respuesta inmunológica en el bazo y ganglios inguinales de los animales inmunizados con el candidato vacunal seleccionado en el objetivo 1

A los 7 días post-inmunización, momento en el que se han observado las mayores diferencias en nuestro modelo, los animales fueron sacrificados para la preparación de suspensiones celulares de bazo y ganglios linfáticos inguinales. Las suspensiones de bazo se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1, realizando el recuento en cámara de Neubauer mediante el uso inicial de solución de Türk para determinar los números absolutos y, posteriormente, tras la lisis de glóbulos rojos con cloruro de amonio, un nuevo recuento utilizando azul de tripán.

Los ganglios inguinales fueron extraídos y disgregados mecánicamente con tijera sobre malla metálica, empleando la misma solución utilizada para los bazos. Las células obtenidas fueron centrifugadas a $300 \times g$ y resuspendidas en PBS suplementado con 3% de SFB, previo al recuento con azul de tripán.

Tras el recuento celular, las suspensiones de bazo y ganglio linfático fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 α , anti-CD44, anti-CD11c, anti-CD11b, anti-Gr-1, anti-MHCII y anti-CD80, en paneles de cuatro fluoróforos, siguiendo el protocolo de marcación, adquisición y análisis descrito en el capítulo 1.

Por otro lado, para evaluar la producción de IFN- γ , IL-17 e IL-10 se realizaron cultivos *in vitro* de $0,5 \times 10^6$ esplenocitos/mL estimulados con TSf (5ug/ml) en placas de 48 pocillos (Nunc™, Thermo Fisher Scientific) y luego se adoptaron dos estrategias, la medición intracitoplasmática de las citoquinas en linfocitos T CD4+ y T CD8+, y la medición de las mismas en sobrenadantes de cultivo. Para la medición intracitoplasmática se utilizó kit de marcación comercial (Cytofix/Cytoperm™, BD Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, luego de la marca de superficie con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 (193). Para la medición en sobrenadante de cultivo de IFN- γ e IL-10 se utilizaron kit de ELISA (BD OptEIA™, BD Biosciences), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (193).

Caracterización de la respuesta inmunológica en sangre periférica de los animales inmunizados con el candidato vacunal seleccionado en el objetivo 1.

Las muestras se obtuvieron por punción en la vena facial utilizando una lanceta estéril, y se recolectaron 2-3 gotas de sangre en tubos Eppendorf conteniendo 10 μ L de heparina sódica. Se transfirieron 30-50 microlitros de sangre periférica a un tubo Falcon de 15 mL y se lisaron con 2 mL de agua destilada estéril durante 30 segundos. Luego, el volumen se ajustó a 8 mL con solución fisiológica salina (PSS) conteniendo 10% de suero

fetal bovino (SFB, Internegocios S.A.). Luego de una centrifugación durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 100 μ L de PSS con 3% de SFB y 0,1% de azida sódica.

Entre 0,75 y 1×10^5 células se incubaron con 0,1 μ g de anticuerpo bloqueante anti-Fc γ RIII/II (Biolegends) en 100 μ L durante 10 minutos a 4 °C en la oscuridad. Luego, las células se marcaron con 0,2 μ g de anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b y anti-Gr-1 (BD-Biosciences), en combinaciones apropiadas de fluorocromos. Luego de los lavados, las muestras fueron adquiridas y analizadas como se describió en el objetivo 1.

Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para la comparación entre grupos se emplearon las pruebas no paramétricas de Mann–Whitney (para la comparación de dos grupos independientes) o Kruskal–Wallis (para comparar más de dos grupos). El grupo PBS se incluyó únicamente como referencia de los valores basales. En el uso de Mann–Whitney, se utilizaron pruebas de una cola cuando existía evidencia previa que respaldara la direccionalidad de la hipótesis, y de dos colas en ausencia de dicha información (191). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $*p < 0,05$.

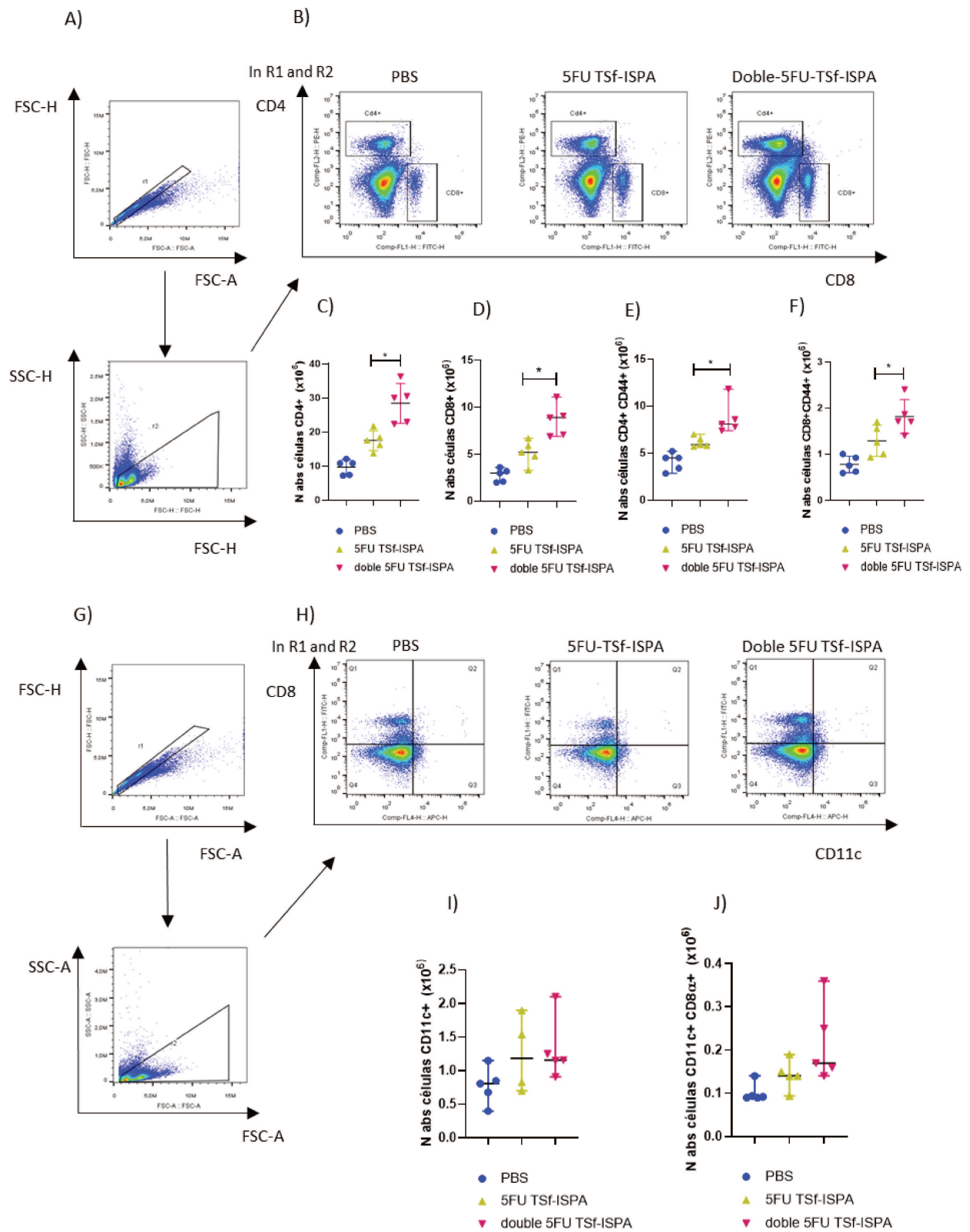
Resultados

Alteraciones en poblaciones inmunes del bazo luego de la inmunización

Dado que se obtuvo mayor capacidad protectora con la formulación basada en 2 dosis de 5FU para depletar MDSCs, se procedió a evaluar alteraciones inmunológicas de la respuesta efectora que pudieran estar involucradas en la mayor protección observada al disminuir las células MDSCs. Considerando que el porcentaje se encuentra más afectado por los cambios en los porcentajes de dichas células, las cuales varían de manera muy notable, se priorizó el análisis y comparación del número absoluto de células CD4+, CD4+CD44+, CD8+, CD8+CD44+, CD11c+ y CD11c+CD8α+ de los grupos experimentales.

La Figura 38 muestra que, a los 7 días post-inm, el grupo que recibió el protocolo doble 5FU TSf-ISPA presentó aumentos significativos en el número absoluto de esplenocitos CD4+, CD8+, CD4+CD44+ y CD8+CD44+, (Figuras 38 C, D, E y F respectivamente), comparado al grupo que recibió una sola dosis de 5FU, sugiriendo que dos dosis de 5FU permiten generar una mayor respuesta efectora con componentes de activación y memoria. Además, se observó una tendencia a generar un aumento en el número absoluto de células dendríticas CD11c+CD8α+ (Figura 38 I y J), sugiriendo que la administración de dos dosis de 5FU podría favorecer la expansión de CDs convencionales tipo I, población asociada a la estimulación de presentación cruzada de antígenos vía MHC-I (232,233), todo lo cual respalda los mejores resultados de protección observados al comparar la supervivencia de los ratones inmunizados con doble 5FU TSf-ISPA versus los animales que recibieron una sola dosis de 5FU.

Asimismo, luego de cultivo *in vitro* de los esplenocitos de los diferentes grupos experimentales, se observó mayor porcentaje o tendencia en dicha dirección en cuanto a la presencia de células CD4+IFN-γ+ (Figura 38 K) y CD8+IFN-γ+ (Figura 38 L) en los cultivos provenientes de esplenocitos inmunizados con doble 5FU TSf-ISPA versus los animales tratados con 5FU TSf-ISPA. También en el sentido de esta observación, se detectaron mayores niveles de IFN-γ en sobrenadante de cultivo de los animales tratados con el protocolo doble 5FU TSf-ISPA (Figura 38 M), todo lo cual aporta evidencia de que la depleción más completa de las células CD11b+Gr-1+ permite generar una mayor respuesta inmune efectora, compatible con un perfil Th1. No se detectaron cambios en relación al control en cuanto a la producción de IL-10 a nivel intracitoplasmático ni en sobrenadante de cultivo, de IL-10 o IL-17, sin encontrarse diferencias significativas.



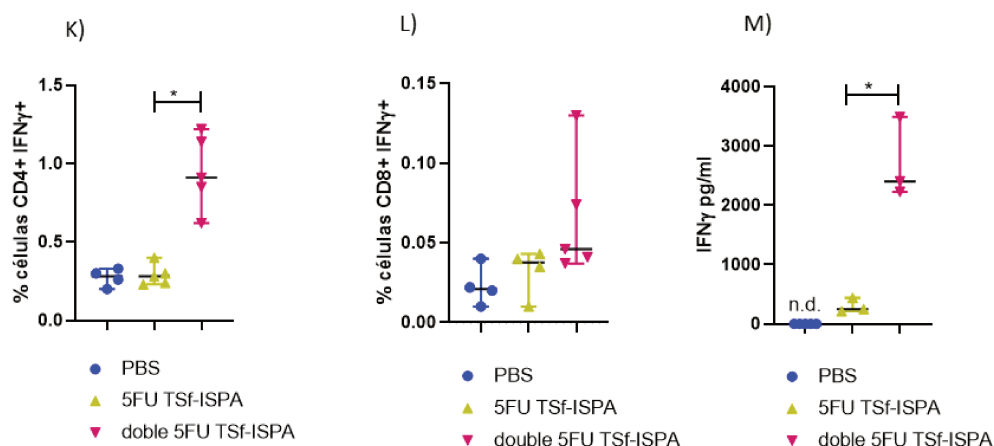


Figura 38: Cambios en las poblaciones celulares de los bazo a los 7 días de la inmunización. Los ratones fueron tratados con PBS, 5FU-TSf-ISPA o doble 5FU TSf-ISPA, y fueron sacrificados 7 días después de la última dosis de inmunización para obtener suspensiones de esplenocitos. **A, B)** Gráficos de puntos representativos que muestran la estrategia utilizada para seleccionar las poblaciones de CD4+ y CD8+ en ratones experimentales y de control tratados con PBS. **C)** Número absoluto de esplenocitos CD4+ ($\times 10^6$). **D)** Número absoluto de células CD8+ ($\times 10^6$). **E)** Número absoluto de células CD4+CD44+ ($\times 10^6$). **F)** Número absoluto de células CD8+CD44+ ($\times 10^6$). **G, H)** Diagramas de puntos representativos que muestran la estrategia utilizada para seleccionar las poblaciones CD11c+, CD11c+ y CD8 α + en ratones experimentales y de control tratados con PBS. **I)** Número absoluto de células CD11c+ ($\times 10^6$). **J)** Número absoluto de células CD11c+CD8 α + ($\times 10^6$). **K-M)** Cultivo *in vitro* de esplenocitos. Tras 72 horas de incubación con TSf, se midieron los niveles de células CD4+IFN- γ +, CD8+IFN- γ + e IFN- γ en los sobrenadantes: **K)** Porcentaje de células CD4+IFN- γ +. **L)** Porcentaje de células CD8+IFN- γ +. **M)** Niveles de IFN- γ en sobrenadantes (pg/mL). Los datos se expresan como la mediana con el rango intercuartílico. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes (n = 3-5 ratones por grupo). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney para comparaciones entre grupos: (*) indica diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$.

Alteraciones en las poblaciones inmunes de los ganglios linfáticos luego de la inmunización

En paralelo, se analizó también el número absoluto de las poblaciones CD4+, CD8+, CD4+CD44+, CD8+CD44+, CD11c+, y CD11c+CD8 α + de ganglios inguinales en los grupos en estudio (Figura 39 A, B, C, D, E y F). En línea con todos los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de Tesis, se observó que los ganglios provenientes de animales vacunados con el protocolo doble 5FU TSf-ISPA mostraron aumentos significativos en el número absoluto de dichas poblaciones en comparación del grupo 5FU TSf-ISPA, a excepción de la población CD4+CD44+, en cuyo caso se observó la misma tendencia pero sin alcanzar diferencia significativa. En su conjunto, los resultados coinciden de manera muy marcada en que los animales de los grupos tratados con dos dosis de 5FU para depletar las células MDSCs logran generar una mayor respuesta efectora, con un perfil compatible con una respuesta de tipo Th1, y que correlacionó con una mayor supervivencia luego del desafío con dosis letales de *T. cruzi*.

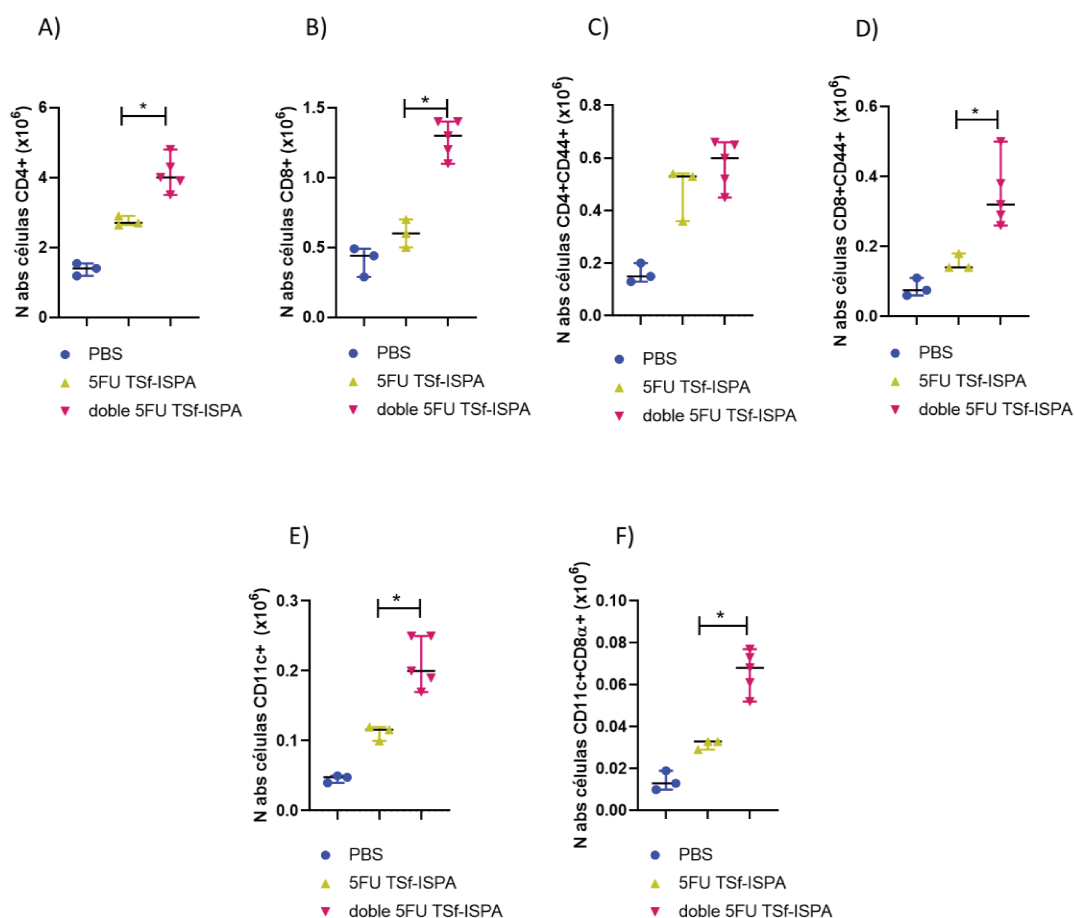
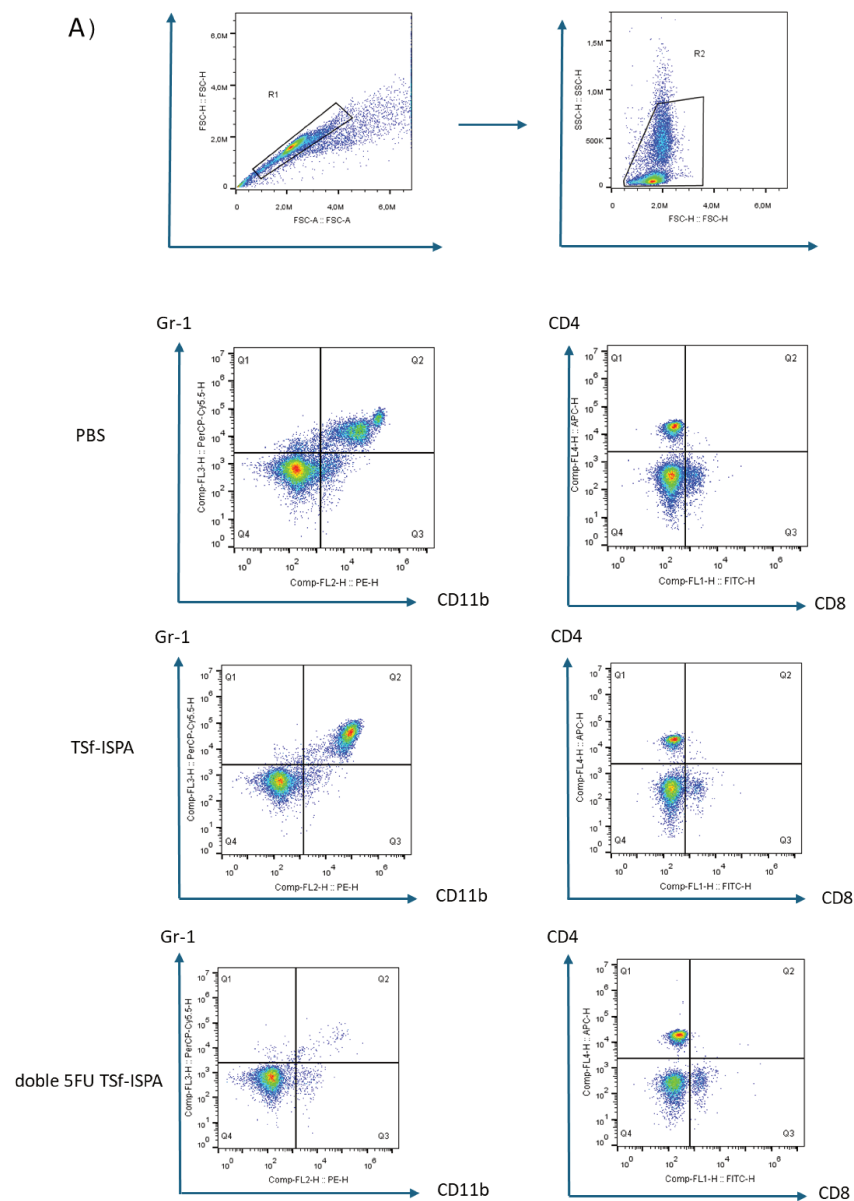


Figura 39: Cambios en las poblaciones celulares de los ganglios linfáticos a los 7 días de la inmunización. Los ratones fueron tratados con PBS, 5FU-TSf-ISPA o doble 5FU TSf-ISPA, y fueron sacrificados 7 días después de la última dosis de inmunización para obtener suspensiones de células ganglionares. **A)** Número absoluto de células ganglionares CD4+ ($\times 10^6$). **B)** Número absoluto de células CD8+ ($\times 10^6$). **C)** Número absoluto de células CD4+CD44+ ($\times 10^6$). **D)** Número absoluto de células CD8+CD44+ ($\times 10^6$). **E)** Número absoluto de células CD11c+ ($\times 10^6$). **F)** Número absoluto de células CD11c+CD8 α + ($\times 10^6$). Los datos se expresan como la mediana con el rango intercuartílico. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes (n = 3-5 ratones por grupo). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney para comparaciones entre los grupos indicados. Diferencias significativas con un valor de *p < 0,05.

Sangre periférica

Tras caracterizar los cambios celulares en los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos), resultó de interés determinar si la modulación con la estrategia de doble dosis de 5FU y la inmunización con TSf-ISPA generaban un impacto detectable a nivel sistémico.

Para este análisis, se recolectaron muestras de SP de animales control y tratados con doble 5FU TSf- ISPA a las 48 horas posteriores a la finalización del esquema de inmunización. Luego de optimizar el protocolo, seleccionando el uso de 50 μ l de SP, con H₂O destilada como medio para realizar la lisis de los glóbulos rojos, en un tiempo de incubación de 30 segundos, se procedió a realizar citometría de flujo para evaluar las frecuencias de las poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+, así como de las poblaciones de células compatibles con MDSCs, por su expresión de CD11b+Gr-1+.



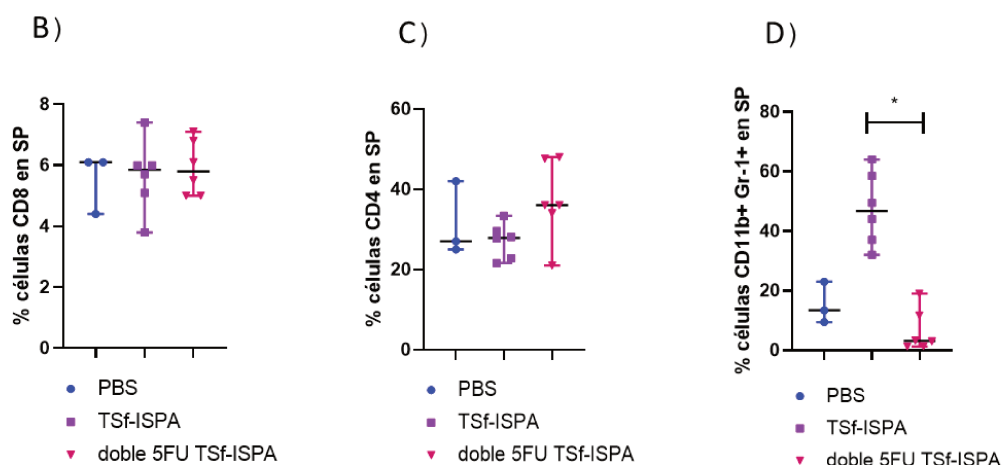


Figura 40: Evaluación de las poblaciones de células inmunitarias en sangre periférica durante el protocolo de inmunización. Ratones hembra BALB/c fueron inmunizados con doble 5FU TSf-IPSA o recibieron PBS o TSf-IPSA como control. Se recolectó SP 48 horas después de la última dosis de inmunización y se analizó mediante citometría de flujo. **A)** Gráficos de puntos (*dot plots*) representativos que muestran la estrategia de selección (*gating*) utilizada para identificar células CD4+, CD8+ y CD11b+Gr-1+ en ratones tratados. **B–D)** Porcentajes de células CD8+ (B), CD4+ (C) y CD11b+Gr-1+ (D) en 50 μ L de sangre periférica de ratones tratados con PBS, TSf-IPSA o doble 5FU TSf-IPSA. Los datos se expresan como mediana $\pm$ IC 95%. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes ($n = 3$ -6 ratones por grupo). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney para comparaciones entre los grupos indicados. Diferencias significativas con un valor de $*p < 0,05$.

Con el número de ratones empleados, no se observaron cambios significativos entre los grupos control, TSf-IPSA, y doble 5FU TSf-IPSA en cuanto a los porcentajes de células CD4+ y CD8+ en SP. Sin embargo, los ratones que recibieron el protocolo doble 5FU TSf-IPSA mostraron en SP una disminución significativa de células CD11b+Gr-1+, compatibles con células MDSCs, en comparación de los ratones tratados con TSf-IPSA, aportando evidencia de que el 5FU permite disminuir esta población celular no solo en el bazo sino también de manera sistémica en los ratones inmunizados (Figura 40).

Aunque estos resultados no son definitivos, muestran que el protocolo optimizado para realizar citometría de flujo a partir de un volumen pequeño de SP es válido para obtener datos sobre las poblaciones inmunes de los animales en experimentación, sin la necesidad de sacrificarlos para obtener los datos y permitiendo llevar a cabo posteriores estudios longitudinales que sirvan de guía para la mejora y optimización de formulaciones basadas en el diseño racional del candidato vacunal.

Discusión

Durante las últimas décadas, se han evaluado una gran cantidad de formulaciones vacunales contra el *T. cruzi*, alcanzando diferentes grados de protección, en variados modelos experimentales (135,145). A pesar de la cantidad de pruebas realizadas, son limitados los casos en que se ha logrado realizar estudios en modelos no murinos, y no se han alcanzado todavía fases clínicas avanzadas (II/III) en ningún caso (218). El avance lento que se ha observado en la optimización de los candidatos vacunales, sugiere que a pesar del éxito parcial que se ha logrado, aún resta explorar posibles alternativas que permitan potenciar aún más los candidatos vacunales. En este sentido, si bien el sistema inmune está conformado por componentes efectores y regulatorios, prácticamente no se han descrito en la bibliografía estudios que hayan abordado el diseño racional de una vacuna contra *T. cruzi* con una aproximación más amplia, que no se focalice únicamente en la generación de respuesta efectora de memoria, sino que también considere el papel del brazo regulatorio como un posible blanco a utilizar para optimizar el diseño racional de las formulaciones vacunales. Considerando que previamente hemos observado que la depleción de las células CD11b+Gr-1+ con 5FU en la etapa de inmunización permitió mejorar la capacidad protectora de la formulación TSf-ISPA, este trabajo de Tesis tuvo como objetivo continuar optimizando esta estrategia, así como analizar los cambios inmunológicos asociados.

Dado que el protocolo doble 5FU TSf-ISPA logró disminuir significativamente las MDSCs, aumentando la capacidad protectora en relación a la formulación basada en una sola dosis de 5FU, correlacionando con cambios en la respuesta celular DTH, (pero no de anticuerpos), se profundizó sobre los cambios en la respuesta celular que podrían estar implicados en la mayor protección.

Los resultados obtenidos mostraron que los animales tratados con doble 5FU TSf-ISPA generan mayores aumentos del número de esplenocitos T CD4+ y CD8+, así como células activadas que incluyen células T de memoria CD4+CD44+ y CD8+CD44+ en comparación con los animales tratados con una sola dosis de 5FU y TSf-ISPA. Además, los animales tratados con dos dosis de 5FU para depletar células MDSCs mostraron en el bazo mayores niveles de CDs compatibles con CDs convencionales de tipo I que favorecen la presentación cruzada, sustentando el desarrollo de una mayor respuesta de células T CD8+. Asimismo, cultivos *in vitro* estimulados con TSf mostraron que los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con doble 5FU TSf-ISPA presentaron mayor porcentaje de células TCD4+IFN- γ +, T CD8+IFN- γ + y mayores niveles de IFN- γ en el sobrenadante de los cultivos, todo lo cual refuerza el concepto de que la depleción de las células CD11b+Gr-1+ con dos dosis de 5FU se asocia con la generación de una mayor respuesta efectora que incluye células T CD8+ de memoria y productoras de IFN- γ .

También en línea con estos resultados, los estudios realizados en células del ganglio inguinal drenante mostraron cambios semejantes, aportando evidencia de que la mayor respuesta T CD8+ observada en los animales tratados con doble 5FU TSf-ISPA tiene lugar tanto a nivel local de los ganglios drenantes como sistémico, incluyendo el bazo.

Estos resultados están en línea con la gran mayoría de los estudios realizados sobre candidatos vacunales, e incluso los escasos desarrollos que han avanzado a pruebas en modelos preclínicos no murinos, que han asociado fundamentalmente la capacidad protectora a la generación de una respuesta protectora de células T CD8+ productoras de IFN- γ (234). Para sustentar estos resultados, se prevé la realización de experimentos de transferencia adoptiva de MDSCs, lo cual permitiría evaluar si la reconstitución de esta población revierte los efectos observados sobre la respuesta efectora.

La asociación de la respuesta CD8+ ha sido también estudiada en mayor profundidad mediante el uso de tetrámeros (235). Por ejemplo, Biscari y colaboradores (133) mostraron que la inmunización con una vacuna basada en CDs estimuladas con LPS y cargadas con el epítipo TsKb20 indujo un aumento significativo de linfocitos T CD8+ específicos para dicho epítipo (133).

Si bien no se había analizado ni empleado previamente en el contexto de vacunas contra *T. cruzi*, otros trabajos también han abordado el estudio de la participación de las células MDSCs en cuanto a su capacidad de limitar la efectividad de candidatos vacunales contra otros patógenos. A partir de los estudios realizados pudo observarse que la expansión de las MDSCs no es exclusiva de ciertas condiciones particulares, sino que por el contrario, están involucradas en procesos de inmunización realizados con distintos antígenos, adyuvantes y vías de inmunización (193). Por ejemplo, Aintablian y colaboradores (236), reportaron que la depleción de MDSCs con ácido transretinoico permite aumentar la frecuencia y activación de CDs y de las células T CD4+ en un modelo de inmunización con bacterias *M. Tuberculosis* inactivadas por calor (236), lo cual también respalda que las MDSCs pueden jugar un papel en la etapa de inmunización afectando tanto las células T CD8+, T CD4+, y CDs, en el mismo sentido que se ha observado en nuestro modelo. Interesantemente, se ha reportado que la influencia de las MDSCs sobre las CDs es muy notorio, al punto de que dichas células podrían matar las CDs mediante un mecanismo dependiente de NO (116).

En su conjunto, los resultados mostrados sustentan que la vacuna con dos dosis de 5FU permite potenciar en mejor medida la formulación TSf-ISPA, que una sola dosis de 5FU, y la disminución de MDSCs observada en los animales vacunados se asoció con mayores incrementos de distintas poblaciones de la respuesta efectora, incluyendo células activadas y de memoria, en el bazo y ganglios, las cuales se asocian con la mayor capacidad protectora y la memoria inmunológica observada en los animales tratados con doble 5FU TSf-ISPA.

Debido a que la evaluación clínica mediante la vacunación de las poblaciones afectadas es de difícil implementación, por diferentes causas relacionadas tanto con el tiempo necesario para llevar a cabo los estudios, como por complejas causas sociales (218), la identificación de potenciales correlatos de protección representaría una herramienta valiosa, ya que podrían ser útiles como guía para la optimización de los candidatos vacunales, e incluso como punto final sustituto de la eficacia de protección, evitando o acortando los tiempos de estudio requeridos (237).

La mayoría de los correlatos de protección establecidos contra diversos patógenos hasta el momento se basan mayoritariamente en anticuerpos y en muy limitados casos se han identificado o planteado el uso de correlatos basados en poblaciones celulares como linfocitos T CD8+ específicos o polifuncionales (223). Para el caso del *T. cruzi*, este hecho tiene una relevancia especial, ya que la generación de anticuerpos específicos si bien podría cumplir un rol protector, en la mayoría de los casos no se ha postulado que sean suficientes por si solos, por lo que la búsqueda de correlatos de protección basados en componentes celulares como las células T CD8+ podría adquirir mayor importancia. Esta condición plantea un mayor desafío en cuanto a lo metodológico ya que el análisis de anticuerpos puede realizarse a partir de un volumen mínimo de sangre periférica que no implica sacrificar el animal, mientras que el análisis de poblaciones celulares puede requerir, en el caso de modelos murinos, el sacrificio del mismo, para analizar esplenocitos, células de los ganglios o incluso cultivos celulares que permitan amplificar la cantidad de células que secretan IFN- γ . Esta dificultad implica la realización de al menos dos experimentos independientes: un ensayo para mostrar que los animales vacunados tienen, por ejemplo, mayor respuesta CD8+ y otro experimento para mostrar que los animales vacunados tienen mayor protección, para luego asociar ambos resultados. Sin embargo, esta metodología implica el inconveniente de no permitir evaluar en cada ratón qué niveles de células son los que correlacionan con la protección de cada ratón individual, en cuanto a niveles de parasitemia y supervivencia.

Para este fin, resulta vital realizar un análisis longitudinal de cada individuo, y optimizar un protocolo que permita analizar por citometría de flujo distintas poblaciones celulares. De acuerdo a los antecedentes de esta línea de investigación, en esta Tesis se priorizó evaluar niveles de linfocitos T CD4+, T CD8+ y células CD11b+Gr-1+, compatibles con células MDSCs, a partir de un volumen pequeño de SP, que no implique el sacrificio del animal ni afecte significativamente su estado general, previo a la infección.

Una vez optimizado el protocolo, se observó que los animales vacunados con doble 5FU TSf-ISPA presentaban en SP menores niveles de células CD11b+Gr-1+ que los ratones tratados solo con TSf-ISPA. Este resultado también respalda la utilidad de emplear 5FU para potenciar la formulación TSf-ISPA, disminuyendo los niveles de células CD11b+Gr-1+ no solo en el bazo sino también a nivel sistémico. En este caso en que se utilizó un número reducido de animales, no se observó diferencia significativa en cuanto a los niveles de células CD4+ y CD8+ en SP entre los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, un estudio posterior llevado a cabo en mayor profundidad, mostró que sí hay diferencias significativas en estas poblaciones en SP entre el grupo vacunado con doble 5FU TSf-ISPA y los ratones control, permitiendo, (luego de un análisis integrador), la identificación de un potencial correlato de protección basado en el uso del protocolo optimizado en esta Tesis (149).

Conclusiones Parciales

Se observó que la estrategia de inmunización con doble 5FU TSf-ISPA se asoció con:

- Mayor respuesta celular efectora en bazo y ganglio drenante en comparación de los animales tratados con 5FU TSf-ISPA, con incrementos en el número absoluto de células CD4+ y CD8+ e incluyendo células activadas y de memoria CD4+CD44+, CD8+CD44+, con capacidad de generar mayor producción de IFN- γ luego de cultivo *in vitro*. Además, estos cambios estuvieron acompañados por un incremento en el número absoluto de CD45 compatible con CD45 convencionales de tipo I, asociadas a la estimulación de respuestas Th1.
- Mediante el uso de un protocolo de medición de varias poblaciones celulares a partir de un volumen pequeño de SP se observó que el protocolo doble 5FU TSf-ISPA también disminuye las células CD11b+ Gr-1+ compatibles con MDSCs a nivel sistémico y tempranamente a las 48 hs, en comparación de un protocolo de inmunización con TSf-ISPA sin 5FU.

Conclusiones finales

La presente tesis doctoral aporta evidencia de que la modulación del ambiente inmunológico mediante el uso de una doble dosis de 5FU es una herramienta valiosa para optimizar la capacidad protectora del candidato vacunal TSf-ISPA contra *T. cruzi*.

A través del desarrollo de este trabajo, se ha logrado establecer que:

- La administración del protocolo doble 5FU TSf-ISPA moduló la cinética de los esplenocitos CD11b+Gr-1+, inducidos en la inmunización, los cuales presentaron capacidad supresora *in vitro* y son compatibles con células MDSCs. La estrategia logró disminuir dichas células hacia el día 15 post-inm y mostró mejor capacidad protectora contra dosis letales elevadas de *T. cruzi* Tulahuén en la cepa BALB/c, en comparación con el uso de una sola dosis de 5FU previo a la inoculación con TSf-ISPA.
- La formulación seleccionada doble 5FU TSf-ISPA mostró protección en cuanto a la parasitemia y/o supervivencia en diferentes modelos murinos, en donde se emplearon cepas de ratón de distinta base genética (ratones BALB/c y C57BL/6), distintos linajes genéticamente distantes del parásito (DTU I y DTU VI), y distintas vías de infección (intraperitoneal e intradérmica). Además, la formulación también confirió capacidad protectora a mediano plazo (45 días post-inm) en el modelo BALB/c/Tulahuén, avalando la generación de memoria inmunológica.
- Se observó mayor incremento de células CD4+, CD8+ y CDs compatibles con CDs convencionales de tipo I en los ganglios y bazo de los animales tratados con doble 5FU TSf-ISPA, en comparación con el grupo tratado con una sola dosis de 5FU, aportando evidencia de que la depleción de las células MDSCs permite generar mayor protección de forma asociada a la generación de una mayor respuesta efectora celular. Por otro lado, no se obtuvo evidencia que respalde que la respuesta humoral sea responsable del incremento de protección generado con dos dosis de 5FU.
- Se puso en práctica un protocolo de medición por citometría de flujo de poblaciones celulares con volúmenes pequeños de SP, con el cual se obtuvo evidencia de que el protocolo doble 5FU TSf-ISPA también disminuye tempranamente las células CD11b+Gr-1+ de forma sistémica.

En su conjunto, los resultados sustentan que la formulación doble 5FU TSf-ISPA confiere capacidad protectora contra *T. cruzi* en distintos modelos preclínicos, influenciando tanto al brazo efector como al brazo regulatorio del sistema inmune, todo lo cual aporta información relevante para continuar avanzando hacia el desarrollo racional de un candidato vacunal con potencial para progresar hacia estadios clínicos de evaluación.

Bibliografía

1. Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, et al. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *Front Public Health*. 2019;7:166. doi:10.3389/fpubh.2019.00166.
2. World Health Organization. *Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. [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)) [Accessed 3rd March 2026].
3. Bernstein RE. Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. *J R Soc Med*. 1984;77(7):608-9. doi:10.1177/014107688407700715.
4. Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasit Vectors*. 2014;7:317. doi:10.1186/1756-3305-7-317.
5. Zingales B, Bartholomeu DC. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Impact on transmission cycles and Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117:e210193. doi:10.1590/0074-02760210193.
6. Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*. 1980;27(1):37-58. doi:10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x.
7. Adl SM, Bass D, Lane CE, Lukeš J, Schoch CL, Smirnov A, et al. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2019;66(1):4-119. doi:10.1111/jeu.12691.
8. Souza W de. Structural organization of Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:89-100. doi:10.1590/s0074-02762009000900014.
9. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hottel CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020;2020:baaa062. doi:10.1093/database/baaa062.
10. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051-4. doi:10.1590/s0074-02762009000700021.
11. Tomasini N, Diosque P. Evolution of Trypanosoma cruzi: Clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):403-13. doi:10.1590/0074-02760140401.
12. Zingales B, Macedo AM. Fifteen years after the definition of Trypanosoma cruzi DTUs: What have we learned? *Life (Basel)*. 2023;13(12):2339. doi:10.3390/life13122339.

13. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 1998;28(1):85-104. doi:10.1016/s0020-7519(97)00180-x.
14. Coura JR. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(8):962-7. doi:10.1590/0074-0276130565.
15. De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2002;1(1):3. doi:10.1186/1475-9292-1-3.
16. Tomasina R, González FC, Cabrera A, Basmadjian Y, Robello C. From trypomastigotes to trypomastigotes: Analyzing the one-way intracellular journey of *Trypanosoma cruzi* by ultrastructure expansion microscopy. *Pathogens.* 2024;13(10):866. doi:10.3390/pathogens13100866.
17. Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic chagas' disease. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2527-34. doi:10.1056/NEJMct1014204.
18. Watanabe Costa R, da Silveira JF, Bahia D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. *Front Microbiol.* 2016;7:388. doi:10.3389/fmicb.2016.00388.
19. Barrias E, Reignault L, de Carvalho TMU, de Souza W. Clathrin coated pit dependent pathway for *Trypanosoma cruzi* internalization into host cells. *Acta Trop.* 2019;199:105057. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105057.
20. Salassa BN, Romano PS. Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence.* 2019;10(1):460-9. doi:10.1080/21505594.2018.1543517.
21. Cueto JA, Vanrell MC, Salassa BN, Nola S, Galli T, Colombo MI, et al. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required during *Trypanosoma cruzi* parasitophorous vacuole development. *Cell Microbiol.* 2017;19(6). doi:10.1111/cmi.12713.
22. Barrias ES, de Carvalho TMU, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Front Immunol.* 2013;4:186. doi:10.3389/fimmu.2013.00186.
23. de Pablos Torró LM, Retana Moreira L, Osuna A. Extracellular vesicles in Chagas disease: A new passenger for an old disease. *Front Microbiol.* 2018;9:1190. doi:10.3389/fmicb.2018.01190.
24. Garcia MN, Aguilar D, Gorchakov R, Rossmann SN, Montgomery SP, Rivera H, et al. Evidence of autochthonous Chagas disease in southeastern Texas. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(2):325-30. doi:10.4269/ajtmh.14-0238.
25. Garcia MN, Hernandez D, Gorchakov R, Murray KO, Hotez PJ. The 1899 United States kissing bug epidemic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(12):e0004117. doi:10.1371/journal.pntd.0004117.
26. Provecho YM, Fernández MDP, Salvá L, Meli S, Cano F, Sartor P, et al. Urban infestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), an overlooked phenomena for Chagas disease in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2021;116:e210056. doi:10.1590/0074-02760210056.

27. Carbajal-de-la-Fuente AL, Provecho YM, Fernández MDP, Cardinal MV, Lencina P, Spillmann C, et al. The eco-epidemiology of *Triatoma infestans* in the temperate Monte desert ecoregion of mid-western Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(10):698-708. doi:10.1590/0074-02760160519.
28. Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(7):856-62. doi:10.1590/0074-0276140236.
29. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):277-82. doi:10.1590/0074-0276140362.
30. Kemmerling U, Osuna A, Schijman AG, Truyens C. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A review about the interactions between the parasite, the placenta, the maternal and the fetal/neonatal immune responses. *Front Microbiol*. 2019;10:1854. doi:10.3389/fmicb.2019.01854.
31. Bustos PL, Milduberger N, Volta BJ, Perrone AE, Laucella SA, Bua J. *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*. 2019;10:1250. doi:10.3389/fmicb.2019.01250.
32. Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: An update. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):363-8. doi:10.1590/0074-02760140405.
33. Echeverria LE, Morillo CA. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(1):119-34. doi:10.1016/j.idc.2018.10.015.
34. Martin DL, Lowe KR, McNeill T, Thiele EA, Roellig DM, Zajdowicz J, et al. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop*. 2015;149:15-8. doi:10.1016/j.actatropica.2015.05.002.
35. Rios A, Ribeiro M, Sousa A, Pimentel F, Hagström L, Andrade R, et al. Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(1):3-8. doi:10.1590/0074-02760170025.
36. Araujo PF, Almeida AB, Pimentel CF, Silva AR, Sousa A, Valente SA, et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: A new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(6):437-46. doi:10.1590/0074-02760160538.
37. Stanaway JD, Roth G. The burden of Chagas disease: Estimates and challenges. *Glob Heart*. 2015;10(3):139-44. doi:10.1016/j.ghheart.2015.06.001.
38. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(6):753-70. doi:10.1007/s00281-012-0351-7.

39. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391(10115):82-94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
40. Guarner J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(3):164-9. doi:10.1053/j.semdp.2019.04.008.
41. Coura JR. Chagas disease: What is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:113-22. doi:10.1590/s0074-02762007000900018.
42. Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. The challenges of Chagas disease-- grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med*. 2007;4(12):e332. doi:10.1371/journal.pmed.0040332.
43. Jabari S, de Oliveira EC, Brehmer A, da Silveira ABM. Chagasic megacolon: Enteric neurons and related structures. *Histochem Cell Biol*. 2014;142(3):235-44. doi:10.1007/s00418-014-1250-x.
44. Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. The epidemiology, clinical manifestations, and management of Chagas heart disease. *Clin Cardiol*. 2015;38(9):565-9. doi:10.1002/clc.22421.
45. Sales Junior PA, Molina I, Fonseca Murta SM, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(5):1289-303. doi:10.4269/ajtmh.16-0761.
46. de Sousa AS, Vermeij D, Ramos AN, Luquetti AO. Chagas disease. *Lancet*. 2024;403(10422):203-18. doi:10.1016/S0140-6736(23)01787-7.
47. Monteon V. Trypanosoma cruzi: The early contact between insect-derived metacyclic trypomastigotes and the mammalian cells. *Ann Parasitol*. 2019;65(3):193-204. doi:10.17420/ap6503.201.
48. Padilla AM, Simpson LJ, Tarleton RL. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol*. 2009;183(2):1245-52. doi:10.4049/jimmunol.0901178.
49. Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the immune response by Trypanosoma cruzi during acute infection. *Front Immunol*. 2015;6:659. doi:10.3389/fimmu.2015.00659.
50. Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol*. 2004;172(3):1711-8. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1711.
51. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol*. 2006;177(6):3515-9. doi:10.4049/jimmunol.177.6.3515.
52. Gravina HD, Antonelli L, Gazzinelli RT, Ropert C. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with Trypanosoma cruzi. *PLoS One*. 2013;8(5):e63100. doi:10.1371/journal.pone.0063100.

53. Almeida IC, Gazzinelli RT. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: Structural and functional analyses. *J Leukoc Biol.* 2001;70(4):467-77.
54. Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol.* 2004;173(9):5688-96. doi:10.4049/jimmunol.173.9.5688.
55. Oliveira AC, de Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, da Silva RN, Neves FS, et al. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000870. doi:10.1371/journal.ppat.1000870.
56. Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 2010;12(7):511-7. doi:10.1016/j.micinf.2010.03.005.
57. Acevedo GR, Girard MC, Gómez KA. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. *Front Immunol.* 2018;9:1929. doi:10.3389/fimmu.2018.01929.
58. Bott E, Carneiro AB, Gimenez G, López MG, Lammel EM, Atella GC, et al. Lipids from *Trypanosoma cruzi* amastigotes of RA and K98 strains generate a pro-inflammatory response via TLR2/6. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:151. doi:10.3389/fcimb.2018.00151.
59. Medeiros MM, Peixoto JR, Oliveira AC, Cardilo-Reis L, Koatz VLG, Van Kaer L, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. *J Leukoc Biol.* 2007;82(3):488-96. doi:10.1189/jlb.0706478.
60. Bento CA, Melo MB, Previato JO, Mendonça-Previato L, Peçanha LM. Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. *J Immunol.* 1996;157(11):4996-5001.
61. De Arruda Hinds LB, Previato LM, Previato JO, Vos Q, Mond JJ, Peçanha LM. Modulation of B-lymphocyte and NK cell activities by glycoinositolphospholipid purified from *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 1999;67(11):6177-80. doi:10.1128/IAI.67.11.6177-6180.1999.
62. Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, Cerny A, dos Santos SL, Bartholomeu DC, et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 2011;187(4):1903-11. doi:10.4049/jimmunol.1003911.
63. Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett.* 1992;33(1):35-40. doi:10.1016/0165-2478(92)90090-b.
64. Alvarez MN, Peluffo G, Piacenza L, Radi R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: Consequences for oxidative killing and role of

- microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem.* 2011;286(8):6627-40. doi:10.1074/jbc.M110.167247.
65. Koo SJ, Chowdhury IH, Szczesny B, Wan X, Garg NJ. Macrophages promote oxidative metabolism to drive nitric oxide generation in response to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2016;84(12):3527-41. doi:10.1128/IAI.00809-16.
 66. Lieke T, Graefe SEB, Klauenberg U, Fleischer B, Jacobs T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun.* 2004;72(12):6817-25. doi:10.1128/IAI.72.12.6817-6825.2004.
 67. Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KRB, Marinho CRF, D'Império Lima MR, et al. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2006;74(4):2031-42. doi:10.1128/IAI.74.4.2031-2042.2006.
 68. Monteiro AC, Schmitz V, Morrot A, de Arruda LB, Nagajyothi F, Granato A, et al. Bradykinin B2 receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. *PLoS Pathog.* 2007;3(11):e185. doi:10.1371/journal.ppat.0030185.
 69. Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, et al. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol.* 2002;168(12):6366-74. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6366.
 70. Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1998;20(5):207-16. doi:10.1046/j.1365-3024.1998.00154.x.
 71. Cai CW, Blase JR, Zhang X, Eickhoff CS, Hoft DF. Th17 cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2016;12(10):e1005902. doi:10.1371/journal.ppat.1005902.
 72. Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Khan M, Acosta Rodríguez EV, Montes CL, Merino MC, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology.* 2011;132(1):123-33. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03347.x.
 73. Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodríguez EV, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol.* 2013;14(5):514-22. doi:10.1038/ni.2569.

74. Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, de Messias-Reason IJ. The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol.* 2017;8:607. doi:10.3389/fmicb.2017.00607.
75. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. 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.* 1992;22(10):2501-6. doi:10.1002/eji.1830221006.
76. Krautz GM, Kissinger JC, Krettli AU. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 2000;16(1):31-4. doi:10.1016/s0169-4758(99)01581-1.
77. Beloscar J, Pérez AR, Revelli S. *Aportes al conocimiento de la enfermedad de chagas*. Buenos Aires: Corpus Editorial; 2013.
78. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martínez A, Radi R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(7):723-34. doi:10.1089/ars.2012.4618.
79. Paiva CN, Medei E, Bozza MT. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. *PLoS Pathog.* 2018;14(4):e1006928. doi:10.1371/journal.ppat.1006928.
80. Minoprio P. Parasite polyclonal activators: New targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol.* 2001;31(5-6):588-91. doi:10.1016/s0020-7519(01)00171-0.
81. Toro Acevedo CA, Valente BM, Burle-Caldas GA, Galvão-Filho B, Santiago H da C, Esteves Arantes RM, et al. Down modulation of host immune response by amino acid repeats present in a *Trypanosoma cruzi* ribosomal antigen. *Front Microbiol.* 2017;8:2188. doi:10.3389/fmicb.2017.02188.
82. Reina-San-Martín B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* 2000;6(8):890-7. doi:10.1038/78651.
83. Gao W, Wortis HH, Pereira MA. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int Immunol.* 2002;14(3):299-308. doi:10.1093/intimm/14.3.299.
84. Gunter SM, Jones KM, Zhan B, Essigmann HT, Murray KO, Garcia MN, et al. Identification and characterization of the *Trypanosoma cruzi* B-cell superantigen Tc24. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(1):114-21. doi:10.4269/ajtmh.15-0438.
85. Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol.* 1988;28(5):553-61. doi:10.1111/j.1365-3083.1988.tb01487.x.

86. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. *Infect Immun*. 1996;64(1):128-34. doi:10.1128/iai.64.1.128-134.1996.
87. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006;25(2):195-201. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.003.
88. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723-37.
89. Bennett JA, Rao VS, Mitchell MS. Systemic bacillus Calmette-Guérin (BCG) activates natural suppressor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(10):5142-4. doi:10.1073/pnas.75.10.5142.
90. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
91. Nagaraj S, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:213-23. doi:10.1007/978-0-387-72005-0_22.
92. Gamba JC, Pérez AR, Poncini CV, Poveda C, Marcipar I, Cabrera G. Towards a map of the immune system manipulation network by *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1711520. doi:10.3389/fcimb.2025.1711520.
93. Bontempi IA, Vicco MH, Cabrera G, Villar SR, González FB, Roggero EA, et al. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine*. 2015;33(10):1274-83. doi:10.1016/j.vaccine.2015.01.044.
94. Poncini CV, Ilarregui JM, Batalla EI, Engels S, Cerliani JP, Cucher MA, et al. *Trypanosoma cruzi* infection imparts a regulatory program in dendritic cells and T cells via galectin-1-dependent mechanisms. *J Immunol*. 2015;195(7):3311-24. doi:10.4049/jimmunol.1403019.
95. Cabrera G, Marcipar I. Vaccines and the regulatory arm of the immune system. An overview from the *Trypanosoma cruzi* infection model. *Vaccine*. 2019;37(28):3628-37. doi:10.1016/j.vaccine.2019.05.015.
96. Borgna E, Prochetto E, Gamba JC, Marcipar I, Cabrera G. Role of myeloid-derived suppressor cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2023;375:117-63. doi:10.1016/bs.ircmb.2022.09.002.
97. Fresno M, Gironès N. Myeloid-derived suppressor cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:737364. doi:10.3389/fcimb.2021.737364.
98. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T cells: Differentiation and function. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(9):721-5. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0193.

99. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;67(1):425; author reply 426. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3037.
100. Ostrand-Rosenberg S, Lamb TJ, Pawelec G. Here, there, and everywhere: Myeloid-derived suppressor cells in immunology. *J Immunol.* 2023;210(9):1183-97. doi:10.4049/jimmunol.2200914.
101. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162-74. doi:10.1038/nri2506.
102. Medina E, Hartl D. Myeloid-derived suppressor cells in infection: A general overview. *J Innate Immun.* 2018;10(5-6):407-13. doi:10.1159/000489830.
103. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol.* 2004;28(5):509-54. doi:10.1016/j.dci.2003.09.010.
104. Millrud CR, Bergenfelz C, Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget.* 2017;8(2):3649-65. doi:10.18632/oncotarget.12278.
105. Bleve A, Consonni FM, Porta C, Garlatti V, Sica A. Evolution and targeting of myeloid suppressor cells in cancer: A translational perspective. *Cancers (Basel).* 2022;14(3):510. doi:10.3390/cancers14030510.
106. Loftus TJ, Mohr AM, Moldawer LL. Dysregulated myelopoiesis and hematopoietic function following acute physiologic insult. *Curr Opin Hematol.* 2018;25(1):37-43. doi:10.1097/MOH.0000000000000395.
107. Dorhoi A, Glaría E, Garcia-Tellez T, Nieuwenhuizen NE, Zelinskyy G, Favier B, et al. MDSCs in infectious diseases: Regulation, roles, and readjustment. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(4):673-85. doi:10.1007/s00262-018-2277-y.
108. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol.* 2018;19(2):108-19. doi:10.1038/s41590-017-0022-x.
109. Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(8):485-98. doi:10.1038/s41577-020-00490-y.
110. Blidner AG, Méndez-Huergo SP, Cagnoni AJ, Rabinovich GA. Re-wiring regulatory cell networks in immunity by galectin-glycan interactions. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3407-18. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.037.
111. Fultang N, Li X, Li T, Chen YH. Myeloid-derived suppressor cell differentiation in cancer: Transcriptional regulators and enhanceosome-mediated mechanisms. *Front Immunol.* 2020;11:619253. doi:10.3389/fimmu.2020.619253.
112. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol.* 2015;98(6):913-22. doi:10.1189/jlb.4RI0515-204R.

113. Wang K, Wang X, Sun N. Molecular mechanisms governing the differentiation and expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Front Cell Dev Biol.* 2025;13:1677201. doi:10.3389/fcell.2025.1677201.
114. Prochetto E, Borgna E, Jiménez-Cortegana C, Sánchez-Margalet V, Cabrera G. Myeloid-derived suppressor cells and vaccination against pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:1003781. doi:10.3389/fcimb.2022.1003781.
115. De Sanctis F, Bronte V, Ugel S. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Microbiol Spectr.* 2016;4(3). doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0016-2015.
116. Ribechini E, Eckert I, Beilhack A, Du Plessis N, Walzl G, Schleicher U, et al. Heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* prime-boost vaccination induces myeloid-derived suppressor cells with spleen dendritic cell-killing capability. *JCI Insight.* 2019;5(13):e128664, 128664. doi:10.1172/jci.insight.128664.
117. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009;182(8):4499-506. doi:10.4049/jimmunol.0802740.
118. Arocena AR, Onofrio LI, Pellegrini AV, Carrera Silva AE, Paroli A, Cano RC, et al. Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *Eur J Immunol.* 2014;44(1):184-94. doi:10.1002/eji.201343606.
119. Goñi O, Alcaide P, Fresno M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: Involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol.* 2002;14(10):1125-34. doi:10.1093/intimm/dxf076.
120. Poncini CV, González-Cappa SM. Dual role of monocyte-derived dendritic cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol.* 2017;47(11):1936-48. doi:10.1002/eji.201646830.
121. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 2010;70(8):3052-61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690.
122. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: What you need to know. *Ann Med.* 2018;50(2):110-20. doi:10.1080/07853890.2017.1407035.
123. Zepp F. Principles of vaccination. *Methods Mol Biol.* 2016;1403:57-84. doi:10.1007/978-1-4939-3387-7_3.
124. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, editors. *Plotkin's Vaccines*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. doi:10.1016/C2013-0-18914-3.
125. Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med.* 2014;6(6):708-20. doi:10.1002/emmm.201403876.

126. Apostólico J de S, Lunardelli VAS, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, modus operandi, and licensing. *J Immunol Res*. 2016;2016:1459394. doi:10.1155/2016/1459394.
127. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*. 2013;4:114. doi:10.3389/fimmu.2013.00114.
128. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: From basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(2):83-100. doi:10.1038/s41577-020-00479-7.
129. Chuah JJ, Parasuraman S. Overview of types of vaccines and vaccination methods. *JAPA Academy Journal*. 2025;3(4):148-59. doi:10.4103/JAPAJ.JAPAJ_19_25.
130. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(3):313-29. doi:10.1586/14760584.2016.1124762.
131. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. Mrna vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(4):261-79. doi:10.1038/nrd.2017.243.
132. Sánchez-León ML, Jiménez-Cortegana C, Cabrera G, Vermeulen EM, de la Cruz-Merino L, Sánchez-Margalet V. The effects of dendritic cell-based vaccines in the tumor microenvironment: Impact on myeloid-derived suppressor cells. *Front Immunol*. 2022;13:1050484. doi:10.3389/fimmu.2022.1050484.
133. Biscari L, Kaufman CD, Farré C, Huhn V, Pacini MF, Balbi CB, et al. Immunization with lipopolysaccharide-activated dendritic cells generates a specific CD8+ T cell response that confers partial protection against infection with *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:897133. doi:10.3389/fcimb.2022.897133.
134. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295-306. doi:10.1056/NEJMoa1507574.
135. Dumonteil E, Herrera C. The case for the development of a Chagas disease vaccine: Why? How? When? *Trop Med Infect Dis*. 2021;6(1):16. doi:10.3390/tropicalmed6010016.
136. Rios LE, Vázquez-Chagoyán JC, Pacheco AO, Zago MP, Garg NJ. Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2019;200:105168. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105168.
137. Gupta S, Salgado-Jiménez B, Lokugamage N, Vázquez-Chagoyán JC, Garg NJ. TcG2/TcG4 DNA vaccine induces Th1 immunity against acute *Trypanosoma cruzi* infection: Adjuvant and antigenic effects of heterologous *T. rangeli* Booster Immunization. *Front Immunol*. 2019;10:1456. doi:10.3389/fimmu.2019.01456.

138. Rodríguez-Morales O, Monteón-Padilla V, Carrillo-Sánchez SC, Rios-Castro M, Martínez-Cruz M, Carabarin-Lima A, et al. Experimental vaccines against Chagas disease: A journey through history. *J Immunol Res*. 2015;2015:489758. doi:10.1155/2015/489758.
139. Pérez Brandan C, Basombrío MÁ. Genetically attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as a potential vaccination tool. *Bioengineered*. 2012;3(4):242-6. doi:10.4161/bioe.20680.
140. Sánchez-Valdéz FJ, Pérez Brandán C, Ferreira A, Basombrío MÁ. Gene-deleted live-attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as vaccines to protect against Chagas disease. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(5):681-97. doi:10.1586/14760584.2015.989989.
141. Garg NJ. An update on vaccines against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Pathogens*. 2025;14(2):124. doi:10.3390/pathogens14020124.
142. Basso B, Marini V. Experimental Chagas disease in balb/c mice previously vaccinated with *T. rangeli*. II. The innate immune response shows immunological memory: reality or fiction? *Immunobiology*. 2015;220(3):428-36. doi:10.1016/j.imbio.2014.10.003.
143. Breganó JW, Picão RC, Graça VK, Menolli RA, Itow Jankevicius S, Pingé Filho P, et al. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;39(3):257-64. doi:10.1016/S0928-8244(03)00256-6.
144. Araujo FG, Morein B. Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigens incorporated into iscoms protects against lethal challenge in mice. *Infect Immun*. 1991;59(9):2909-14. doi:10.1128/iai.59.9.2909-2914.1991.
145. Farani PSG, Jones KM, Poveda C. Treatments and the perspectives of developing a vaccine for Chagas disease. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(8):870. doi:10.3390/vaccines12080870.
146. Pinazo MJ, Malchiodi E, Ioset JR, Bivona A, Gollob KJ, Dutra WO. Challenges and advancements in the development of vaccines and therapies against Chagas disease. *Lancet Microbe*. 2024;5(10):100972. doi:10.1016/j.lanmic.2024.100972.
147. Teixeira SM, Burle-Caldas G de A, Castro JT, Gazzinelli RT. The time has come for a vaccine against Chagas disease. *Lancet Reg Health Am*. 2025;45:101059. doi:10.1016/j.lana.2025.101059.
148. Camargo EP, Gazzinelli RT, Morel CM, Precioso AR. Why do we still have not a vaccine against Chagas disease? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117:e200314. doi:10.1590/0074-02760200314.
149. Gamba JC, Borgna E, Prochetto E, Pérez AR, Batista-Duharte A, Marcipar I, et al. Integrating cellular immune biomarkers with machine learning to identify potential correlates of protection for a *Trypanosoma cruzi* vaccine. *Vaccines*. 2025;13(9):915. doi:10.3390/vaccines13090915.
150. Sánchez-Valdéz FJ, Padilla A, Wang W, Orr D, Tarleton RL. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife*. 2018;7:e34039. doi:10.7554/eLife.34039.

151. Campetella O, Buscaglia CA, Mucci J, Leguizamón MS. Parasite-host glycan interactions during *Trypanosoma cruzi* infection: Trans-sialidase rides the show. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(5):165692. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165692.
152. Freire-de-Lima L, Oliveira IA, Neves JL, Penha LL, Alisson-Silva F, Dias WB, et al. Sialic acid: A sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol.* 2012;3:356. doi:10.3389/fimmu.2012.00356.
153. Freitas LM, dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TAO, Rodrigues TS, Gazzinelli RT, et al. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One.* 2011;6(10):e25914. doi:10.1371/journal.pone.0025914.
154. Cremona ML, Sánchez DO, Frasch AC, Campetella O. A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. *Gene.* 1995;160(1):123-8. doi:10.1016/0378-1119(95)00175-6.
155. Frasch AC. Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitology.* 1994;108 Suppl:S37-44. doi:10.1017/s0031182000075703.
156. Leguizamón MS, Campetella O, Russomando G, Almiron M, Guillen I, Ganzález Cappa SM, et al. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. *J Infect Dis.* 1994;170(6):1570-4. doi:10.1093/infdis/170.6.1570.
157. Fontanella GH, De Vusser K, Laroy W, Daurelio L, Nocito AL, Revelli S, et al. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: A vaccine candidate. *Vaccine.* 2008;26(19):2322-34. doi:10.1016/j.vaccine.2008.02.060.
158. Hoft DF, Eickhoff CS, Giddings OK, Vasconcelos JRC, Rodrigues MM. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic trypanosoma cruzi immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. *J Immunol.* 2007;179(10):6889-900. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6889.
159. Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS, Campetella O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun.* 2005;73(1):201-7. doi:10.1128/IAI.73.1.201-207.2005.
160. Pacini MF, González FB, Dinatale B, Bulfoni Balbi C, Villar SR, Farré C, et al. Nasal immunization with a *L. lactis*-derived trans-sialidase antigen plus c-di-AMP protects against acute oral *T. cruzi* infection. *Vaccine.* 2022;40(15):2311-23. doi:10.1016/j.vaccine.2022.02.071.
161. Prochetto E, Bontempi I, Rodeles L, Cabrera G, Vicco M, Cacik P, et al. Assessment of a combined treatment with a therapeutic vaccine and benznidazole for the *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Acta Trop.* 2022;229:106334. doi:10.1016/j.actatropica.2022.106334.

162. Bertona D, Pujato N, Bontempi I, Gonzalez V, Cabrera G, Gugliotta L, et al. Development and assessment of a new cage-like particle adjuvant. *J Pharm Pharmacol*. 2017;69(10):1293-303. doi:10.1111/jphp.12768.
163. Bontempi I, Fleitas P, Poato A, Vicco M, Rodeles L, Prochetto E, et al. Trans-sialidase overcomes many antigens to be used as a vaccine candidate against *Trypanosoma cruzi*. *Immunotherapy*. 2017;9(7):555-65. doi:10.2217/imt-2017-0009.
164. Prochetto E, Roldán C, Bontempi IA, Bertona D, Peverengo L, Vicco MH, et al. 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;8(35):58003-20. doi:10.18632/oncotarget.18217.
165. Magdesian MH, Giordano R, Ulrich H, Juliano MA, Juliano L, Schumacher RI, et al. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(22):19382-9. doi:10.1074/jbc.M011474200.
166. Teixeira AAR, de Vasconcelos V de CS, Colli W, Alves MJM, Giordano RJ. *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*. 2015;9(9):e0004099. doi:10.1371/journal.pntd.0004099.
167. Tonelli RR, Torrecilhas AC, Jacysyn JF, Juliano MA, Colli W, Alves MJM. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: The conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. *Parasitology*. 2011;138(4):481-92. doi:10.1017/S0031182010001411.
168. Gamba JC, Roldán C, Prochetto E, Lupi G, Bontempi I, Poncini CV, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells to enhance a trans-sialidase-based vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:671104. doi:10.3389/fcimb.2021.671104.
169. O'Connor MA, Rastad JL, Green WR. The role of myeloid-derived suppressor cells in viral infection. *Viral Immunol*. 2017;30(2):82-97. doi:10.1089/vim.2016.0125.
170. Tacke RS, Lee HC, Goh C, Courtney J, Polyak SJ, Rosen HR, et al. Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species. *Hepatology*. 2012;55(2):343-53. doi:10.1002/hep.24700.
171. Garg A, Spector SA. HIV type 1 gp120-induced expansion of myeloid derived suppressor cells is dependent on interleukin 6 and suppresses immunity. *J Infect Dis*. 2014;209(3):441-51. doi:10.1093/infdis/jit469.
172. Jiménez-Cortegana C, Sánchez-Jiménez F, Pérez-Pérez A, Álvarez N, Sousa A, Cantón-Bulnes L, et al. Low levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells may be a good marker of survival in the follow-up of patients with severe COVID-19. *Front Immunol*. 2021;12:801410. doi:10.3389/fimmu.2021.801410.

173. Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling R, Rieber N, Hartl D. Myeloid-derived suppressor cells in bacterial infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:37. doi:10.3389/fcimb.2016.00037.
174. Lawrence A. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) revaccination and protection against tuberculosis: A systematic review. *Cureus.* 2024;16(3):e56643. doi:10.7759/cureus.56643.
175. Martino A, Badell E, Abadie V, Balloy V, Chignard M, Mistou MY, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin vaccination mobilizes innate myeloid-derived suppressor cells restraining in vivo T cell priming via IL-1R-dependent nitric oxide production. *J Immunol.* 2010;184(4):2038-47. doi:10.4049/jimmunol.0903348.
176. Schrijver IT, Théroude C, Roger T. Myeloid-derived suppressor cells in sepsis. *Front Immunol.* 2019;10:327. doi:10.3389/fimmu.2019.00327.
177. Rieber N, Singh A, Öz H, Carevic M, Bouzani M, Amich J, et al. Pathogenic fungi regulate immunity by inducing neutrophilic myeloid-derived suppressor cells. *Cell Host Microbe.* 2015;17(4):507-14. doi:10.1016/j.chom.2015.02.007.
178. Lamsfus Calle C, Fendel R, Singh A, Richie TL, Hoffman SL, Kremsner PG, et al. Expansion of functional myeloid-derived suppressor cells in controlled human malaria infection. *Front Immunol.* 2021;12:625712. doi:10.3389/fimmu.2021.625712.
179. Stevenson MM, Valanparambil RM, Tam M. Myeloid-derived suppressor cells: The expanding world of helminth modulation of the immune system. *Front Immunol.* 2022;13:874308. doi:10.3389/fimmu.2022.874308.
180. Rosenbaum P, Tchitchek N, Joly C, Rodriguez Pozo A, Stimmer L, Langlois S, et al. Vaccine inoculation route modulates early immunity and consequently antigen-specific immune response. *Front Immunol.* 2021;12:645210. doi:10.3389/fimmu.2021.645210.
181. Fleming V, Hu X, Weber R, Nagibin V, Groth C, Altevogt P, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells to bypass tumor-induced immunosuppression. *Front Immunol.* 2018;9:398. doi:10.3389/fimmu.2018.00398.
182. Draghiciu O, Lubbers J, Nijman HW, Daemen T. Myeloid derived suppressor cells-an overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. *Oncoimmunology.* 2015;4(1):e954829. doi:10.4161/21624011.2014.954829.
183. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330-8. doi:10.1038/nrc1074.
184. Ghiringhelli F, Bruchard M, Apetoh L. Immune effects of 5-fluorouracil: Ambivalence matters. *OncoImmunology.* 2013;2(3):e23139. doi:10.4161/onci.23139.

185. Khosravianfar N, Hadjati J, Namdar A, Boghozian R, Hafezi M, Ashourpour M, et al. Myeloid-derived suppressor cells elimination by 5-fluorouracil increased dendritic cell-based vaccine function and improved immunity in tumor mice. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2018;17(1):47-55.
186. Borgna E, Gamba JC, Prochetto E, Marcipar I, Cabrera G. Simple protocol for measuring CD11b+ GR-1+ (Ly6C+/Ly6G+) myeloid cells from a minimum volume of mouse peripheral blood. *Methods Cell Biol*. 2024;184:59-68. doi:10.1016/bs.mcb.2024.01.001.
187. Toothaker LE. Review of: Nonparametric statistics for the behavioral sciences, 2nd ed., by Siegel S, Castellan NJ Jr. *Appl Psychol Meas*. 1989;13(2):217-9. doi:10.1177/014662168901300212.
188. Dunn OJ. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*. 1964;6(3):241-52. doi:10.1080/00401706.1964.10490181.
189. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol*. 1995;57(1):289-300. doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
190. Keppel G, Wickens TD. *Design and analysis: A researcher's handbook*. 4th ed. New York: Prentice Hall; 2004.
191. Ruxton GD, Neuhäuser M. When should we use one-tailed hypothesis testing? *Methods Ecol Evol*. 2010;1(2):114-7. doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00014.x.
192. Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst*. 1959;22(4):719-48.
193. Borgna E, Prochetto E, Gamba JC, Vermeulen EM, Poncini CV, Cribb P, et al. Control of myeloid-derived suppressor cell dynamics potentiates vaccine protection in multiple mouse models of *Trypanosoma cruzi* infection. *Front Immunol*. 2024;15:1484290. doi:10.3389/fimmu.2024.1484290.
194. Alcain J, Infante Cruz ADP, Barrientos G, Vanzulli S, Salamone G, Vermeulen M. Mechanisms of unconventional CD8 Tc2 lymphocyte induction in allergic contact dermatitis: Role of H3/H4 histamine receptors. *Front Immunol*. 2022;13:999852. doi:10.3389/fimmu.2022.999852.
195. Valanparambil RM, Tam M, Gros PP, Auger JP, Segura M, Gros P, et al. IRF-8 regulates expansion of myeloid-derived suppressor cells and Foxp3+ regulatory T cells and modulates Th2 immune responses to gastrointestinal nematode infection. *PLoS Pathog*. 2017;13(10):e1006647. doi:10.1371/journal.ppat.1006647.
196. Peereboom DM, Alban TJ, Grabowski MM, Alvarado AG, Otvos B, Bayik D, et al. Metronomic capecitabine as an immune modulator in glioblastoma patients reduces myeloid-derived suppressor cells. *JCI Insight*. 2019;4(22):e130748. doi:10.1172/jci.insight.130748.

197. Gamba JC. Estudios de la capacidad protectora de la formulación TSf-ISPA y del rol de las células supresoras de origen mieloide durante la infección por *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino [tesis]. Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral; 2022.
198. Cuervo H, Guerrero NA, Carbajosa S, Beschin A, De Baetselier P, Gironès N, et al. Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2011;187(5):2656-65. doi:10.4049/jimmunol.1002928.
199. Herreros-Cabello A, Callejas-Hernández F, Gironès N, Fresno M. *Trypanosoma cruzi*: Genomic diversity and structure. *Pathogens*. 2025;14(1):61. doi:10.3390/pathogens14010061.
200. Bizai ML, Romina P, Antonela S, Olivera LV, Arias EE, Josefina DC, et al. 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*. 2020;78:104128. doi:10.1016/j.meegid.2019.104128.
201. Callejas-Hernández F, Herreros-Cabello A, Poveda C, Maza MC, Mares JF, Santos-Peñaloza DK, et al. RNA sequence analysis in macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*: Focus on TLR2 and TLR7, iron metabolism, and extracellular matrix biosynthesis. *J Infect Dis*. 2025;231(6):e1102-13. doi:10.1093/infdis/jiaf074.
202. Hernández MA de, Villar SR, Cribb P. Progression of *Trypanosoma cruzi* Dm28c strain infection in a BALB/c mouse experimental model. *Parasitologia*. 2025;5(3):47. doi:10.3390/parasitologia5030047.
203. Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) through the implementation of a high-resolution melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors*. 2013;6:112. doi:10.1186/1756-3305-6-112.
204. Carrera-Silva EA, Cano RC, Guñazú N, Aoki MP, Pellegrini A, Gea S. TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *Mol Immunol*. 2008;45(13):3580-8. doi:10.1016/j.molimm.2008.05.004.
205. Medina-Buelvas DM, Rodríguez-Sosa M, Vega L. Characterisation of macrophage polarisation in mice infected with ninoa strain of *Trypanosoma cruzi*. *Pathogens*. 2021;10(11):1444. doi:10.3390/pathogens10111444.
206. Planelles L, Thomas MC, Marañón C, Morell M, López MC. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin Exp Immunol*. 2003;131(1):41-7. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02022.x.
207. Roggero E, Perez A, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol*. 2002;128(3):421-8. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01874.x.

208. Sanoja C, Carbajosa S, Fresno M, Gironès N. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One*. 2013;8(6):e65820. doi:10.1371/journal.pone.0065820.
209. Pellegrini A, Carrera-Silva EA, Arocena A, Cano RC, Aoki MP, Gea S. *Trypanosoma cruzi* antigen immunization induces a higher B cell survival in BALB/c mice, a susceptible strain, compared to C57BL/6 B lymphocytes, a resistant strain to cardiac autoimmunity. *Med Microbiol Immunol*. 2011;200(4):209-18. doi:10.1007/s00430-011-0192-3.
210. Guiñazú N, Pellegrini A, Giordanengo L, Aoki MP, Rivarola HW, Cano R, et al. Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2004;6(14):1250-8. doi:10.1016/j.micinf.2004.07.010.
211. Pacini MF, Perdomini A, Bulfoni Balbi C, Dinatale B, Herrera FE, Perez AR, et al. The high identity of the *Trypanosoma cruzi* Group-I of trans-sialidases points them as promising vaccine immunogens. *Proteins*. 2023;91(10):1444-60. doi:10.1002/prot.26537.
212. Dos Santos Virgilio F, Pontes C, Dominguez MR, Ersching J, Rodrigues MM, Vasconcelos JR. CD8(+) T cell-mediated immunity during *Trypanosoma cruzi* infection: A path for vaccine development? *Mediators Inflamm*. 2014;2014:243786. doi:10.1155/2014/243786.
213. Castro JT, Brito R, Hojo-Souza NS, Azevedo B, Salazar N, Ferreira CP, et al. ASP-2/Trans-sialidase chimeric protein induces robust protective immunity in experimental models of chagas' disease. *NPJ Vaccines*. 2023;8(1):81. doi:10.1038/s41541-023-00676-0.
214. Haolla FA, Claser C, de Alencar BCG, Tzelepis F, de Vasconcelos JR, de Oliveira G, et al. Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2009;27(41):5644-53. doi:10.1016/j.vaccine.2009.07.013.
215. Ferreira BL, Ferreira ÉR, de Brito MV, Salu BR, Oliva MLV, Mortara RA, et al. BALB/c and C57BL/6 mice cytokine responses to *Trypanosoma cruzi* infection are independent of parasite strain infectivity. *Front Microbiol*. 2018;9:553. doi:10.3389/fmicb.2018.00553.
216. Silva ACO, Bonfim M, Fontes JLM, Dos-Santos WLC, Mengel J, Cardillo F. C57BL/6 mice pretreated with alpha-tocopherol show a better outcome of *Trypanosoma cruzi* infection with less tissue inflammation and fibrosis. *Front Immunol*. 2022;13:833560. doi:10.3389/fimmu.2022.833560.
217. Bulfoni Balbi C, Pacini MF, Dinatale B, Farré C, Cacik P, Prochetto E, et al. Sexual dimorphism-driven differences are overcome in a preclinical vaccine model against *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol*. 2025;16:1526573. doi:10.3389/fimmu.2025.1526573.
218. Dumonteil E, Herrera C. Vaccines against chronic *Trypanosoma cruzi* infection: Progress, challenges and future directions. *Expert Rev Vaccines*. 2026;25(1):2632658. doi:10.1080/14760584.2026.2632658.

219. Rigato PO, de Alencar BC, de Vasconcelos JRC, Dominguez MR, Araújo AF, Machado AV, et al. Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8(+) T effector memory cells specific for a human parasite, *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2011;79(5):2120-30. doi:10.1128/IAI.01190-10.
220. Eickhoff CS, Vasconcelos JR, Sullivan NL, Blazevic A, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, et al. Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e983. doi:10.1371/journal.pntd.0000983.
221. Gupta S, Garg NJ. A two-component DNA-Prime/Protein-Boost vaccination strategy for eliciting long-term, protective T cell immunity against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2015;11(5):e1004828. doi:10.1371/journal.ppat.1004828.
222. Pulendran B, Li S, Nakaya HI. Systems vaccinology. *Immunity*. 2010;33(4):516-29. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.006.
223. Plotkin SA. Updates on immunologic correlates of vaccine-induced protection. *Vaccine*. 2020;38(9):2250-7. doi:10.1016/j.vaccine.2019.10.046.
224. De Alba-Alvarado M, Salazar-Schettino PM, Jiménez-Álvarez L, Cabrera-Bravo M, García-Sancho C, Zenteno E, et al. Th-17 cytokines are associated with severity of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in pediatric patients from endemic areas of Mexico. *Acta Trop*. 2018;178:134-41. doi:10.1016/j.actatropica.2017.11.009.
225. Rodríguez-Angulo H, Marques J, Mendoza I, Villegas M, Mijares A, Gironès N, et al. Differential cytokine profiling in chagasic patients according to their arrhythmogenic-status. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):221. doi:10.1186/s12879-017-2324-x.
226. Dutra WO, Menezes C a. S, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):377-87. doi:10.1111/pim.12107.
227. da Matta Guedes PM, Gutierrez FRS, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(2):e604. doi:10.1371/journal.pntd.0000604.
228. da Costa KM, Marques da Fonseca L, Dos Reis JS, Santos MAR da C, Previato JO, Mendonça-Previato L, et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a potential vaccine target against Chagas disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:768450. doi:10.3389/fcimb.2021.768450.
229. Harbour JC, Lyski ZL, Schell JB, Thomas A, Messer WB, Slifka MK, et al. Cellular and humoral immune responses in mice immunized with Vaccinia virus expressing the SARS-CoV-2 spike protein. *J Immunol*. 2021;206(11):2596-604. doi:10.4049/jimmunol.2100054.

230. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489-1501.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015.
231. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, et al. SARS-CoV-2 mrna vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*. 2020;586(7830):567-71. doi:10.1038/s41586-020-2622-0.
232. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol*. 2003;33(5-6):469-78. doi:10.1016/s0020-7519(03)00053-5.
233. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. 2004;82(5):488-96. doi:10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x.
234. Vázquez ME, Zabala BA, Mesías AC, Biscari L, Kaufman CD, Alloatti A, et al. Protective efficacy of the epitope-conjugated antigen N-Tc52/TSkb20 in mitigating Trypanosoma cruzi infection through CD8+ T-Cells and IFN γ responses. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(6):621. doi:10.3390/vaccines12060621.
235. Sanchez Alberti A, Bivona AE, Cerny N, Schulze K, Weißmann S, Ebensen T, et al. Engineered trivalent immunogen adjuvanted with a STING agonist confers protection against Trypanosoma cruzi infection. *NPJ Vaccines*. 2017;2:9. doi:10.1038/s41541-017-0010-z.
236. Aintablian A, Arold AM, Alattar H, Cyran L, Schoen C, Du Plessis N, et al. MDSC depletion during immunization with heat-killed Mycobacterium tuberculosis increases protection against BCG infection. *Front Immunol*. 2025;16:1646526. doi:10.3389/fimmu.2025.1646526.
237. Arevalillo JM, Sztein MB, Kotloff KL, Levine MM, Simon JK. Identification of immune correlates of protection in Shigella infection by application of machine learning. *J Biomed Inform*. 2017;74:1-9. doi:10.1016/j.jbi.2017.08.005.