

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

"USO TERAPÉUTICO DE LA FORMULACIÓN VACUNAL TRANSIALIDASA-ISPA DURANTE LA FASE CRÓNICA DE LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*"

Lic. Paula Inés Cacik

Director de Tesis: Dr. Iván Marcipar

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

-2026-

Agradecimientos

A mi director, Iván, por la confianza que depositó en mí desde el primer día. Le agradezco la libertad impagable que me dio para investigar y por ser un faro del conocimiento.

A todo el equipo del LTI, más que compañeros, una segunda familia. Son quienes sostienen en los peores momentos y logran que siempre vaya a trabajar con una sonrisa. En especial quiero agradecer a Estefi, por ser mi guía en el mundo científico, la primera en recibirme en el laboratorio y por enseñarme a trabajar con tanta paciencia, aun cuando tuve que preguntarle mil veces lo mismo. También a Ulises, por su entusiasmo y la paciencia que me tuvo en mi primera experiencia dirigiendo, y aguantar largos días en el laboratorio. Gracias por hacer que el trabajo sea tan llevadero.

A Ana Rosa, por su enorme amabilidad y el conocimiento que me brindó. También a Flopi, Cami, Bren y todas las chicas de IDICER, por recibirme siempre tan bien y por tanta ayuda en días largos de trabajo, pero muy provechosos. Gracias, sobre todo, por ser un gran equipo para lograr la publicación del paper.

A Valeria Tekiel, por sumarme a sus proyectos y recibirme como una integrante más en su casa. A Yamil, Maxi y Paula por su ayuda con los ratones y la enorme citometría que hicimos en UNSAM.

A Ana Sonzoni, por invitarme a formar parte de sus proyectos y contagiarme con su entusiasmo. A Michelle, Valentina y Eugenia por su ayuda con los ensayos bioquímicos.

A mi familia: mis papás, Lu, mis abuelas, mis tíos y primos, a todos, gracias por apoyar cada decisión que tomo y ser mi sostén.

A mis amigas, en especial a Ire, por siempre impulsarme a ir por más y soportar mis descargos después de días malos de trabajo.

A mi abuelo Juan Carlos, cuyo trabajo, sin que él lo supiera, resultó ser una inspiración y el origen de mi curiosidad por el tema de esta tesis.

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por permitirme realizar esta carrera, por ser mi casa tantos años y por defender siempre la educación pública.

A CONICET, por otorgarme la beca y presentarme al complicado pero sorprendente mundo científico.

Aportes científicos

- Prochetto E, Bontempo I, Rodeles L, Cabrera G, Vicco M, **Cacik P**, Pacini MF, Pérez Ganeselli M, Pérez AR, Marcipar I. Assessment of a combined treatment with a therapeutic vaccine and benznidazole for the *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Acta Trop. 2022 May;229:106334. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106334.
- Pacini MF, Bulfoni Balbi C, Dinatale B, Farré C, **Cacik P**, Gonzalez FB, Marcipar I, Pérez AR. Intranasal Trans-Sialidase Vaccine Mitigates Acute and Chronic Pathology in a Preclinical Oral Chagas Disease Model. Vaccines (Basel). 2024 Oct 15;12(10):1171. doi: 10.3390/vaccines12101171.
- Bulfoni Balbi C, Pacini MF, Dinatale B, Farré C, **Cacik P**, Prochetto E, González FB, Marcipar I, Cabrera G, Pérez AR. Sexual dimorphism-driven differences are overcome in a preclinical vaccine model against *Trypanosoma cruzi*. Front Immunol. 2025 Jun 26;16:1526573. doi: 10.3389/fimmu.2025.1526573.
- **Cacik P**, Pacini MF, Bulfoni Balbi C, Dinatale B, Diaz G, Cha U, Farré C, Ganeselli M, Prochetto E, Pérez AR and Marcipar IS (2025) Nasal vaccination against *Trypanosoma cruzi*: a dual approach for prevention and treatment of chronic Chagas cardiomyopathy. Front. Immunol. 16:1662036. doi: 10.3389/fimmu.2025.1662036

Índice

Agradecimientos	1
Aportes científicos	2
Abreviaturas y símbolos	8
Resumen.....	11
Abstract	13
INTRODUCCIÓN	15
I.1) Generalidades de la Enfermedad de Chagas	15
I.2) Agente Etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
I.3) Diversidad genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
I.4) Vías de transmisión	20
I.5) Fases de la Infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
I.6) Mecanismos inmunopatológicos de la Miocardiopatía Chagásica Crónica.....	25
I.7) Tratamiento actual.....	27
I.8) Vacunas terapéuticas.	29
I.9) Vacunas terapéuticas en infección por <i>T. cruzi</i>	30
I.10) Antecedentes de vacunas terapéuticas en Chagas	31
I.11) La familia trans-sialidasa.....	33
I.12) Fragmento amino-terminal como inmunógeno	36
I.13) Adyuvante basado en partículas inmunoestimulantes (ISPA)	37
I.13) Dinucleótido cíclico c-di-AMP como adyuvante mucosal.....	38
1.14) Vías de administración	38
Objetivos	41
Objetivo General:.....	41
Objetivos particulares:	41
Capítulo 1: Caracterización y validación de modelos parásito-huésped para el estudio de la miocardiopatía chagásica crónica	42
1.I) Introducción	43
1.II) Objetivos específicos.....	48
1.III) Métodos	49
1.III.1) Animales de experimentación	49
1.III.2) Parásitos	50

1.III.3) Infección	51
1.III.4) Evaluación de la parasitemia, peso, <i>score</i> clínico y supervivencia:.....	51
1.III.5) Histopatología	53
1.III.6) Evaluación electrocardiográfica	54
1.III.7) Enzimas y Biomarcadores Cardíacos y Hepáticos	55
1.III.8) Análisis estadístico	56
1.IV) Resultados	57
1.IV.1) Modelo de infección: C57BL/6-Dm28c.....	57
1.IV.1) a) Parasitemia, supervivencia y parámetros clínicos	57
1.IV.1) b) Histología	57
1.IV.1) c) Electrocardiografía	58
1.IV.1) d) Marcadores séricos de daño tisular	58
1.IV.2) Modelo de infección: C57BL/6-Tulahuen cl2.....	59
1.IV.2) a) Parasitemia, supervivencia y parámetros clínicos	59
1.IV.2) b) Histología	60
1.IV.2) c) Electrocardiografía	60
1.IV.2) d) Marcadores séricos de daño tisular / inflamación.....	61
1.IV.3) Modelo de infección: BALB/c-CL Brener	61
1.IV.4) Modelo de infección: BALB/c-Tulahuen vía oral.....	62
1.IV.4) a) Parasitemia, supervivencia y parámetros clínicos	62
1.IV.4) b) Histología	63
1.IV.4) c) Electrocardiografía	63
1.IV.4) d) Marcadores séricos de daño tisular	64
1.IV.5) Modelo de infección: BALB/c-Tulahuen cl2 vía intradérmico	65
1.IV.5) a) Parasitemia, supervivencia y parámetros clínicos	65
1.IV.5) b) Histología	66
1.IV.5) c) Electrocardiografía	66
1.IV.5) d) Marcadores séricos de daño tisular	67
1.V) DISCUSIÓN.....	69
Capítulo 2: Eficacia terapéutica comparada de la vacuna mucosal (TSNt–c-di-AMP) y sistémica (TSNt–ISPA) en modelos murinos de infección crónica por <i>T. cruzi</i>.	75
2.I) Introducción	76
2.II) Objetivos	80

2.III) Métodos	81
2.III.1) Animales de experimentación	81
2.III.2) Parásitos	81
2.III.4) Expresión y purificación del antígeno recombinante TSNT.....	82
2.III.5) Esquemas terapéuticos de vacunación	83
2.III.5) a) Modelo oral – Vacunación intranasal	83
2.III.5) b) Modelo intradérmico – Vacunación subcutánea	84
2.III.6) Histopatología	85
2.III.7) Cuantificación de la carga parasitaria	86
2.III.8) Evaluación electrocardiográfica	86
2.III.9) Enzimas y Biomarcadores Cardíacos y Hepáticos	87
2.III.10) Perfil de citocinas cardíacas por RT-qPCR.....	87
2.III.11) Detección de anticuerpos específicos en plasma	88
2.III.12) Análisis estadístico	88
2.IV) Resultados	90
2.IV.a) Modelo de infección oral y vacuna nasal: BALB/c-Tulahuen cl2. Evaluación Inmunológica del tratamiento terapéutico con TSNT-c-diAMP	90
2.IV.a.1) Daño cardíaco en la etapa crónica	90
2.IV.a.2) Carga parasitaria en tejido cardíaco	91
2.IV.a.3) Mediciones de ECG y análisis de arritmias	92
2.IV.a.4) Marcadores de daño histológico	93
2.IV.a.5) Perfiles de expresión de citocinas y factores de transcripción cardíacos en la fase crónica	93
2.IV.a.6) Respuesta de anticuerpos en la fase crónica	94
2.IV.b) Modelo de infección intradérmica y vacuna subcutánea: BALB/c-Tulahuen cl2. Evaluación Inmunológica del tratamiento terapéutico con TSNT-IPSA.....	96
2.IV.b.1) Daño cardíaco en la etapa crónica	96
2.IV.b.2) Carga parasitaria en tejido cardíaco.....	97
2.IV.b.3) Alteraciones electrocardiográficas.....	98
2.IV.b.4) Marcadores de daño histológico.....	99
2.IV.b.5) Respuesta humoral	100
2.V) Discusión	101
Capítulo 3: Estrategias quimio-inmunoterapéuticas: evaluación de esquemas combinados de la vacuna TSNT-IPSA y Benznidazol en la fase crónica	110

3.I) Introducción	111
3.II) Objetivos	117
3.II.a) Objetivo General	117
3.II.b) Objetivos Específicos	117
3.III) Métodos	118
3.III.1) Animales de experimentación	118
3.III.2) Parásitos	118
3.III.3) Infección	118
3.III.4) Obtención de los antígenos vacunales TSNT.....	118
3.III.5) Diseños experimentales.....	119
3. III.5) a) Diseño Experimental I: Tratamiento mixto en el modelo intradérmico	119
3. III.5) b) Diseño Experimental II: Optimización del esquema terapéutico en el modelo intradérmico	120
3. III.5) c) Diseño Experimental III: Implementación del esquema secuencial en el modelo intradérmico.	121
3.III.6) Histopatología	122
3.III.7) Cuantificación de la carga parasitaria	123
3.III.8) Electrocardiogramas.....	123
3.III.9) Enzimas y Biomarcadores Cardíacos y Hepáticos	123
3.III.10) Detección de anticuerpos específicos en plasma	124
3.III.11) Cuantificación de citocinas sistémicas.....	124
3.III.12) Cultivo celular y evaluación de la respuesta inmune por citometría de flujo	125
3.III.13) Análisis estadístico	126
3.IV) Resultados	127
3.IV.a) Diseño Experimental I: Tratamiento mixto en el modelo intradérmico	127
3.III.a.1) Evaluación del daño histopatológico tisular en la fase crónica.....	127
3.IV.a.2) Evaluación de la carga parasitaria en la etapa crónica	128
3.IV.a.3) Mediciones de ECG y análisis de arritmias	128
3.IV.a.4) Evaluación de biomarcadores de daño tisular	130
3.IV.a.5) Respuesta de anticuerpos tras el tratamiento.....	130
3.IV.a.6) Evaluación de citocinas séricas en la fase crónica.....	131
3.IV.b) Diseño Experimental II: Optimización del esquema terapéutico en el modelo intradérmico	132

3.IV.b.1) Evaluación de la carga parasitaria	132
3.IV.b.2) Evaluación de biomarcadores de daño tisular.....	133
3.IV.b.3) Respuesta de anticuerpos tras el tratamiento.....	134
3.IV.b.4) Análisis de la citometría de flujo	135
3.IV.4) c) Diseño Experimental III: Implementación del esquema secuencial en el modelo intradérmico	137
3.IV. c.1) Evaluación del daño histopatológico tisular en la fase crónica	137
3.IV.c.2) Evaluación de la carga parasitaria	138
3.IV.c.3) Mediciones de ECG y análisis de arritmias.....	139
3.IV.c.4) Respuesta de anticuerpos tras el tratamiento	140
3. IV.c.5) Análisis de la respuesta celular por citometría de flujo	142
3.V) Discusión	146
3.V.a) Diseño I	146
3.V.b) Diseño II.....	150
3.V.c) Diseño III	152
Conclusiones.....	161
Bibliografía	163
Anexo: Información complementaria	184

Abreviaturas y símbolos

α - Gal:	galactosa α 1,3 galactosa.
μ g:	microgramos.
μ l:	microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Anti-HT	Anticuerpos contra el homogenato de <i>T. cruzi</i> .
Anti-TS	Anticuerpos contra la proteína Trans-sialidasa.
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASP2	Proteína de superficie de amastigote 2
AUC	Área bajo la curva (del inglés <i>Area Under Curve</i>)
BCA	ácido bicinconínico
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
BENEFIT	Evaluación de benznidazol para interrumpir la tripanosomiasis
BSA	Albúmina sérica bovina
Bz	Benznidazol
c-di-AMP	Monofosfato de adenosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico
CCC	Cardiomopatía chagásica crónica
CDs	Células dendríticas
CK-MB	Creatina cinasa fracción MB (del inglés <i>Creatine Kinase</i>)
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño tisular (del inglés <i>Damage- Associated Molecular Pattern</i>)
DO	Densidad óptica
dpi	Días post-infección
DTUs	Unidades discretas de tipificación (del inglés <i>Discrete Typing Unites</i>)

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECG	Electrocardiograma
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
Fc	Frecuencia cardíaca
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética
GPT	Transaminasa glutámico pirúvica
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (del inglés <i>Human Leukocyte Antigens</i>)
H&E:	tinción hematoxilina-eosina
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IgG1	inmunoglobulina de tipo G subclase 1
IgG2a	inmunoglobulina de tipo G subclase 2a
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ISCOM	Complejo inmuno-estimulador (del inglés <i>Immune Stimulating Complexes</i>)
ISPA	Partículas inmunoestimulantes (del inglés <i>Immunostimulant Particles</i>)
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>Major histocompatibility complex</i>)
NK	Células asesinas naturales (del inglés <i>Natural Killer</i>)
NFX	Nifurtimox
ON	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (del inglés <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)

PBS	Solución salina con fosfato (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pi	post-infección
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés <i>Pathogen recognition receptors</i>)
qPCR	PCR en tiempo real (del inglés <i>quantitative PCR</i>)
QTc	QT corregido
ROS	Especies reactivas del oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI	Instituto Parque Memorial Roswell (del inglés <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RT-qPCR	Retrotranscripción seguida por PCR en tiempo real
SAPA	Antígenos de fase aguda (del inglés <i>Shed Acute Phase Antigen</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCR	Receptor de células T (del inglés <i>T Cell Receptor</i>)
TGF- β	Factor de crecimiento transformador beta (del inglés <i>Transforming growth factor beta</i>)
Th	Linfocitos T cooperadores (del inglés <i>T helper lymphocytes</i>)
Th1	Linfocitos T cooperadores de tipo 1 (del inglés <i>1 helper T lymphocytes</i>)
Th17	Linfocitos T cooperadores de tipo 17 (del inglés <i>17 helper T lymphocytes</i>)
Th2	Linfocitos T cooperadores de tipo 2 (del inglés <i>2 helper T lymphocytes</i>)
TLR	Receptores de tipo Toll (del inglés <i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés <i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>)
Treg	Linfocitos T reguladores (del inglés <i>regulatory T lymphocytes</i>)
TS	Trans-sialidasa

Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, continúa siendo una de las principales causas de miocardiopatía infecciosa en el mundo. El tratamiento actual se basa principalmente en fármacos tripanocidas como el benznidazol (Bz), cuya eficacia es notable en la fase aguda pero se ve drásticamente reducida durante la fase crónica, etapa en la cual la mayoría de los pacientes son diagnosticados. En este periodo, la persistencia parasitaria en nichos tisulares y una respuesta inmune desequilibrada conducen al desarrollo de la Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC), caracterizada por procesos de inflamación, fibrosis y alteraciones en el sistema de conducción eléctrica del corazón. Ante la limitada capacidad de las terapias actuales para revertir el daño tisular ya establecido y prevenir la progresión hacia la insuficiencia cardíaca, surge la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas integrales que combinen el control de la carga parasitaria con la modulación de la respuesta inmunológica del huésped.

El presente trabajo de tesis se estructuró en tres etapas experimentales consecutivas. La primera fase consistió en la optimización y selección de modelos de infección crónica, evaluando diferentes binomios de cepas de parásito y linajes murinos, así como distintas vías de inoculación (intradérmica y oral). El objetivo fue identificar un modelo que replicara las características clínicas y patológicas de la cronicidad humana.

En la segunda etapa, se evaluó la eficacia de una vacuna terapéutica basada en la proteína Trans-sialidasa (TS), administrada por vía nasal o subcutánea. Se analizó su capacidad para reducir la carga parasitaria, mitigar el daño histológico y revertir alteraciones electrocardiográficas en los modelos crónicos seleccionados. Finalmente, la tercera etapa exploró la sinergia quimio-inmunoterapéutica, integrando la vacuna TS con el fármaco benznidazol. En esta fase se ensayaron tres diseños experimentales: un esquema de referencia consistente en la inmunización seguida de un ciclo de 30 días de fármaco, una prueba de concepto con dosis acortadas de benznidazol para evaluar la modulación inmunológica, y un esquema secuencial que incorpora rondas con las dosis acortadas de benznidazol, intercaladas con la administración de la vacuna (Bz-TS-Bz³), diseñado para maximizar la eficacia terapéutica sobre parásitos en diferentes estados metabólicos y optimizar la respuesta celular.

La caracterización inicial determinó que los modelos basados en el binomio BALB/c - Tula-huen cl2 fueron los únicos adecuados para el estudio de la fase crónica, ya que los demás modelos evaluados presentaron una virulencia excesiva con alta mortalidad aguda o niveles de

infectividad insuficientes para el seguimiento. Dentro de la selección óptima, el modelo por vía intradérmica garantizó una infectividad del 100% con una supervivencia superior al 80%, permitiendo el desarrollo progresivo de alteraciones electrocardiográficas y daño tisular evaluables a largo plazo. Por su parte, el modelo por vía oral, a pesar de registrar una infectividad inicial menor, resultó ser más eficaz para inducir daño cardíaco específico y alteraciones eléctricas en el 60% de los animales evaluados.

En cuanto a la inmunización como monoterapia, la aplicación de TS-ISPA (subcutánea) o TS-c-di-AMP (nasal) logró reducciones significativas de la carga parasitaria en el tejido cardíaco. Histológicamente, estos grupos mostraron infiltrados inflamatorios leves y dispersos frente a la miocarditis moderada de los controles. Funcionalmente, la vacuna logró normalizar la onda P y reducir la incidencia de arritmias, aunque no fue suficiente para revertir el ensanchamiento del complejo QRS y el intervalo QTc ya consolidados en la fase crónica. Bioquímicamente, la vacuna nasal se destacó por la reducción del estrés oxidativo (Óxido Nítrico), mientras que la subcutánea fue más efectiva disminuyendo marcadores de daño miocárdico (CK-MB y GOT).

El hallazgo más destacado surgió de la combinación de terapias. En el Diseño I, el tratamiento mixto (TS+Bz¹) fue el único capaz de preservar de manera integral la arquitectura miocárdica y normalizar los niveles de TGF- β , superando a ambas monoterapias. El Diseño II demostró que incluso 7 días de Bz actúan como un potente modulador inmunológico, incrementando el número de linfocitos CD4⁺ y la capacidad citotóxica (CD107a) de los CD8⁺. Estos hallazgos permitieron diseñar el esquema secuencial (Bz-TS-Bz³) del Diseño III, el cual resultó ser la estrategia más eficaz de todas las evaluadas. Este protocolo logró reducir la carga parasitaria hasta niveles de indetectabilidad en algunos ejemplares y garantizó la mayor estabilidad eléctrica ventricular (normalización de QTc). A nivel mecanístico, se observó que la inmunoterapia reorienta la respuesta humoral, aumentando los anticuerpos específicos anti-TS y disminuyendo los anticuerpos contra antígenos totales del parásito (anti-HT) y autoanticuerpos cardíacos. El análisis por citometría de flujo reveló en este esquema un perfil celular polifuncional caracterizado por el aumento de TNF- α en CD8⁺ e IFN- γ en CD4⁺, bajo un control regulador mediado por el incremento de IL-10.

Abstract

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, remains one of the leading causes of infectious cardiomyopathy worldwide. Current treatment relies mainly on trypanocidal drugs such as Benznidazole (Bz), whose efficacy is notable in the acute phase but is drastically reduced during the chronic phase, the stage in which most patients are diagnosed. In this period, parasite persistence in tissue niches and an unbalanced immune response lead to the development of Chronic Chagasic Cardiomyopathy (CCC), characterized by inflammation, fibrosis, and alterations in the heart's electrical conduction system. Given the limited capacity of current therapies to reverse established tissue damage and prevent progression to heart failure, there is a need to develop comprehensive therapeutic strategies that combine parasite load control with the modulation of the host's immune response.

This thesis work was structured into three consecutive experimental stages. The first phase consisted of the optimization and selection of chronic infection models, evaluating different parasite strain and murine lineage pairs, as well as different inoculation routes (intradermal and oral). The goal was to identify a model that replicated the clinical and pathological characteristics of human chronicity.

In the second stage, the efficacy of a therapeutic vaccine based on the Trans-sialidase (TS) protein, administered via nasal or subcutaneous routes, was evaluated. Its capacity to reduce parasite load, mitigate histological damage, and reverse electrocardiographic alterations in the selected chronic models was analyzed. Finally, the third stage explored chemo-immunotherapeutic synergy by integrating the TS vaccine with the drug Benznidazole. In this phase, three experimental designs were tested: a reference scheme consisting of immunization followed by a 30-day drug cycle, a proof of concept with shortened doses of Benznidazole to evaluate immunological modulation, and a sequential scheme incorporating rounds of shortened Benznidazole doses interspersed with vaccine administration (Bz-TS-Bz³), designed to maximize therapeutic efficacy against parasites in different metabolic states and optimize the cellular response.

Initial characterization determined that models based on the BALB/c - Tulahuen cl2 pair were the only ones suitable for the study of the chronic phase, as the other models evaluated showed excessive virulence with high acute mortality or insufficient infectivity levels for follow-up. Within the optimal selection, the intradermal route guaranteed 100% infectivity with over 80% survival, allowing for the progressive development of electrocardiographic alterations and tissue

damage evaluable in the long term. For its part, the oral route, despite recording lower initial infectivity, proved more effective in inducing specific cardiac damage and electrical alterations in 60% of the animals evaluated.

Regarding immunization as monotherapy, the application of TS-ISPA (subcutaneous) or TS-c-di-AMP (nasal) achieved significant reductions in cardiac tissue parasite load. Histologically, these groups showed mild and scattered inflammatory infiltrates compared to the moderate myocarditis in controls. Functionally, the vaccine managed to normalize the P wave and reduce the incidence of arrhythmias, although it was not sufficient to reverse the widening of QRS complexes and the QTc interval already established in the chronic phase. Biochemically, the nasal vaccine stood out for reducing oxidative stress (Nitric Oxide), while the subcutaneous vaccine was more effective in decreasing markers of myocardial damage (CK-MB and GOT).

The most outstanding finding emerged from the combination of therapies. In Design I, the mixed treatment (TS+Bz¹) was the only one capable of comprehensively preserving myocardial architecture and normalizing TGF- β levels, surpassing both monotherapies. Design II demonstrated that even 7 days of Bz act as a potent immunological modulator, increasing the number of CD4⁺ lymphocytes and the cytotoxic capacity (CD107a) of CD8⁺ cells. These findings allowed for the design of the sequential scheme (Bz-TS-Bz³) in Design III, which resulted in the most effective strategy of all those evaluated. This protocol reduced the parasite load to undetectable levels in some subjects and guaranteed the greatest ventricular electrical stability (QTc normalization). Mechanistically, it was observed that immunotherapy reorients the humoral response, increasing specific anti-TS antibodies and decreasing antibodies against total parasite antigens (anti-HT) and cardiac autoantibodies. Flow cytometry analysis revealed in this scheme a profile characterized by the recovery of cytokine expression, specifically the increase of TNF- α in CD8⁺ and IFN- γ in CD4⁺ cells, under a regulatory control mediated by the increase of IL-10.

INTRODUCCIÓN

I.1) Generalidades de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una afección causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta patología ocupa un lugar singular en la historia de la medicina debido a que, en 1909, el científico brasileño Carlos Chagas logró identificar simultáneamente la nueva entidad clínica, su agente etiológico (Figura 1) y a los insectos triatominos como sus vectores de transmisión. El primer diagnóstico humano fue realizado el 14 de abril de 1909 en una paciente pediátrica llamada Berenice; en conmemoración de este hito científico, la Organización Mundial de la Salud estableció esa fecha como el Día Mundial de la Enfermedad de Chagas (1).

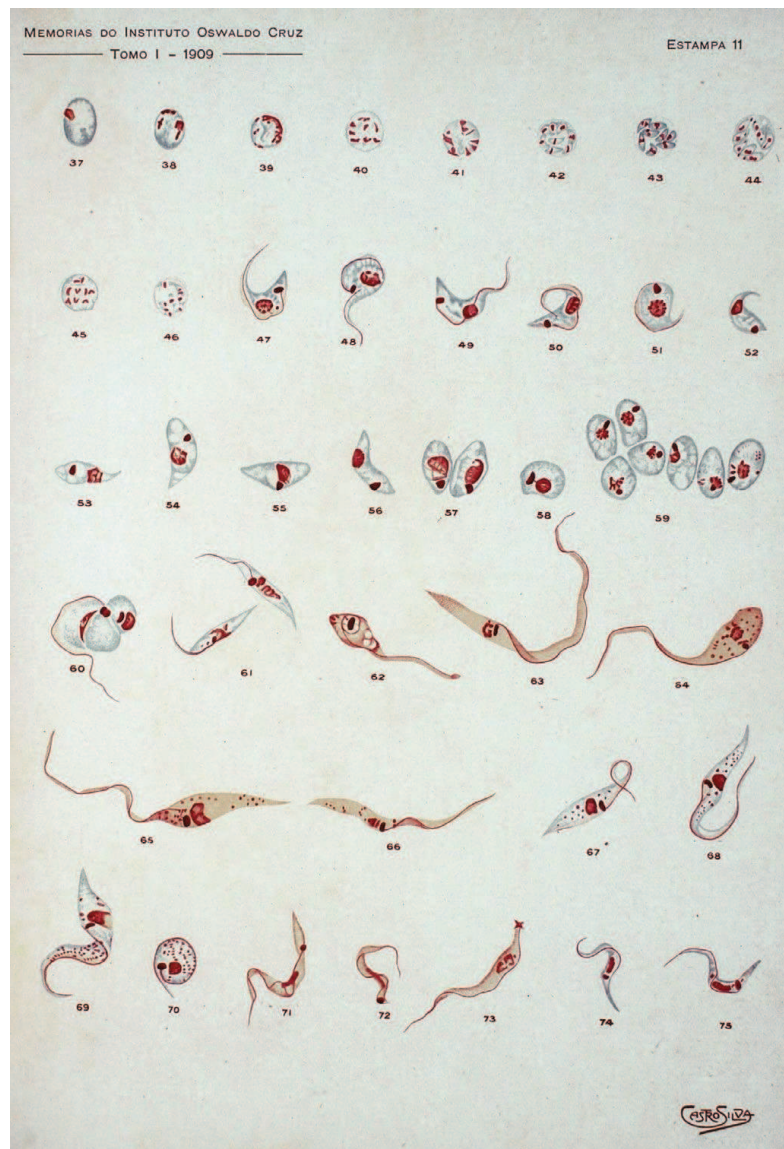


Figura 1: Reproducción de las ilustraciones originales realizadas por Castro Silva para la descripción de *T. cruzi* por Carlos Chagas en 1909 (2). Se observan los diferentes estadios de desarrollo del parásito en el hospedador invertebrado y vertebrado.

En la actualidad, esta afección es reconocida como una de las principales enfermedades tropicales desatendidas y constituye un complejo desafío de salud pública global. La Organización Mundial de la Salud estima que más de siete millones de personas se encuentran infectadas por *T. cruzi* en todo el mundo, provocando aproximadamente 10,000 muertes anuales, mientras que la población en riesgo de contraer la infección se calcula 100 millones de personas (3).

Aunque la enfermedad es endémica en 21 países de América Latina, donde la transmisión vectorial en zonas rurales ha sido históricamente la principal vía de contagio, la distribución del Chagas se ha globalizado (3). Debido a los flujos migratorios, la presencia de la enfermedad ha crecido de forma significativa en regiones no endémicas como América del Norte, Europa y el Pacífico Occidental. En estos contextos, la transmisión se mantiene a través de vías no vectoriales, como la transfusión sanguínea, el trasplante de órganos y la transmisión congénita (1,4). Esta dispersión geográfica y la magnitud de infección actual se detallan en la Figura 2.

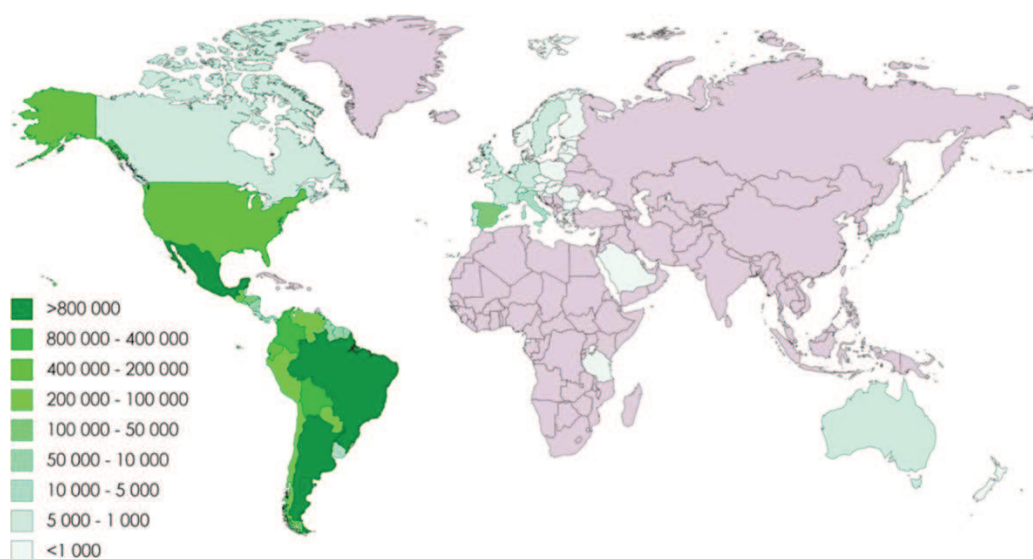


Figura 2: Distribución mundial estimada de casos de la enfermedad de Chagas. Adaptado de Martín-Escolano et al. (5). Basado en datos de la World Health Organization (2018).

I.2) Agente Etiológico: *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* y al orden *Kinetoplastida*. Se define como un parásito digenético (u heteroxeno), lo que significa que

requiere de dos tipos de hospedadores para completar su ciclo de vida: un invertebrado (insectos triatominos, conocidos como vinchucas o chinches) y un vertebrado (mamíferos, incluyendo al ser humano) (6).

Este parásito experimenta transformaciones biológicas que modifican drásticamente su estructura y metabolismo con el fin de asegurar su supervivencia y la continuidad de la infección en entornos tan dispares como el tracto digestivo de un insecto y el citoplasma de una célula de mamífero. Estas variaciones morfológicas se definen principalmente por la posición del cinetoplasto respecto al núcleo y la emergencia del flagelo, identificándose tres estadios evolutivos clave (6–8) (Figura 3).

El primero de ellos es el amastigote, una forma redondeada u ovoide que carece de flagelo externo y representa la fase de replicación intracelular en el hospedador vertebrado; su división binaria es la responsable de la proliferación en los tejidos y de la persistencia de la infección. Por otro lado, en el intestino medio del vector triatomo predomina el epimastigote, un estadio de cuerpo alargado y una gran actividad replicativa. Finalmente, el tripomastigote constituye la forma infectiva no replicativa, presente tanto en el mamífero como en el vector. Gracias a su cinetoplasto posterior y un flagelo prominente, esta forma posee la movilidad necesaria para la diseminación sistémica y la invasión de nuevas células, cerrando así el ciclo biológico del parásito (6,8).

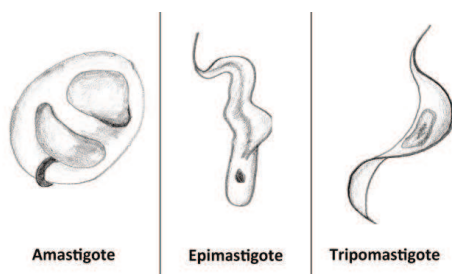


Figura 3: Representación de los estadios biológicos de *T. cruzi*. Diferenciación morfológica del agente etiológico de la enfermedad de Chagas: Amastigote, epimastigote y tripomastigote. Adaptado de Toso et al. (9)

El ciclo de vida de *T. cruzi* es un proceso biológico complejo que involucra a dos hospedadores y diversos estadios morfológicos y metabólicos. La infección en el mamífero se inicia cuando el vector triatomo, al alimentarse, deposita excretas que contienen tripomastigotes metacíclicos. Estas formas infectivas penetran a través de la picadura o mucosas y se unen a receptores en una amplia gama de células nucleadas, ingresando en una vacuola parasitófora. Tras escapar al citoplasma, el parásito completa su transformación a amastigote, para comenzar

una fase de proliferación activa por fisión binaria (6,8). La secuencia de estos eventos y los estadios involucrados se ilustran en la Figura 4.

Una vez que la célula hospedadora se satura de estas formas replicativas, los amastigotes se diferencian en tripomastigotes sanguíneos. Al liberarse, estos pueden invadir tejidos adyacentes o alcanzar el torrente sanguíneo y la linfa para diseminarse sistémicamente (6,8).

El ciclo se completa cuando un insecto triatomino ingiere tripomastigotes sanguíneos al succionar la sangre de un hospedador infectado. En el intestino medio del vector, el parásito se transforma en epimastigote, la principal forma replicativa en el invertebrado. Tras multiplicarse, estos migran hacia el intestino posterior, donde se adhieren a la cutícula intestinal para iniciar la metacicloogénesis. Este proceso da lugar nuevamente a los tripomastigotes metacíclicos, que serán expulsados en las deyecciones del insecto, reiniciando así el ciclo biológico (6,10).

Más allá de este ciclo convencional, investigaciones recientes han revelado que algunos amastigotes pueden entrar en un estado de quiescencia o dormancia, permaneciendo metabólicamente inactivos en los tejidos del mamífero. Esta subpoblación es capaz de resistir el tratamiento farmacológico y retomar su replicación espontáneamente, lo que representa un desafío crítico para lograr la cura estéril de la enfermedad y explica las recaídas clínicas (10,11).

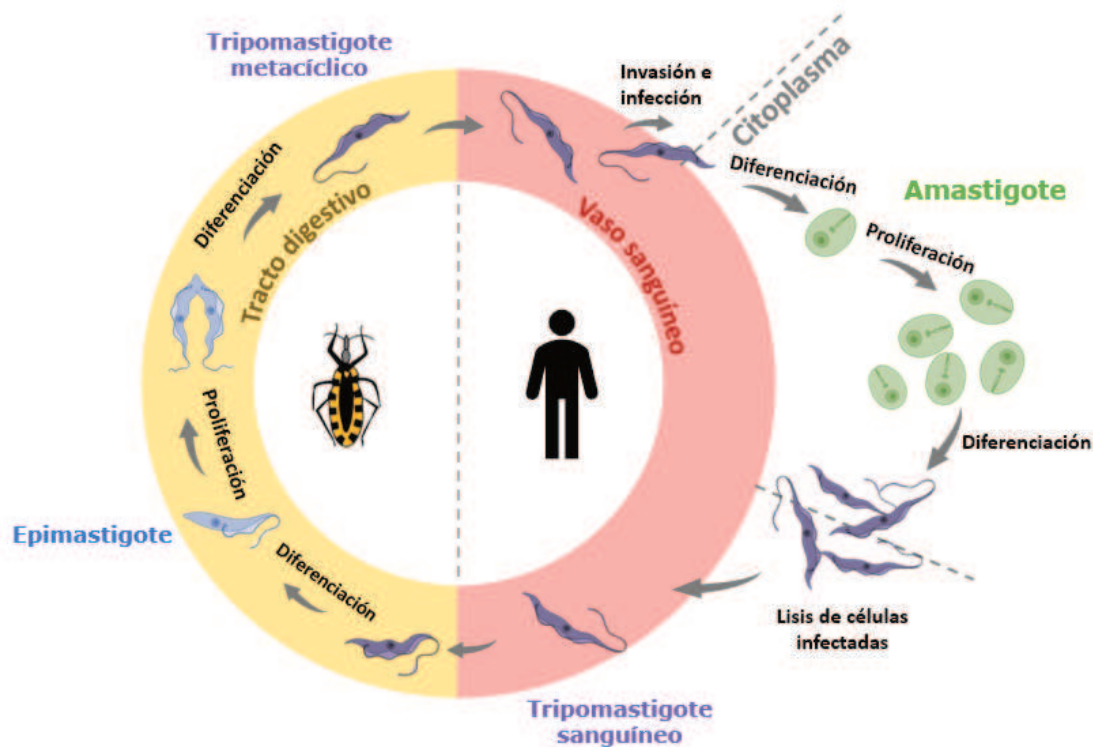


Figura 4: Ciclo de vida de *T. cruzi*. El esquema ilustra las etapas del parásito en el insecto triatomino y en el huésped mamífero (humanos). Se detallan las formas biológicas correspondientes: epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos en el vector, junto con amastigotes y tripomastigotes sanguíneos en el

mamífero. Adaptado de Dinatale et al. (12).

I.3) Diversidad genética de *Trypanosoma cruzi*

La extensa heterogeneidad biológica y genética de *T. cruzi* ha sido documentada ampliamente, reflejando una complejidad ecoepidemiológica que motivó, durante años, diversos intentos por definir subgrupos con relevancia biológica. Con el objetivo de estandarizar la nomenclatura y unificar criterios, en el año 2009 se celebró una reunión técnica (Segundo Satélite de Consenso, Brasil) donde un comité de expertos recomendó clasificar las cepas en seis Unidades de Tipificación Discreta (DTU), denominadas de TcI a TcVI, a las que posteriormente se sumó TcBat. El término DTU se define como un conjunto de aislados más relacionados genéticamente entre sí que con cualquier otro grupo y que pueden ser identificados mediante marcadores moleculares comunes. Es importante destacar que, aunque los parásitos dentro de una misma DTU son filogenéticamente cercanos, no son genéticamente idénticos, sino que constituyen familias de clones que han acumulado variaciones a través de su evolución (13,14).

Desde una perspectiva evolutiva, TcI y TcII se consideran linajes ancestrales que han evolucionado de forma independiente durante millones de años (15). Por el contrario, TcV y TcVI son híbridos naturales más recientes derivados de los linajes parentales TcII y TcIII (16).

La distribución geográfica y ecológica de estos linajes muestra patrones distintivos que son cruciales para entender la transmisión de la enfermedad (Figura 5). La DTU TcI es la más dispersa en el continente y predomina en los ciclos silvestres asociados a zarigüeyas y mamíferos arbóreos. En términos de salud humana, TcI es la causa principal de enfermedad de Chagas al norte de la cuenca del Amazonas y en Centroamérica, donde se asocia frecuentemente con la miocardiopatía (17,18). Por otro lado, los linajes TcII, TcV y TcVI prevalecen en el ciclo doméstico del Cono Sur y el Gran Chaco. Estos grupos están vinculados a las manifestaciones crónicas más graves, incluyendo tanto afecciones cardíacas severas como los megasíndromes digestivos (megaesófago y megacolon), que son comunes en Sudamérica pero raros en el norte (19). Además, se ha observado que TcV (y posiblemente TcVI) presenta una asociación notable con la transmisión congénita en países como Bolivia, Chile y Argentina (19,20).

Los linajes TcIII y TcIV se mantienen mayoritariamente en ciclos silvestres terrestres; TcIII tiene una asociación específica con armadillos, mientras que TcIV actúa como una causa secundaria de la enfermedad en Venezuela y se ha identificado en brotes de transmisión oral en la región amazónica. Finalmente, TcBat, aunque filogenéticamente cercano a TcI, se encuentra predominantemente en murciélagos y sus reportes en humanos son extremadamente raros (19,20).

La importancia de esta clasificación radica en su capacidad para guiar la investigación sobre la patogénesis, la ecoepidemiología y la comprensión de la compleja interacción entre el parásito y el hospedero. La variabilidad genética del parásito sigue siendo un factor determinante en el desenlace de la infección y un desafío constante para el desarrollo de nuevas estrategias de control y prevención (20).

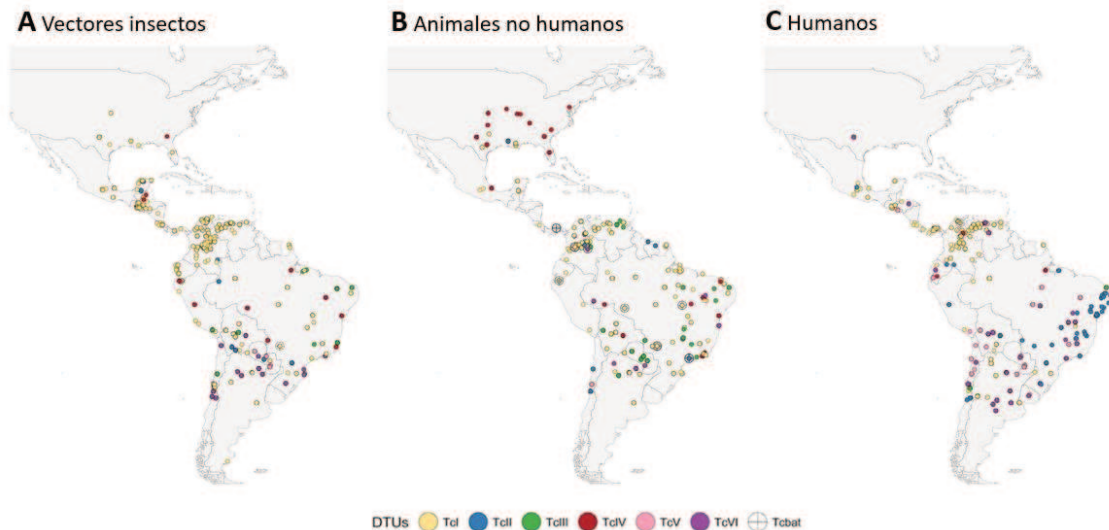


Figura 5: Distribución de las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) de *T. cruzi* en América. Se detalla la distribución identificada en vectores (**Panel A**), animales no humanos (**Panel B**) y humanos (**Panel C**). El tamaño y la forma de los símbolos son ilustrativos y no indican una ubicación geográfica exacta ni frecuencia debido al solapamiento de puntos. Adaptado de Cucunubá et al. (21).

I.4) Vías de transmisión

La propagación de *T. cruzi* a los hospedadores mamíferos ocurre a través de diversos mecanismos, siendo la interacción entre el parásito, el vector y el ambiente el factor determinante en la epidemiología de la enfermedad. Las principales rutas de infección y sus características generales se resumen en la Tabla 1.

Históricamente, la vía vectorial ha sido la más relevante. El parásito se transmite comúnmente a los seres humanos y otros mamíferos a través de chinches triatominos hematófagos de la familia Reduviidae, conocidos coloquialmente como vinchucas. De las más de 100 especies de Triatominae del Nuevo Mundo, la mayoría son importantes únicamente en el ciclo selvático de la enfermedad, mientras que solo algunas especies logran infestar las casas y actuar como vectores fundamentales en el ciclo doméstico. Entre las especies con mayor capacidad domiciliaria, las especies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus* son las de mayor relevancia para la transmisión en áreas endémicas,

siendo las dos primeras las que han recibido mayor atención científica (22).

Tanto las hembras como los machos son capaces de transmitir el parásito a lo largo de toda su vida. Además de los humanos, se conocen más de 100 mamíferos que actúan como reservorios naturales, incluyendo animales domésticos como perros y gatos, así como fauna silvestre compuesta por ratas, perezosos, armadillos y murciélagos. El parásito también puede propagarse internamente entre las poblaciones de insectos debido al comportamiento de canibalismo; por el contrario, se ha verificado que las aves y los reptiles no son portadores de *T. cruzi* (23).

La eficacia de estos vectores depende de una interacción compleja entre el parásito, cuya capacidad de invasión varía según la cepa genética; el insecto vector, que aporta su propio sistema inmune y microbiota intestinal como barreras o facilitadores; y por último el ambiente, que a través de la temperatura y la humedad regula tanto la velocidad de desarrollo del parásito como el comportamiento del insecto. En última instancia, la peligrosidad de especies como *T. infestans* radica en cómo estos tres factores convergen para que el insecto defeque inmediatamente después de alimentarse, asegurando así que las formas infectivas del parásito entren en contacto directo con el huésped humano (24,25).

En la actualidad, la transmisión vertical (de madre a hijo) de *T. cruzi* se ha consolidado como la principal fuente de nuevas infecciones en países no endémicos y en entornos urbanos o territorios latinoamericanos donde la transmisión por vectores y transfusiones está bajo control efectivo (26). En el año 2010, la OMS/OPS (27,28) estimó que aproximadamente 1.13 millones de mujeres en edad fértil estaban infectadas, lo que generaba cerca de 8,700 casos de Chagas congénito al año, aunque cifras más recientes de la OPS sugieren que la incidencia real alcanza al menos los 15,000 casos anuales en América Latina.

En cuanto al riesgo de transmisión, la probabilidad de transmisión de una madre infectada a su hijo suele oscilar generalmente entre el 1–2% y el 5–6%, y puede ser mayor en los países endémicos que en los no endémicos (29). En Argentina se reportó una tasa de transmisión del **6.6%** (30).

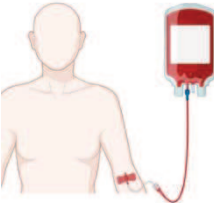
Estas marcadas diferencias en las tasas de infección podrían atribuirse a factores como la cepa del parásito, el estado inmunológico de las madres infectadas y factores placentarios. Asimismo, influyen las distintas metodologías utilizadas para la detección de casos congénitos en cada región. Actualmente, se considera que las altas cargas parasitarias en la sangre materna aumentan las probabilidades de contagio, mientras que el tratamiento de las mujeres antes del embarazo reduce significativamente este riesgo (31).

La transmisión oral de *T. cruzi* es significativamente más eficiente que la vía vectorial clásica y representa una fuente relevante de infecciones humanas, con brotes localizados reportados con una frecuencia cada vez mayor (21). Este mecanismo es frecuente en la fauna silvestre, afectando a mamíferos insectívoros que ingieren vectores infectados o a carnívoros que consumen presas portadoras del parásito. En los seres humanos, la infección ocurre principalmente por la ingesta de alimentos o bebidas contaminados con heces u orina de triatominos infectados, o por secreciones de zarigüeyas, aunque también puede deberse al consumo de carne o sangre cruda de mamíferos infectados (32–34). A diferencia de las infecciones por vía vectorial, que son mayoritariamente asintomáticas, las infecciones orales suelen ser clínicamente más evidentes, graves y letales debido a las elevadas cargas parasitarias ingeridas (35,36).

Históricamente, la transmisión de *T. cruzi* asociada a transfusiones causó decenas de miles de nuevas infecciones anuales hasta principios de la década de 1990. En la actualidad, esta vía se encuentra bajo control en los países endémicos gracias a la implementación del screening obligatorio (37,38). Sin embargo, el enorme volumen de donaciones y la prevalencia de la infección entre los donantes implican que el screening aún podría omitir unidades infectadas (37). Por otro lado, la transmisión mediante trasplante de órganos sólidos o médula ósea desde donantes crónicos es un mecanismo documentado que puede causar cuadros graves o reactivaciones por inmunosupresión, especialmente en receptores de corazón (39). Esta problemática se extiende a regiones no endémicas (como EE. UU. y Europa) donde los casos documentados por transfusión y trasplante podrían ser superiores al reportado debido al gran flujo de inmigrantes procedentes de áreas endémicas de América Latina (31).

Tabla 1: Principales vías de transmisión de *T. cruzi*. Adaptada de Ferreira et al. (4)

Vía	Mecanismo	Regiones predominantes	Información	Impacto en la salud pública
Vectorial 	Heces de triatominos infectados contaminan la piel o las mucosas	Rural de América Latina	Prevalencia > 6% en Bolivia; éxito del control en el Cono Sur, pero con aumento de la resistencia a insecticidas	Sigue siendo un factor determinante de la carga crónica; riesgo de reemergencia

Oral 	Comida o bebida contaminada	Amazonia	>70% de los casos agudos en la Amazonia; brotes de hasta más de 100 casos; letalidad del 10–35%.	Enfermedad aguda agresiva (miocarditis fulminante, inflamación sistémica)
Vertical 	Madre a hijo (transplacental)	Bolivia, Brasil, Paraguay, Colombia, migrantes en España, Italia, EEUU	8.000–15.000 casos/año; 1–10% de transmisión; 5–7% en migrantes bolivianos/brasileños	Casi 100% curable si se detecta tempranamente; objetivo de eliminación de la OMS para 2030
Transfusional 	Sangre contaminada	Riesgo en EEUU y Europa sin screening	Screening ampliamente implementado en países endémicos; irregular en otros.	Riesgo esporádico donde el screening es inconsistente.
Trasplante 	Donantes de órganos infectados	EEUU, España, Italia, Suiza, Japón	Casos aislados, a menudo subestimado	Alta mortalidad en personas inmunosuprimidas si no se detecta
Transmisión silvestre 	Contacto con vectores infectados o reservorios	Sur de EEUU, cuenca Amazónica, Gran Chaco y otras regiones endémicas rurales de América Latina	Vectores silvestres infectados y perros/gatos; casos humanos raros.	Preocupación zoonótica emergente; el cambio climático podría expandir el riesgo.

1.5) Fases de la Infección por *Trypanosoma cruzi*

Comúnmente se acepta que el curso clínico de la enfermedad de Chagas se divide en una fase aguda y una fase crónica. La progresión de los síntomas, la transición hacia la cronicidad y la cinética de la parasitemia a lo largo del tiempo se representan esquemáticamente en la Figura 6. Durante la fase aguda, cuando se desarrollan síntomas, estos suelen ser leves e inespecíficos, por lo que con frecuencia se confunden con una infección viral, a menos que esté presente un

signo clínico característico de la infección, como la inflamación en el sitio de la picadura del insecto (*chagoma*) o el edema periorbitario secundario a la infección conjuntival (*signo de Romana*) (31). En esta etapa, el parásito suele ser detectable en sangre durante un período de 2 a 4 meses mediante visualización directa por microscopía óptica; posteriormente, su detección se realiza principalmente a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (40,41). Las manifestaciones clínicas de la fase aguda se resuelven espontáneamente en aproximadamente el 90% de los individuos infectados (31).

Tras la fase aguda, los individuos infectados ingresan a la fase crónica asintomática, también denominada fase indeterminada (40). En esta etapa, la infección se caracteriza por una parasitemia baja y persistente, por lo que su detección se realiza mediante métodos indirectos que detectan la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, requiriéndose habitualmente la combinación de al menos dos ensayos serológicos diferentes (como ELISA, inmunofluorescencia indirecta o hemaglutinación indirecta) (40). Desde el punto de vista clínico, esta fase se define por la seropositividad frente a *T. cruzi*, electrocardiograma normal y estudios radiológicos normales de tórax, esófago y colon (31). Esta fase puede extenderse durante años o décadas y, en la mayoría de los casos, los individuos permanecen asintomáticos de por vida, sin evidencia clínica de disfunción orgánica (41). No obstante, se han descrito alteraciones histopatológicas subclínicas, como inflamación y fibrosis compatibles con miocarditis, aun en ausencia de signos o síntomas clínicos evidentes (40).

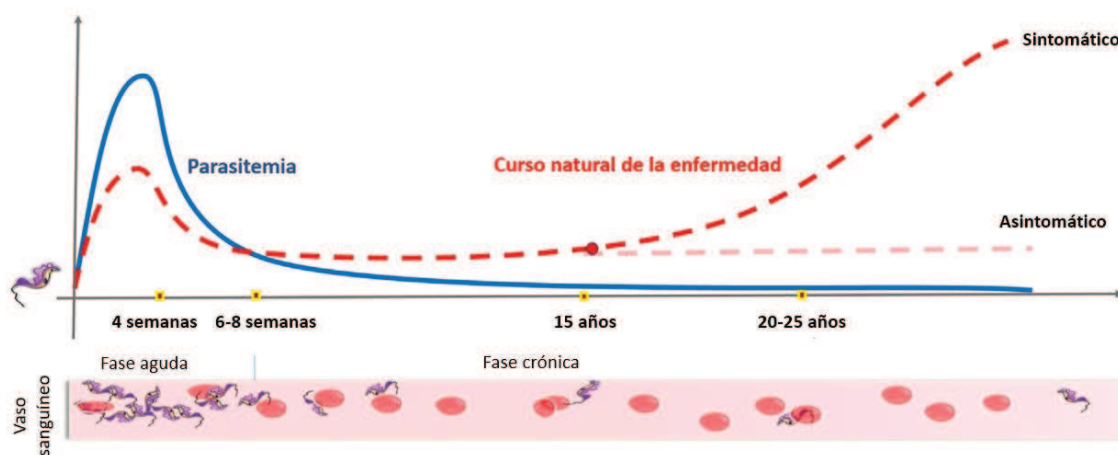


Figura 6: Representación esquemática de las fases de la enfermedad de Chagas. Se ilustra la progresión de los síntomas desde la fase aguda hasta la cronicidad sintomática o asintomática y la cinética de la parasitemia en el torrente sanguíneo a lo largo del tiempo. Adaptado de De Bona et al. (42).

Aproximadamente el 30% de los individuos infectados progresa, décadas después, desde la fase indeterminada hacia la fase crónica clínica de la enfermedad (31,41,43). Dentro de estas formas,

la miocardiopatía chagásica constituye la manifestación más relevante debido a su alta frecuencia de desarrollo (20–30% de los infectados), así como a su gravedad y mortalidad asociadas. Se trata de una entidad compleja que abarca un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde alteraciones miocárdicas mínimas hasta disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, miocardiopatía dilatada, arritmias, eventos tromboembólicos e insuficiencia cardíaca terminal (41).

Además del compromiso cardíaco, la enfermedad de Chagas puede afectar otros órganos, incluyendo el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso. Las formas digestivas de la enfermedad se observan aproximadamente en el 10% de los pacientes infectados (41,44).

Los factores que determinan la progresión de la enfermedad y el desarrollo de daño en órganos no se encuentran completamente dilucidados. Sin embargo, dicha progresión se ha asociado con múltiples variables, entre ellas la predisposición genética del hospedador, el área geográfica, la vía de infección (vertical, oral, entre otras), el estado de inmunosupresión, la presencia de enfermedades crónicas concomitantes y diversos factores desencadenantes, como la edad, el sexo masculino, el consumo de alcohol, la persistencia de una parasitemia elevada y la gravedad de la infección durante la fase aguda (40).

I.6) Mecanismos inmunopatológicos de la Miocardiopatía Chagásica Crónica

Durante la etapa aguda, la lesión miocárdica está estrechamente vinculada al tropismo del parásito por el tejido muscular cardíaco, resultando en un daño causado por la rotura mecánica de las células infectadas, la liberación de desechos metabólicos y la consecuente atracción de células inflamatorias (40). Aunque la respuesta inmune adaptativa logra reducir drásticamente la carga parasitaria y disminuir la inflamación inicial, devolviendo el tejido a un estado de aparente normalidad, se establece una lesión progresiva subyacente (41). El pensamiento científico actual sostiene que el daño orgánico extensivo en la fase crónica sintomática, donde los parásitos son casi indetectables, se explica mediante la persistencia parasitaria en formas latentes o su liberación esporádica desde otros reservorios orgánicos (40). Esta presencia constante del parásito actúa como un estímulo antigénico que mantiene procesos inflamatorios indolentes de bajo grado a lo largo de los años (41).

Una de las hipótesis planteadas para explicar la patogénesis sugiere que el potente estímulo antigénico, sumado al mimetismo molecular, podría romper la autotolerancia y desencadenar

una respuesta autoinmune (42). Aunque se ha demostrado la presencia de autoanticuerpos IgG que reaccionan con el endocardio (45–47), todavía no está claro el peso real que tiene este componente en el desarrollo de la enfermedad. Por ello, el consenso actual se inclina al daño tisular mediante la persistencia parasitaria; esta presencia constante del parásito mantiene encendida una respuesta inmune que, al intentar eliminar los restos del patógeno, genera un daño colateral ininterrumpido en el hospedador (40,41,48–50). En pacientes con síntomas clínicos graves, este infiltrado inflamatorio se compone principalmente de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺; estos últimos, en estadios avanzados, suelen exhibir fenotipos agotados que limitan su capacidad efectora. Asimismo, la progresión de la miocarditis se asocia a una respuesta inmunitaria sesgada hacia un perfil de tipo TH1, potenciada en parte por una deficiencia en la función supresora de las células T reguladoras (49).

Este entorno proinflamatorio se ve agravado por un desequilibrio de citocinas, donde la reducción de mediadores reguladores como la IL-10 y el incremento de factores como TNF- α e IFN- γ aceleran la remodelación negativa del órgano (40). Esta inflamación prolongada provoca la destrucción progresiva de las fibras miocárdicas, cuya pérdida es compensada mediante una fibrosis reparativa que desorganiza la matriz extracelular. A su vez, este proceso se ve potenciado directamente por el parásito, que al infectar fibroblastos y cardiocitos, activa la vía de señalización STAT3, promoviendo la liberación de citocinas profibróticas como TGF- β (regulador maestro de la fibrosis) e IL-6. Este estímulo directo induce la transformación de fibroblastos en miofibroblastos, los cuales aumentan la producción de mediadores fibróticos como el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas-D (PDGF-D). En consecuencia, la fibrosis miocárdica surge de la convergencia de dos procesos sinérgicos: la destrucción de fibras por el infiltrado inflamatorio y la activación molecular directa de las rutas de síntesis de colágeno (49). La interacción de estos mecanismos celulares y moleculares en el tejido cardíaco se detalla en la Figura 7. Finalmente, esta remodelación estructural deriva en la hipertrofia y dilatación del corazón, lo que termina por alterar la capacidad de bombeo y la estabilidad eléctrica, conduciendo progresivamente a la insuficiencia cardíaca y otras secuelas clínicas graves (40,41,49).

A diferencia de este proceso degenerativo, se postula que la preservación de la función cardíaca depende de una respuesta inmune equilibrada (TH1/TH2/TH17) capaz de controlar la carga parasitaria limitando la inflamación y la fibrosis. Esta respuesta consistiría en un aumento de células efectoras CD8⁺ y productoras de IFN- γ junto con CD4⁺ productoras de IL-17, para promover mecanismos de eliminación del parásito. En paralelo, el incremento de células T reguladoras (productoras de IL-10) modula la inflamación y reduce el daño tisular (49).

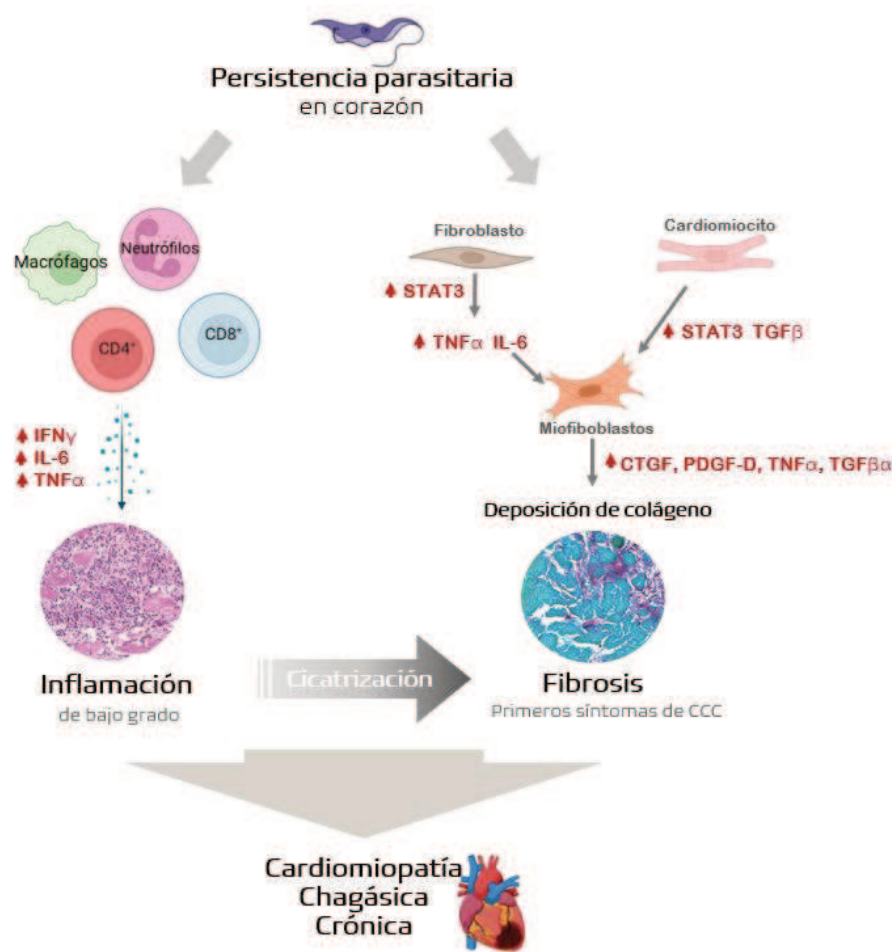


Figura 7: Mecanismos inflamatorios y fibróticos de la miocardiopatía chagásica crónica. Imagen creada con BioRender, adaptada de Jones et al. (49)

I.7) Tratamiento actual

Actualmente, el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas se limita a dos fármacos nitroheterocíclicos: el benznidazol (BZ) y el nifurtimox (NFX) (43) (Figura 8). El benznidazol, un derivado del nitroimidazol, se considera la terapia de primera línea debido a que presenta una base de evidencia de eficacia más amplia y un perfil de seguridad superior en comparación con el nifurtimox (40,43).

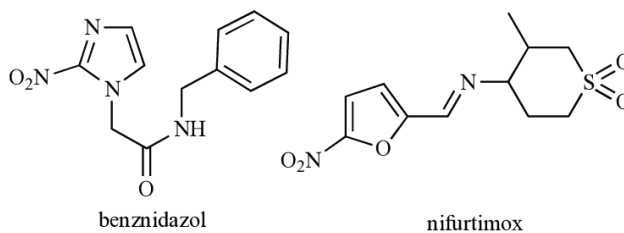


Figura 8: Estructura química de benznidazol y nifurtimox.

A nivel molecular, el BZN actúa como un profármaco; es decir, es inicialmente inactivo y requiere ser metabolizado por las enzimas nitro-reductasas del propio parásito para transformarse en su forma citotóxica activa. Esta activación genera metabolitos reactivos que provocan daños críticos en proteínas, lípidos y en la síntesis de ADN y ARN del *T. cruzi*. Asimismo, inhiben el sistema de defensa antioxidante del parásito, aumentando su susceptibilidad al daño oxidativo (51). Además se ha observado que el tratamiento con BZ modula la respuesta de los linfocitos T específicos contra el parásito. Según Laucella et al. (52,53), la reducción de la carga parasitaria tras el tratamiento permite la restauración del sistema inmune, aumentando la frecuencia de células T de memoria temprana y restaurando la capacidad efectora de los linfocitos, lo cual es fundamental para el control de la infección a largo plazo. Sin embargo, la efectividad de este proceso se ve amenazada por fenómenos de resistencia multifactorial, vinculados tanto a la variabilidad genética de las cepas de *T. cruzi* como a deficiencias en la absorción del fármaco por alteraciones en la permeabilidad intestinal del huésped (54,55).

La relevancia clínica del tratamiento varía según el estadio de la enfermedad. En la fase aguda y en los casos asociados a transmisión vertical, se observa una elevada respuesta terapéutica, con tasas de curación cercanas al 100% (56). Sin embargo, la contraindicación del benznidazol durante la gestación desplaza la intervención al período neonatal, donde el tratamiento puede ser implementado de manera segura (43).

Por el contrario, la eficacia terapéutica decae de forma crítica al entrar en la fase crónica avanzada. El estudio multicéntrico BENEFIT incluyó a 2854 pacientes con miocardiopatía chagásica establecida. En esta investigación, los participantes provenientes de diversos centros de América Latina, recibieron benznidazol o un placebo durante un periodo de hasta 80 días y fueron evaluados durante un seguimiento promedio de 5.4 años. Este ensayo reveló que, si bien el tratamiento redujo significativamente la carga parasitaria en suero, no logró detener la progresión de la miocardiopatía ni disminuir la mortalidad (57).

Junto a la limitada eficacia clínica en adultos, el otro aspecto negativo crítico del BZ es su elevado perfil de toxicidad. El fármaco presenta una clara dependencia de la edad: mientras que los niños pequeños muestran una buena tolerancia, en los adultos las reacciones adversas son mucho más frecuentes y severas (58). Se estima que hasta un 18% de los pacientes adultos abandonan el tratamiento debido a efectos adversos (36). El efecto adverso más frecuente es la dermatitis alérgica, que afecta al 20-30% de los pacientes y suele remitir con antihistamínicos (56,58). Otros efectos incluyen trastornos gastrointestinales (5%) y reacciones más severas relacionadas con la dosis acumulada, como la neuropatía periférica y, en casos raros, la supresión de la médula ósea (leucopenia o neutropenia) (40).

I.8) Vacunas terapéuticas.

Las enfermedades infecciosas crónicas representan un desafío creciente para la salud pública global. Debido a que estas patologías se caracterizan por una progresión gradual y síntomas persistentes, imponen una carga socioeconómica significativa y una disminución considerable en la calidad de vida de los pacientes. El requisito de tratamientos a largo plazo y el manejo constante de complicaciones no solo agotan los recursos de los sistemas de salud, sino que perpetúan el impacto humano y social de estas afecciones (59–61).

Ante este escenario, la necesidad de desarrollar vacunas terapéuticas se fundamenta en las deficiencias críticas que enfrentan los enfoques farmacológicos actuales. En primer lugar, la eficacia de los fármacos se ve gravemente comprometida por el aumento global de patógenos con resistencia adquirida, lo que reduce las opciones terapéuticas disponibles. En segundo lugar, su utilidad disminuye significativamente en las fases avanzadas de las enfermedades crónicas. Esto ocurre porque muchos patógenos logran establecer infecciones persistentes al refugiarse dentro de los tejidos o integrar su información genética en el huésped. Estas estrategias de supervivencia los vuelven prácticamente inalcanzables para la acción química directa de los medicamentos convencionales (62).

Como alternativa a estos enfoques surge el concepto de vacuna terapéutica. Aunque actualmente no existe un consenso universal sobre su definición exacta, esta puede comprenderse mejor al compararla con la vacunación profiláctica tradicional y los tratamientos químicos. Mientras que estas últimas se administran a individuos sanos con el fin de prevenir la enfermedad mediante la activación anticipada del sistema inmunitario, las vacunas terapéuticas se aplican en pacientes con una infección ya confirmada. Es crucial distinguir este enfoque de los tratamientos farmacológicos generales. A diferencia de los fármacos, que dependen de un contacto químico directo para eliminar al patógeno, las vacunas terapéuticas no curan la patología por sí mismas. Su propuesta representa un cambio de paradigma: busca estimular y regular el sistema inmunitario del paciente para que este pueda reconocer al patógeno persistente, bloquee los daños de la infección y desencadene un proceso curativo (63).

El objetivo biológico de estas vacunas varía según la naturaleza del patógeno: en ciertos escenarios, se busca la erradicación total del agente infeccioso, mientras que en enfermedades crónicas donde el patógeno logra la integración genómica en el huésped o establece reservorios de difícil eliminación, el enfoque se desplaza hacia el control de los síntomas y la mitigación de las condiciones patológicas. En este contexto, Woo et al. (59) proponen una redefinición integradora para el campo de las enfermedades infecciosas, describiéndolas como vacunas

administradas tras la infección con el objetivo de estimular el sistema inmunitario y bloquear el desarrollo de complicaciones derivadas de una infección persistente. Bajo esta premisa, se entiende que incluso cuando no se logra una inmunidad esterilizante, las vacunas terapéuticas conservan un valor clínico significativo. Su capacidad para aliviar los síntomas y frenar la progresión de la patología reside en la modulación de los patrones de respuesta inmune, promoviendo un nuevo equilibrio homeostático entre el patógeno y el hospedador.

En términos de investigación actual, este campo avanza mediante la exploración de diversas plataformas (como vectores virales, vacunas de ADN, proteínas recombinantes y ARNm), con desarrollos que van desde fases tempranas de seguridad, como ocurre con el virus de Epstein-Barr, hasta candidatos en etapas clínicas más avanzadas para el virus del papiloma humano (64–66). No obstante, la investigación en esta área aún se encuentra relativamente subdesarrollada en comparación con la vacunología profiláctica. Esto se debe, en gran medida, a la complejidad intrínseca de los mecanismos de persistencia de los patógenos crónicos y a la ausencia de criterios de evaluación y estándares de eficacia unificados que permitan verificar de manera consistente la respuesta inmunológica inducida. Establecer estos sistemas de evaluación es, por tanto, un paso crítico para consolidar su aplicación clínica definitiva (59).

I.9) Vacunas terapéuticas en infección por *T. cruzi*

En este marco, la infección por *T. cruzi* constituye un contexto adecuado para la vacunación terapéutica, dado que la mayoría de los pacientes son diagnosticados en la fase crónica, cuando la eficacia farmacológica es limitada. Ante esta dificultad para alcanzar una cura definitiva, el objetivo de la inmunización en esta etapa no se orienta estrictamente a la erradicación parasitaria, sino a una estrategia integral que logre detener la progresión de la enfermedad (67,68).

Considerando que en esta fase el parásito establece reservorios de difícil acceso en diferentes tejidos, incluyendo el miocardio, resulta fundamental que la vacuna sea capaz de modular la respuesta inmunitaria hacia un perfil protector y equilibrado. Esta necesidad radica en que el daño orgánico no solo se debe a la persistencia del patógeno, sino también a una respuesta inmune desequilibrada caracterizada por un proceso inflamatorio crónico (69). De este modo, el enfoque terapéutico se centra en bajar la carga parasitaria para detener la injuria directa y, simultáneamente, en mitigar dicha inflamación. Al abordar ambos factores, es posible lograr una disminución efectiva del daño tisular, preservando así la funcionalidad orgánica y mejorando el pronóstico del paciente.

Los criterios establecidos para el diseño de un candidato ideal a vacuna contra *T. cruzi* exigen que el antígeno posea una alta inmunogenicidad y se encuentre altamente conservado entre las diferentes cepas del parásito. Asimismo, resulta esencial que el inmunógeno se exprese en los estadios presentes en el hospedador mamífero —amastigote y tripomastigote— y que constituya una molécula crucial para el patógeno, funcionando como un blanco eficaz para la acción de anticuerpos neutralizantes (70).

En este sentido, las estrategias terapéuticas deben optimizar la combinación entre el antígeno seleccionado, el adyuvante y la vía de administración, considerando incluso su posible sinergia con tratamientos antiparasitarios. El desarrollo de una vacuna eficaz contra *T. cruzi* requiere no solo un inmunógeno adecuado, sino también un adyuvante capaz de potenciar la respuesta inmune y dirigirla hacia un perfil protector (70). Diversas formulaciones proteicas que incorporan agonistas de TLR4 (como MPLA, GLA o E6020) han demostrado resultados prometedores en modelos experimentales de infección aguda y crónica; estas han logrado reducir la parasitemia al promover respuestas de tipo Th1 con una elevada producción de IFN- γ , lo que se traduce en una disminución significativa de la inflamación y de la fibrosis cardíaca (70,71).

Por otra parte, la respuesta frente a la infección presenta una marcada complejidad a nivel de la clínica humana, donde la variabilidad es tal que aproximadamente solo un 30% de los individuos infectados progresa hacia la fase crónica sintomática (31,41,43). Esta marcada variabilidad en la presentación de la patología y la ausencia de síntomas en la mayoría de los pacientes infectados introducen una dificultad intrínseca adicional para evaluar de manera consistente los resultados de cualquier intervención clínica.

Más allá de estas particularidades clínicas, la inmunización con fines terapéuticos se consolida actualmente como una prioridad mayor respecto del enfoque profiláctico. Mientras que evaluar una vacuna preventiva en humanos conlleva severas limitaciones éticas y logísticas debido a la baja frecuencia de nuevos casos por el control de vectores y a los extensos períodos requeridos para monitorizar la aparición de síntomas, la estrategia terapéutica resulta metodológicamente más factible al dirigirse a poblaciones ya identificadas y diagnosticadas (72,73).

I.10) Antecedentes de vacunas terapéuticas en Chagas

Hasta el momento, los estudios de vacunación terapéutica en la enfermedad de Chagas son muy escasos en comparación con los enfoques profilácticos, y se limitan a un número reducido de antígenos y plataformas vacunales.

La mayoría de estas estrategias utilizan, como antígenos vacunales, proteínas clave en el ciclo de vida del parásito y en su interacción con el hospedador. Entre ellas se incluyen ASP2, una proteína de superficie expresada predominantemente en amastigotes pero también presente en tripomastigotes y estadios de transición (74); Tc24, una proteína de membrana involucrada en la unión al calcio y esencial para la supervivencia del parásito (75–77); fragmentos no virulentos de TSA-1, un antígeno de superficie perteneciente a la familia de las trans-sialidasas, fundamental para los procesos de invasión celular y evasión inmunológica (78–80); y la trans-sialidasa, una enzima de superficie considerada un factor de virulencia central que permite al parásito adquirir ácido siálico del hospedador (74,81). Asimismo, se han evaluado proteínas modificadas para reducir su virulencia, como la cruzipaina, la principal cisteín-proteasa de *T. cruzi*, implicada en la replicación parasitaria y en la interacción con las células del hospedador (82).

En los últimos años, se han explorado diversas plataformas vacunales con fines terapéuticos, incluyendo vacunas de ADN (78–80,82), vectores virales (74), subunidades proteicas recombinantes (75) y, más recientemente, vacunas basadas en ARN mensajero (76). Una compilación de estas estrategias aplicadas durante la etapa crónica de la infección se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2: Avances en inmunoterapia contra *T. cruzi*: compilación de estrategias vacunales aplicadas en etapa crónica de la infección. Se excluyen aquellos trabajos que utilicen esquemas de inmunización en la fase aguda.

Tipo de vacuna	Antígeno	Adyuvante	Modelo experimental (animal - <i>T. cruzi</i>)	Resultados principales	Referencia
DNA	TSA-1	-	CD1- H1	Reduce pero no logra eliminar parásitos Reduce daño tisular	Dumonteil et al. 2004 (78)
DNA	TSA-1	-	ICR – H1	↓ Daño de tejido cardíaco y parasitemia ↑ CD4, CD8 y CD8+IFN-γ+	Zapata-Estrella et al. 2006 (80)
DNA	TSA-1 + Tc24	Fosfato de aluminio	Balb/c y C57BL/6 – H1	↓ Inflamación cardíaca ↑ CD4+IFN-γ+ y CD8+IFN-γ+ específicos en bazo. ↑ CD4 y CD8 en corazón	Limon Flores et al. 2010 (79)
DNA+ protein boost	TcG2 + TcG4	-/saponina	C57BL/6 – Sylvi0x10/4	Reducción mayor a 15 veces de parásitos en sangre y tejido → control miocarditis crónica	Gupta et al. 2015 (83)

Adenoviral	ASP2 + TS	-	C57BL/6 - Colombian	↓ Carga parasitaria, injuria cardíaca y anomalías eléctricas ↑ CD8, relación IFN-γ/IL-10	Pereira et al. 2015 (84)
DNA desnudo / Salmonella	Cruzipaina	plásmido que codifica para GM-CSF	C3H/HeN - RA	Previno el daño tisular y la patología orgánica, ↓ niveles de enzimas de daño muscular	Cerny et al. 2015 (85)
Subunidad proteica	Tc24	E6020	ICR – H1	Parasitemia indetectable ↓ Fibrosis cardíaca Rta inmune TH1	Barry et al. 2019 (75)
DNA	Cruzipain chagasin	plásmido que codifica para GM-CSF	C3H/HeN - RA	↑ Ac específicos Respuesta celular robusta con secreción de IFN-γ que disminuye el daño tisular	Cerny et al 2020 (86)
DNA	TSA-1 + Tc24	Fosfato de aluminio	rhesus macaques - Y	Prevención de alteraciones en ECG. ↓ inflamación en colon y ganglios linfáticos mesentéricos	Dumonteil et al. 2022 (87)
Subunidad proteica	Tc24-C4 TSA1-C4	MPLA	Perros naturalmente infectados	↓ carga parasitaria, baja alteraciones ECG. ↑ Respuesta T específica ↓ respuesta innata inflamatoria	Calderón-Quintal et al. 2025 (88)

Ac: anticuerpos. ECG: electrocardiograma

I.11) La familia trans-sialidasa

La superfamilia de las Trans-sialidasas (TS y TS-like) de *T. cruzi* constituye un amplio sistema de proteínas altamente antigénicas, capaces de inducir una sólida respuesta humoral en el hospedador (89). Debido a esta elevada inmunogenicidad, varios de sus miembros han sido seleccionados como candidatos para el desarrollo de vacunas contra la enfermedad de Chagas, tales como TSA-1 (90,91), ASP-1, ASP-2 (92) y CRP (93), entre otros.

Actualmente, la superfamilia de las trans-sialidasas se clasifica en ocho subgrupos (GI-GVIII), definidos por la similitud de sus secuencias, sus propiedades funcionales y la presencia o ausencia de motivos altamente conservados, tales como la caja ASP (SxDxGxxW), el motivo VTV (VTVxNVxLYNR) y el motivo FRIP (xRxP). A pesar de esta vasta diversidad, únicamente las proteínas pertenecientes al Grupo I (TS-GI) poseen la actividad enzimática de trans-sialidasa y/o neuraminidasa que da nombre a la familia (89,94).

Estructuralmente, la mayoría de los miembros del Grupo I se organizan en dos regiones

principales: un dominio catalítico N-terminal y un extremo C-terminal que contiene una serie de repeticiones de 12 aminoácidos denominadas SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*) (95).

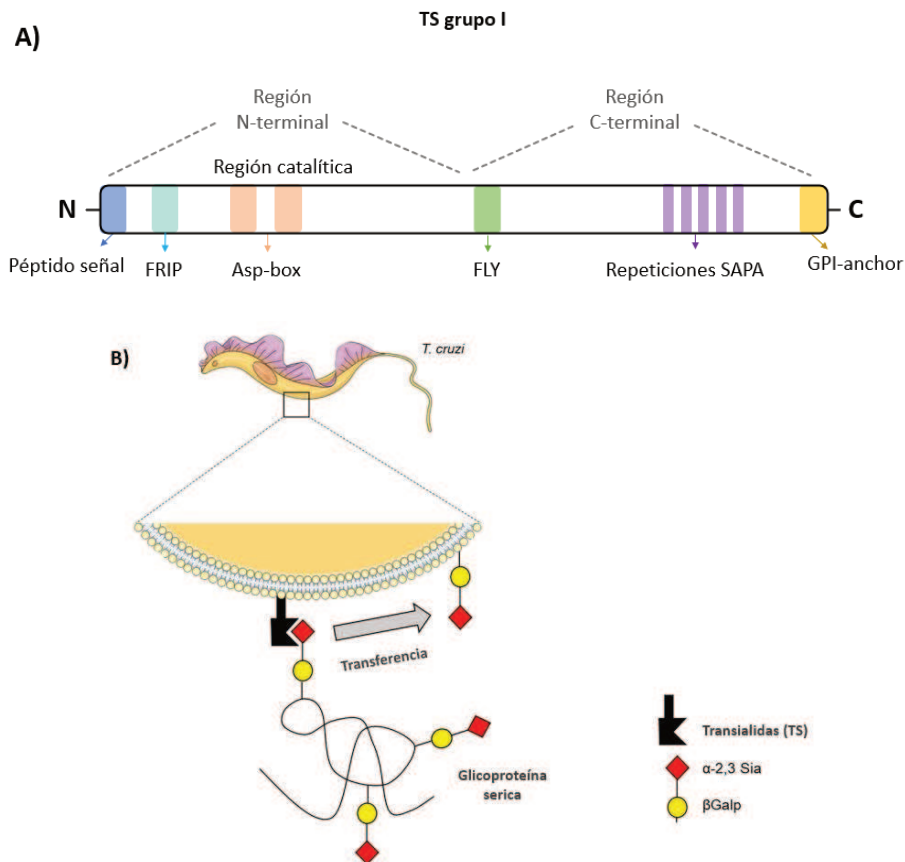


Figura 9: Estructura de la trans-sialidasa de *T. cruzi*. **A)** Esquema representativo de la estructura primaria de miembros de la TS de tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos, pertenecientes al Grupo I (TS-activa). Adaptado de Nardy et al. (96) **B)** Esquema de la transferencia de residuos de ácido siálico (α -2,3 Sia) desde las sialoglicoproteínas séricas hacia las unidades de galactosa (β Galp) en la superficie del parásito, mediada por la enzima trans-sialidasa. Adaptado de Da Costa et al. (97)

La Trans-sialidasa (TS) de *T. cruzi* se identifica primordialmente como una glicoproteína de superficie anclada a la membrana del parásito mediante una unión glicofosfatidilinositol (GPI) (97).

Más allá de su rol estructural, esta molécula se define como una enzima multitarea y polifacética que combina, en un solo polipéptido, actividades de lectina, sialidasa y sialiltransferasa. Su mecanismo central de acción es la trans-sialilación, una función mediante la cual la TS captura residuos de ácido siálico de las glicoproteínas del hospedador y los transfiere selectivamente hacia las mucinas presentes en la superficie del parásito. Este proceso es vital para la supervivencia del patógeno, ya que al no poder sintetizar ácido siálico *de novo*, depende de esta actividad enzimática para adquirirlo de su entorno (98).

La adquisición de este carbohidrato le permite al parásito conformar un escudo protector superficial. Esta barrera es esencial para evitar la lisis mediada por el sistema del complemento y para garantizar su supervivencia mientras circula en el torrente sanguíneo. Al revestirse con moléculas propias del hospedador, el parásito logra pasar desapercibido, facilitando su tránsito hacia las células diana que finalmente infectará (97).

La TS es considerada el principal factor de virulencia de *T. cruzi* debido a su capacidad de ser liberada al torrente sanguíneo (*shedding*). Esta liberación le permite actuar de forma sistémica, manipulando el patrón de sialilación de diversas células del hospedador como linfocitos, eritrocitos y plaquetas. Esta actividad no solo provoca alteraciones hematológicas, sino que desregula la respuesta inmunitaria del hospedador, interfiriendo con su capacidad de control y facilitando así la persistencia de la infección (97–99).

A pesar de no participar directamente en la actividad catalítica de la TS, el dominio SAPA desempeña un rol biológico perjudicial al actuar como un mecanismo de persistencia y evasión inmune que favorece al parásito. Por un lado, estas repeticiones extienden la vida media de la enzima en el torrente sanguíneo, prolongando los efectos sistémicos nocivos de la TS; por otro lado, su extrema inmunogenicidad funciona como un señuelo distractivo que desvía la respuesta inmunitaria(98). Al presentar epítopes B inmunodominantes, el dominio SAPA induce una producción masiva de anticuerpos no protectores que, a diferencia de los dirigidos al sitio catalítico N-terminal, son incapaces de neutralizar la actividad enzimática. Esta estrategia evolutiva evita que el sistema inmune genere una defensa eficaz, manteniendo una alerta constante pero inútil contra regiones distantes del sitio activo (100).

Debido a su rol biológico esencial, la TS se ha consolidado como un blanco terapéutico y vacunal prometedor. Una de las ventajas estratégicas más significativas de esta enzima es que no posee una contraparte funcional en los mamíferos, lo que permite el diseño de intervenciones específicas con un bajo riesgo de toxicidad o reacciones cruzadas para el hospedador (98).

Asimismo, su relevancia como candidato vacunal se ve reforzada por su elevada inmunodominancia. Lejos de ser solo una herramienta metabólica, la TS actúa como un potente antígeno capaz de inducir una respuesta masiva y robusta de linfocitos T CD8⁺, componentes celulares críticos para el control de la carga parasitaria en los tejidos (97,99,101).

Finalmente, la conservación genética de las regiones catalíticas entre las diversas cepas de *T. cruzi* ofrece una ventaja estratégica crucial para el diseño de vacunas. Esta idoneidad de la TS como blanco universal se ve respaldada por evidencias genómicas recientes. Según Pacini et al. (102), a pesar de la vasta heterogeneidad de la familia de las trans-sialidasas, las variantes del

Grupo-I mantienen una identidad de secuencia superior al 95% entre los diferentes linajes del parásito.

Este alto grado de identidad se traduce en una estabilidad estructural notable, donde tanto la arquitectura tridimensional de los centros catalíticos como los puntos de reconocimiento para el sistema inmune (epítomos) permanecen prácticamente idénticos en las diversas versiones de la enzima. Esta constancia en los dominios críticos no solo simplifica la complejidad de esta familia multigénica, sino que refuerza la selección de la TS como un inmunógeno universal. De este modo, es capaz de conferir una protección cruzada sólida y resolver el desafío histórico que representa la variabilidad biológica del parásito en el desarrollo de vacunas (102).

I.12) Fragmento amino-terminal como inmunógeno

Considerando la complejidad estructural de la TS y la necesidad de dirigir la respuesta inmunitaria hacia las regiones más críticas del parásito, en el presente trabajo se seleccionó como antígeno un fragmento del extremo N-terminal de la proteína. Esta decisión estratégica se fundamenta en que dicho fragmento alberga el dominio catalítico de la enzima, el cual es esencial para el proceso de trans-sialilación y la posterior evasión del sistema del complemento. El uso de este fragmento busca dirigir la respuesta inmunitaria hacia los sitios activos más conservados del Grupo-I y al mismo tiempo evitar las repeticiones inmunodominantes del extremo C-terminal (dominio SAPA), dado que podrían actuar como distractores inmunológicos (100). De este modo, este antígeno recombinante simplificado se presenta como una herramienta optimizada para inducir una protección confiable y universal contra la infección por *T. cruzi*.

La elección de este fragmento N-terminal de la TS se sustenta, además, en los antecedentes del grupo de investigación, donde diversos trabajos previos han evaluado este inmunógeno con resultados prometedores. Estas investigaciones han demostrado que el uso del dominio catalítico recombinante es capaz de inducir una respuesta inmune protectora, logrando reducciones significativas en la carga parasitaria y una mejora en la supervivencia en modelos experimentales (81,103–106).

La consistencia de estos hallazgos previos posiciona a este fragmento como un candidato sumamente robusto. Este abordaje permite analizar la reproducibilidad y solidez del efecto terapéutico de la vacuna en escenarios biológicos distintos, aportando información clave sobre la aplicabilidad y el alcance de esta estrategia inmunomoduladora frente a la infección crónica por *T. cruzi*.

La eficacia terapéutica fue evaluada mediante distintos parámetros, incluyendo la detección de carga parasitaria, el análisis histopatológico y, en menor medida, estudios funcionales cardíacos. Sin embargo, la heterogeneidad en los modelos experimentales y en los criterios de evaluación dificulta la comparación directa entre estudios.

En este contexto, en la presente tesis doctoral se propuso evaluar la eficacia de una vacuna terapéutica basada en la trans-sialidasa en modelos de infección crónica seleccionados, considerando parámetros parasitológicos y de daño cardíaco.

I.13) Adyuvante basado en partículas inmunoestimulantes (ISPA)

Los complejos ISCOM (*Immune Stimulating Complexes*) son adyuvantes particulados con una morfología característica de "jaula" (*cage-like*) de aproximadamente 40 nm, compuestos por una combinación de saponina Quil-A, colesterol y fosfolípidos. Su relevancia radica en la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria equilibrada Th1 y Th2, combinando la vía humoral con una fuerte activación celular citotóxica. Esta respuesta, difícil de obtener con adyuvantes convencionales, es esencial para el control de patógenos intracelulares y ha permitido su aplicación exitosa en diversas vacunas veterinarias registradas (107). Sin embargo, los diseños tradicionales presentan una elevada densidad de carga negativa en su superficie, lo que puede limitar la asociación electrostática con antígenos que posean una carga similar.

Las partículas inmunoestimulantes ISPA (108) (de las siglas en inglés *Immunostimulating Particle*) representan un adyuvante de estructura lipídica en forma de cajas vacías (*cage-like*), similar al ISCOMATRIX, desarrollado en el laboratorio como una alternativa económica y libre de detergentes a los sistemas ISCOMATRIX™ tradicionales. Su composición integra la saponina Quil-A, colesterol, fosfolípidos (dipalmitoil-fosfatidilcolina) y tocoferol, este último incorporado por su rol dual como antioxidante e inmunoestimulante. Una característica distintiva de su diseño es el logro de una baja densidad de carga negativa, significativamente menor que en diseños de partículas similares (ISCOM); esta propiedad es crucial para reducir la repulsión electrostática y favorecer la interacción con antígenos que presentan carga negativa (108,109).

Evaluaciones a largo plazo han demostrado que estas partículas conservan su integridad estructural y su potencia inmunogénica durante al menos seis meses bajo condiciones de refrigeración estándar. En modelos murinos, la formulación de ISPA con la enzima TS ha demostrado una eficacia excepcional tanto en estrategias profilácticas (105,110–112) como terapéuticas (81) contra *T. cruzi*, logrando un 100% de supervivencia frente al desafío parasitario. Este éxito se fundamenta en su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria

más homogénea entre individuos y equilibrada, caracterizada por un fuerte perfil Th1 (relación IgG2a/IgG1 > 1) y una potente activación de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ , elementos esenciales para el control efectivo de este patógeno intracelular.

1.13) Dinucleótido cíclico c-di-AMP como adyuvante mucosal

El adenosín monofosfato cíclico dimérico (c-di-AMP) es un segundo mensajero producido por bacterias y arqueas que regula diversos procesos biológicos. Esta molécula destaca por su potente actividad inmunológica, especialmente cuando se administra por vía mucosa (113).

Su mecanismo principal consiste en activar la inmunidad innata al unirse directamente al receptor STING en el retículo endoplásmico. Esta interacción activa una vía de señalización independiente de los receptores tipo Toll (TLR). Como resultado, se induce la expresión de IFN- β y de diversas citocinas inflamatorias. A nivel celular, el c-di-AMP actúa como promotor de la maduración de células dendríticas, incrementando la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) y del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II). Esta activación desencadena una respuesta adaptativa integral que incluye la producción de IgA secretora local y un perfil celular mixto Th1, Th2 y Th17. Asimismo, favorece la generación de linfocitos T citotóxicos y células T de memoria de larga duración (114).

En especial, el c-di-AMP se utiliza ampliamente en el desarrollo de vacunas mucosales, donde su eficacia ha sido comprobada en diversos trabajos (103,115–118). La administración intranasal de este adyuvante no solo induce protección en el sitio de aplicación, sino que también estimula respuestas en compartimentos mucosales distantes (incluyendo secreciones vaginales, pulmonares e intestinales). Al generar una respuesta en diversos puntos de entrada, el c-di-AMP ayuda a establecer una barrera defensiva inmediata que bloquea el avance de posibles infecciones (119,120).

1.14) Vías de administración

La robustez y el perfil de la inmunidad generada dependen estrechamente de la vía de administración seleccionada, ya que cada sitio de inoculación presenta un microambiente inmunológico único. Diversos estudios han demostrado que la vía de inmunización influye directamente en la respuesta biológica debido a las diferencias en la biodisponibilidad del antígeno y en la capacidad de reclutamiento de las células presentadoras de antígenos (121). En

este sentido, la elección de la ruta de administración no solo determina la magnitud de la respuesta, sino también su calidad y localización, factores determinantes para alcanzar los objetivos terapéuticos en la infección por *T. cruzi*.

La vía subcutánea constituye una de las rutas más utilizadas y estudiadas en la vacunación convencional, debido a su perfil de seguridad, simplicidad técnica y amplia experiencia acumulada en programas de inmunización (121,122). Esta vía consiste en la administración del antígeno en el tejido adiposo localizado entre la dermis y el músculo, un compartimento caracterizado por una vascularización relativamente pobre en comparación con el músculo esquelético. Como consecuencia, la absorción del antígeno hacia la circulación sistémica ocurre de manera más lenta y prolongada, lo que puede favorecer una exposición sostenida del sistema inmune al inmunógeno (122).

Desde el punto de vista inmunológico, la vía subcutánea es eficaz para la inducción de respuestas inmunes sistémicas; sin embargo, presenta ciertas limitaciones en términos de inmunogenicidad cuando se la compara con otras rutas de administración. En particular, el tejido subcutáneo contiene una menor densidad de células presentadoras de antígeno, especialmente células dendríticas, en comparación con la dermis, lo que puede impactar en la eficiencia inicial de la presentación antigénica (122). En concordancia con ello, estudios comparativos que evaluaron dosis fraccionadas idénticas administradas por diferentes vías han demostrado que la inmunización intramuscular (IM) o subcutánea (SC) puede inducir respuestas inmunes comparables a la vía intradérmica en la mayoría de los casos; sin embargo, para determinados antígenos se ha observado una respuesta inmunológica inferior tras la administración IM/SC, lo que sugiere que la vía de administración puede influir en la magnitud de la respuesta humoral (121).

No obstante, estas características convierten a la vía subcutánea en una plataforma particularmente adecuada para formulaciones que requieren una liberación sostenida del antígeno, en las que el uso de adyuvantes resulta clave para potenciar la respuesta inmune y optimizar la activación del sistema inmunológico (122).

La administración por vía nasal se caracteriza por su capacidad para inducir una respuesta inmune compartimentalizada, lo que permite la generación de IgA secretora directamente en las superficies de entrada. Esta inmunoglobulina actúa como una barrera que neutraliza al parásito antes de que atraviese el epitelio y facilita la eliminación de antígenos que ya han penetrado en la submucosa (123).

A diferencia de las vías inyectables tradicionales, la inmunización nasal desencadena una

respuesta que es tanto local como sistémica, proporcionando una red de protección que se extiende desde el sitio de inoculación hasta la circulación general (124). Asimismo, esta ruta facilita la inducción de perfiles de citocinas de tipo Th1 y respuestas celulares citotóxicas, elementos necesarios para el control de la carga parasitaria. No obstante, su efectividad depende de superar barreras físicas como el aclaramiento mucociliar y de utilizar formulaciones que aseguren un tiempo de contacto suficiente con el tejido linfoide para generar una señal de alerta duradera (125).

Objetivos

Objetivo General:

Desarrollar un esquema de tratamiento de la enfermedad crónica de Chagas utilizando una estrategia inmunomoduladora y evaluar los mecanismos inmunológicos que promueven dicha protección.

Objetivos particulares:

- 1) Optimizar la plataforma de infección crónica mediante la revalidación del modelo *T. cruzi*/ratón previamente utilizado y la exploración comparativa de modelos adicionales que incluyan diferentes cepas parasitarias, de ratón y/o vías de infección, con el fin de seleccionar los dos modelos más idóneos en términos de cronicidad parasitaria y/o afección cardiológica que permitan la evaluación de la terapéutica.
- 2) Confirmar y cuantificar la efectividad de la vacunación terapéutica en los dos modelos de infección crónica más idóneos seleccionados en el Objetivo 1, considerando como éxito la disminución significativa de la carga parasitaria y las lesiones cardíacas
- 3) Seleccionar uno de los modelos del objetivo anterior y evaluar los efectos que produce el tratamiento terapéutico combinado de la vacuna con el benznidazol.
- 4) Caracterizar la respuesta inmune de las condiciones terapéuticas que promuevan protección de los Objetivos 2 y 3, mediante el estudio detallado de: i) Los brazos efectores y reguladores de la respuesta inmune en el curso de la infección crónica; ii) Los cambios celulares y los mediadores inmunológicos presentes a nivel del tejido cardíaco luego de aplicar los tratamientos seleccionados; iii) La funcionalidad de los fenotipos celulares cuyo incremento presente correlato con la disminución de la lesión cardíaca.

Capítulo 1:

Caracterización y validación de modelos
parásito-huésped para el estudio de la
miocardiopatía chagásica crónica

1.I) Introducción

Como se detalló en la Introducción General, la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es, según el consenso más aceptado actualmente por los expertos, el resultado de una inflamación indolente y una fibrosis progresiva sostenida por la persistencia parasitaria (31,126). Sin embargo, la vasta heterogeneidad biológica de *T. cruzi*, clasificada en diversas unidades de tipificación discreta (DTU), sumada a la variabilidad genética del huésped, da lugar a manifestaciones clínicas sumamente diversas que dificultan enormemente la evaluación de nuevas terapias (21). Por ello, investigar cepas específicas bajo modelos animales genéticamente estables no es solo una opción, sino un requisito metodológico para garantizar que los resultados observados se deban a la intervención terapéutica y no a la aleatoriedad del binomio parásito-huésped.

El desafío central de este capítulo es establecer la dupla ideal entre cepa parasitaria y linaje murino capaz de reproducir lesiones similares a la CCC que sean detectables y, fundamentalmente, no letales. Muchos modelos experimentales tradicionales utilizan cepas de alta virulencia que provocan una mortalidad elevada en la fase aguda (127–129), lo que impide el estudio de la fase crónica o sesga los resultados hacia procesos de daño agudo fulminante que no reflejan la progresión clínica humana. Por lo tanto, para evaluar nuevos tratamientos, es imperativo validar modelos que aseguren la mayor tasa de supervivencia posible hasta el estadio crónico, permitiendo la aparición de alteraciones funcionales y tisulares evaluables.

Los ratones poseen una extensa trayectoria como el modelo de elección en la investigación experimental de la enfermedad de Chagas, siendo por amplio margen la especie más utilizada debido a su versatilidad y a su capacidad para mimetizar los procesos patológicos humanos. Su utilización ofrece ventajas sustanciales, como una alta tasa de reproducción y facilidad de manipulación, sumado a que resultan costo-efectivos y cuentan con una vasta gama de herramientas genéticas y reactivos validados (130,131). Si bien se han empleado otros modelos animales como primates no humanos y caninos —estos últimos considerados el *gold standard* para el estudio de la patología cardíaca (132)—, su uso está limitado a pocos centros de investigación debido a los elevados costos operativos y la necesidad de infraestructura especializada.

Bajo esta premisa, la disponibilidad de cepas de ratones consanguíneas resulta fundamental, especialmente en estudios de enfermedades infecciosas, ya que asegura la reproducibilidad de los ensayos en individuos genéticamente idénticos (131). Esto permite evaluar con precisión el

impacto de diversos tratamientos o dosis, recreando un perfil de daño tisular e inmunológico análogo a los observados en los pacientes. El curso de la infección en estos modelos se asemeja al perfil clínico humano, iniciando con una etapa aguda donde los parásitos son fácilmente detectables en sangre, seguida de una transición a una fase crónica persistente en la cual la carga parasitaria se vuelve mínima o intermitente (130).

No obstante, la efectividad de estos sistemas depende de una premisa crítica: la elección del binomio ratón-parásito. Existe una considerable variabilidad tanto en las cepas parasitarias como en los linajes animales, lo que determina desenlaces biológicos contrastantes. Dependiendo de la combinación utilizada o del estadio del ciclo de vida del parásito, pueden observarse diferencias drásticas en términos de susceptibilidad a fármacos, mortalidad, cinética de la parasitemia y grado de compromiso cardíaco (133–135).

En la práctica, las diferentes DTU exhiben comportamientos biológicos contrastantes, lo que condiciona factores críticos como la capacidad infectiva, la virulencia y la respuesta frente a distintos esquemas terapéuticos (14,136). Por ejemplo, la DTU TcI se destaca por su alta capacidad de multiplicación en cultivos celulares y, en modelos murinos como BALB/c, suele desarrollar parasitemias elevadas, aunque su manifestación en pacientes crónicos puede ser subpatente. Cepas de esta DTU, como Colombian, presentan un marcado cardiomiotropismo y alta patogenicidad crónica, mientras que el clon Sylvio-X10/4 logra mimetizar con gran fidelidad la miocarditis humana en ratones C3H/He. Cabe destacar que TcI es descrita frecuentemente como la DTU más resistente a los quimioterápicos convencionales, con tasas de curación extremadamente bajas en modelos experimentales (137).

Por su parte, la DTU TcII (representada por cepas como la Y) suele vincularse a una alta virulencia en la fase aguda, con un tropismo inicial hacia órganos linfoides como el bazo y el hígado. En ciertos modelos, genera respuestas inmunitarias robustas que contribuyen al control de las lesiones miocárdicas al inicio de la fase crónica. A diferencia de TcI, TcII suele presentar una mayor susceptibilidad a parasitocidas, alcanzando niveles de curación significativos en estudios experimentales. En contraste, las DTU TcIII y TcV se caracterizan por generar parasitemias menores o subpatentes y lesiones tisulares de leves a moderadas, con una susceptibilidad farmacológica intermedia. Finalmente, otras variantes como la DTU TcVI (ej. CL Brener) se describe como paninfectiva, dada su capacidad de invadir una amplia diversidad de tipos celulares y tejidos más allá del tejido cardíaco. Esta característica le permite inducir altas parasitemias y daños histológicos severos y sistémicos, consolidándose como un modelo de alta agresividad tanto *in vitro* como *in vivo* (137).

La elección del binomio ratón-parásito determina drásticamente el curso de la infección debido a la notable variabilidad en la susceptibilidad y el tropismo tisular. Por ejemplo, al inocular cepas virulentas como Y (TcII) o CL (TcVI), la respuesta varía desde una alta susceptibilidad y mortalidad en linajes como A/J y C3H/HeN, hasta una resistencia relativa en ratones C57BL/6 (138). De la misma manera, la infectividad depende de la cepa parasitaria; tal es el caso de la cepa G (TcI) presenta una capacidad de invasión reducida en comparación con CL Brener tanto en ratones BALB/c como en C57BL/6 (139).

La genética del huésped también condiciona la localización del daño crónico y los desenlaces funcionales. Mientras que ciertos modelos mimetizan la miocarditis persistente humana (como el clon Sylvio X10/4 en ratones C3H/HePAS), en otros linajes las lesiones se desplazan hacia órganos como el hígado o el músculo esquelético (140,141). Estas variaciones se reflejan también en la función cardíaca, donde los trastornos de conducción detectados por electrocardiografía (ECG) dependen estrictamente del modelo utilizado (142). Del mismo modo, la literatura sostiene que la genética del huésped es un factor determinante en la calidad de la respuesta inmunológica; Linajes como BALB/c lograron un control eficiente de la inflamación en la fase crónica de la infección por las cepas G (TcI) y CL (TcVI); mientras que otros, como C57BL/6 mantuvieron respuestas exacerbadas de citocinas y quimiocinas (139).

Si bien la vía intraperitoneal (IP) es el estándar en el laboratorio por su sencillez y precisión, en este capítulo se exploran además las vías oral e intradérmica utilizando la cepa Tulahuen. Esta comparativa es fundamental, ya que la vía intradérmica mimetiza fielmente la entrada del parásito a través de la dermis y resulta más representativa de la infección natural que la vía IP (134,143). Se ha demostrado que, en esta ruta, incluso inóculos reducidos de parásitos son capaces de establecer la infección con éxito (143). Un antecedente directo de nuestro grupo de laboratorio es el trabajo de Prochetto et al. (81), quienes establecieron que la vía intradérmica es eficaz para disminuir la mortalidad prematura observada con la inoculación sistémica de la cepa Tulahuen cl2 (DTU VI) en ratones BALB/c.

Por otro lado, la inclusión de la vía oral responde, como ya se mencionó en la introducción general, a su creciente importancia epidemiológica en la región amazónica, donde los brotes por esta ruta se asocian a una mayor agresividad clínica (21). Si bien la vía oral podría generar niveles de infección menores que la vía IP (144), esto podría ser una ventaja metodológica para reducir la mortalidad con cepas altamente virulentas.

Dado que el éxito de la infección depende tanto de la puerta de entrada como del tamaño del inóculo (134,143), resulta esencial determinar si estas rutas alteran el tropismo hacia el tejido

cardíaco o si modifican la cinética de marcadores de daño, factores clave para decidir qué modelo es más sensible para la evaluación de estrategias terapéuticas. Asimismo, se ha validado la relevancia del modelo de infección oral para el estudio de la patología aguda y crónica, demostrando que esta ruta es capaz de establecer una infección persistente con daño histológico significativo (145). Evaluar si estas rutas modifican la cinética de marcadores de daño es fundamental para identificar modelos más sensibles en la evaluación de fármacos.

La caracterización precisa de nuevos sistemas experimentales sigue siendo una prioridad para la disciplina. Aportes bibliográficos muy recientes refuerzan esta necesidad, describiendo que binomios como Dm28c (Tcl) y BALB/c ofrecen una respuesta inflamatoria moderada que permite el seguimiento prolongado de la patología (146). La disponibilidad de estos modelos crónicos no letales, sumada a la exploración de rutas de infección alternativas como las evaluadas en este capítulo, resulta indispensable para comprender la progresión de la enfermedad y consolidar plataformas sensibles para el ensayo de nuevas terapias.

El presente capítulo se propone, mediante una exploración comparativa, identificar los dos modelos experimentales que presenten el mejor equilibrio entre estabilidad de la fase crónica y presencia de daño cardíaco medible. Se prioriza el establecimiento de sistemas que aseguren la cronificación de la infección, maximizando el número de animales infectados y el desarrollo de afecciones asociadas, sin una elevada mortalidad. De este modo, se busca establecer la plataforma definitiva para las evaluaciones terapéuticas de las etapas subsiguientes de esta tesis.

Con el objetivo de caracterizar la evolución de la enfermedad, se ha seleccionado un conjunto de parámetros que integran la dinámica parasitaria con la respuesta sistémica del huésped. La determinación de la parasitemia y el monitoreo del peso corporal permiten confirmar el establecimiento exitoso de la infección y supervisar el bienestar animal. Estos indicadores se complementan con un sistema de puntuación o *score* clínico que valora signos de morbilidad (como la postura encorvada o la piloerección), los cuales actúan como marcadores tempranos de la severidad del cuadro agudo y de la carga inflamatoria sistémica (147,148).

Por otro lado, la utilización del electrocardiograma posibilita la detección no invasiva de anomalías funcionales, tales como bloqueos de rama, arritmias y alteraciones en los intervalos, que son análogas a las manifestaciones clínicas humanas (142,149). Fisiológicamente, la evaluación de estos parámetros permite identificar fallas en sitios específicos: el análisis de la onda P y el intervalo PR refleja la conducción auricular y atrioventricular, mientras que el complejo QRS y el intervalo QT evidencian alteraciones en la despolarización y repolarización

ventricular, frecuentemente asociadas a procesos de fibrosis y al daño miocárdico mediado por el sistema inmunológico (150,151).

Finalmente, el estudio histopatológico del tejido cardíaco y esquelético resulta indispensable para confirmar la presencia de infiltrados inflamatorios y el grado de fibrosis progresiva (152,153). Esta caracterización se completa con la medición de transaminasas y óxido nítrico en suero, biomarcadores que permiten evaluar de forma bioquímica la injuria orgánica y el daño miocárdico específico, asegurando que el seguimiento refleje la complejidad multiorgánica característica de la infección por *T. cruzi* (154,155).

1.II) Objetivos específicos

- Evaluar la infectividad, la virulencia y el curso clínico de diferentes binomios de cepas de *T. cruzi* y linajes de ratones, analizando el impacto de las distintas vías de inoculación utilizadas.
- Caracterizar las alteraciones funcionales y el daño tisular en los diferentes modelos de infección
- Seleccionar los modelos experimentales más idóneos para ser utilizados en la evaluación de estrategias terapéuticas.

1.III) Métodos

Se detallan a continuación los materiales y métodos empleados para la evaluación y selección de los modelos experimentales más adecuados para el estudio de la infección crónica por *T. cruzi* teniendo en cuenta el acceso a cepas de parásito y de ratón disponibles en nuestro medio. Con el objetivo de optimizar la plataforma experimental se incorporó un análisis comparativo de alternativas basadas en diferentes combinaciones parásito-hospedador. En particular, se examinaron cinco pares experimentales (*ratón-T. cruzi*): **C57BL/6–Dm28c (Tcl)**, **C57BL/6–Tulahuen cl2 (TcVI)** y **BALB/c–CL Brener (TcVI)**, todos ellos infectados por vía intraperitoneal, y **BALB/c–Tulahuen cl2 (TcVI) infectados por vía intradérmica u oral** (ver Tabla 3). Estos modelos representan variaciones en cepas murinas, cepas parasitarias y vías de infección.

La infección por vía intradérmica había sido previamente estandarizada para ser apta para cronicar en el grupo de trabajo (Prochetto 2022) y fue replicada en este estudio con fines comparativos. En contraste, la infección por vía oral, si bien había sido utilizada en estudios previos por un grupo colaborador (Pacini 2022, 2024, Bulfoni Balbi 2024), fue implementada por primera vez en nuestro laboratorio como una instancia inicial de evaluación y puesta a punto del modelo.

Tabla 3: Modelos experimentales evaluados para la selección de un esquema de infección crónica por *T. cruzi*

Modelo	Cepa ratón	Cepa de <i>T. cruzi</i> (DTU)	Vía de infección	Punto final (dpi)
DM	C57BL/6	Dm28c (Tcl)	Intraperitoneal	92
TUL	C57BL/6	Tulahuen cl2 (TcVI)	Intraperitoneal	90
CL	BALB/c	CL Brener (TcVI)	Intraperitoneal	90
MO	BALB/c	Tulahuen cl2 (TcVI)	Oral	45
MI	BALB/c	Tulahuen cl2 (TcVI)	Intradérmica	96

1.III.1) Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c o C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, adquiridos en el Centro de Medicina Comparada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Los animales se mantuvieron en el bioterio de nuestro laboratorio bajo condiciones controladas de luz y temperatura, con acceso *ad libitum* a agua y alimento. Se respetó un periodo de aclimatación de 2 semanas antes de iniciar los procedimientos experimentales. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo siguiendo las normativas institucionales y la *Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* (National Research Council, EE. UU./NIH), contando con la aprobación del Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-UNL) bajo el protocolo n.º CE2018-42.

1.III.2) Parásitos

Para obtener parásitos de la cepa Tulahuen cl2 se utilizaron tripomastigotes sanguíneos para la infección de los ratones. Estos parásitos fueron mantenidos por pasajes sucesivos en ratones de la cepa Cb1 en el Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER), quienes gentilmente cedieron los animales infectados para cada ensayo.

En nuestro laboratorio, los ratones Cb1 infectados fueron anestesiados con una solución de ketamina (50%, Holliday-Scott S.A.) y xilacina (10%, PharmaVet®), y se procedió a la obtención de aproximadamente 1 mL de sangre entera mediante punción cardíaca, tras lo cual los animales fueron sacrificados. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos y se separaron los sobrenadantes, que contenían los parásitos.

Los tripomastigotes fueron luego lavados agregando 1 mL de solución fisiológica estéril y sometidos a una segunda centrifugación a 2.500 rpm por 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 mL de solución fisiológica estéril. Finalmente, la concentración de parásitos viables se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer, y se ajustó la suspensión a la concentración requerida para las infecciones experimentales.

Los tripomastigotes de la cepa Dm28c para el modelo C57BL/6 - Dm28c fueron suministrados por la Dra. Pamela Cribb del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), CCT-CONICET, Santa Fe, Argentina.

Para el caso del modelo BALB/c - CL Brener, tripomastigotes de la cepa CL Brener se obtuvieron a partir de la infección de cultivos de células VERO. Estas células fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco™), suplementado con suero equino al 10% (Internegocios SA) e incubadas a

37 °C en estufa de CO₂. Cuando se alcanzó la cantidad de parásitos deseada (1×10^6 *T. cruzi*/ratón), se procedió a lavar estos tripomastigotes CL-Brener del sobrenadante de los cultivos celulares. Para ello, se centrifugaron estos sobrenadantes a 2.500 rpm por 10 min y se conservó el *pellet* de parásitos. Estos parásitos se resuspendieron en 2 ml de solución fisiológica estéril y se volvieron a centrifugar a 2.500 rpm por 10 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en 1 ml de solución fisiológica estéril y se realizó un recuento en cámara de Neubauer.

1.III.3) Infección

Para el establecimiento de los modelos de infección se emplearon tripomastigotes sanguíneos viables de *T. cruzi* pertenecientes a las cepas Tulahuen cl2, Dm28c y CL Brener. En los siguientes modelos, los parásitos se administraron por vía intraperitoneal en un volumen final de 100 µL de solución fisiológica estéril.

En el modelo de infección con la cepa Dm28c, los ratones C57BL/6 (n= 12) recibieron una dosis intraperitoneal de 22.500 tripomastigotes por animal.

En el modelo de infección C57BL/6–Tulahuen cl2, cinco ratones C57BL/6 fueron infectados al inicio del experimento mediante la inoculación de 500 tripomastigotes por animal.

Por otra parte, en el modelo de BALB/c–CL Brener, los ratones BALB/c fueron infectados mediante la administración de 5.000 o 20.000 tripomastigotes (n= 5 para cada grupo).

Para el modelo BALB/c-Tulahuen cl2 de infección por vía intradérmica, seis ratones BALB/c fueron inoculados al inicio del experimento con 1.000 tripomastigotes por animal, en un volumen final de 10 µl por dosis. Finalmente, en el modelo BALB/c–Tulahuen cl2 infectado por vía oral, quince ratones BALB/c recibieron una dosis de 3.000 tripomastigotes por animal, administrada en un volumen final de 50 µL.

Se incluyeron grupos control no infectados, que recibieron solución fisiológica estéril por la misma vía de administración. Todas las inoculaciones se realizaron en el día post infección (dpi) cero.

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

Tras la infección, se evaluó la evolución parasitológica y clínica mediante el monitoreo de la parasitemia, el peso corporal, el desarrollo de signos clínicos y la supervivencia. La parasitemia se determinó a los 14, 21 y 28 dpi mediante microscopía óptica. Para ello, se obtuvieron 5 µL de

sangre de la punta de la cola de cada ratón, que se colocaron entre porta y cubreobjetos y se observaron al microscopio óptico (40×). El recuento se expresó como número de tripomastigotes por campo y se realizó sobre 25 campos seleccionados de manera sistemática siguiendo un patrón predefinido de barrido, asegurando la representatividad de la muestra para cada animal.

Una vez confirmada la infección, se efectuó un seguimiento clínico integral únicamente en los animales con parasitemia positiva. El peso corporal se registró dos veces por semana a partir del día 0 post infección. El desarrollo de signos clínicos se evaluó tres veces por semana, considerando la presencia de alteraciones asociadas a la infección, tales como erección y cambio de color del pelaje, presencia de joroba, dificultad para el movimiento, afección ocular y diarrea. A cada signo se le asignó un puntaje de acuerdo con un score clínico adaptado de Blättner et al. (156), detallado en la Tabla 3. Todas las evaluaciones fueron realizadas por el mismo operador.

La supervivencia se registró diariamente hasta el punto final experimental. Para los modelos infectados por vía intraperitoneal e intradérmica, dicho punto se estableció en los 90 dpi aproximadamente, momento en el cual se considera que la fase crónica de la infección se encuentra establecida. En contraste, para el modelo BALB/c–Tulahuen cl2 infectado por vía oral, el punto final experimental se fijó en los 45 dpi. Esta reducción en el tiempo de seguimiento se implementó con el fin de optimizar la eficiencia del modelo experimental, buscando estandarizar un esquema que permita evaluar la evolución de la patología en un periodo más acotado.

Se estableció como criterio de sacrificio humanitario la pérdida de más del 50% del peso corporal inicial, o la presencia de signos clínicos severos que indicaran sufrimiento irreversible.

Tabla 3: Score clínico. Puntaje asignado a cada una de las manifestaciones clínicas observadas en los ratones infectados.

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

1.III.5) Histopatología

Los corazones fueron extraídos al punto final de los experimentos, seccionados

transversalmente, fijados en formalina al 4% e incluidos en parafina. Los cortes histológicos (5 μ m) fueron realizados en la Cátedra de Morfología de la Facultad de Medicina (Universidad Nacional de Rosario) en concepto de servicio a terceros, y posteriormente teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar infiltrados inflamatorios y daño tisular, y con rojo de picrosirius para analizar la fibrosis del tejido. La intensidad de la inflamación miocárdica se clasificó según criterios previamente descritos (106) en leve (infiltrado discreto con daño en pocas fibras), moderada (afectación de 3 a 5 fibras musculares) o severa (infiltrados extensos con destrucción de múltiples fibras). La fibrosis se categorizó de manera equivalente en leve, moderada o severa, en función del tamaño y cantidad de fibras comprometidas. Con base en estas categorías, se estableció un sistema de puntuación para cuantificar inflamación y fibrosis: normal = 0; leve = 1; moderada = 2; severa = 3. El análisis histopatológico se realizó considerando de manera conjunta ambos parámetros, generándose un *score* histológico combinado de infiltración inflamatoria y fibrosis para cada ratón.

1.III.6) Evaluación electrocardiográfica

Las alteraciones electrofisiológicas cardíacas se evaluaron al final de los experimentos. Los ratones fueron anestesiados con una solución de ketamina-xilacina (100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina) antes de la evaluación. Los electrocardiogramas (ECG) se registraron utilizando un electrocardiógrafo adaptado para ratones (CardioCom, Paraná, Argentina) equipado con el software CC7DerS-Vet versión 1.0.4 provisto por el fabricante. Este sistema permitió medir la frecuencia cardíaca, la onda P, el intervalo QT y el complejo QRS. La Figura 10 muestra un ECG murino típico, visualizado mediante el software de adquisición y análisis, en el que se señalan los principales parámetros electrocardiográficos evaluados. El intervalo QT se corrigió utilizando la fórmula descrita por Mitchell (157) para obtener el QT corregido (QTc), ajustando por la variación natural del QT con la frecuencia cardíaca.

Se analizaron las derivaciones I y II para detectar anomalías arrítmicas, como taquicardia, bradicardia, contracciones auriculares prematuras y bloqueo auriculoventricular. La presencia de arritmias se evaluó calculando la proporción de ratones que presentaron alguna anomalía en el ECG dentro de cada grupo.

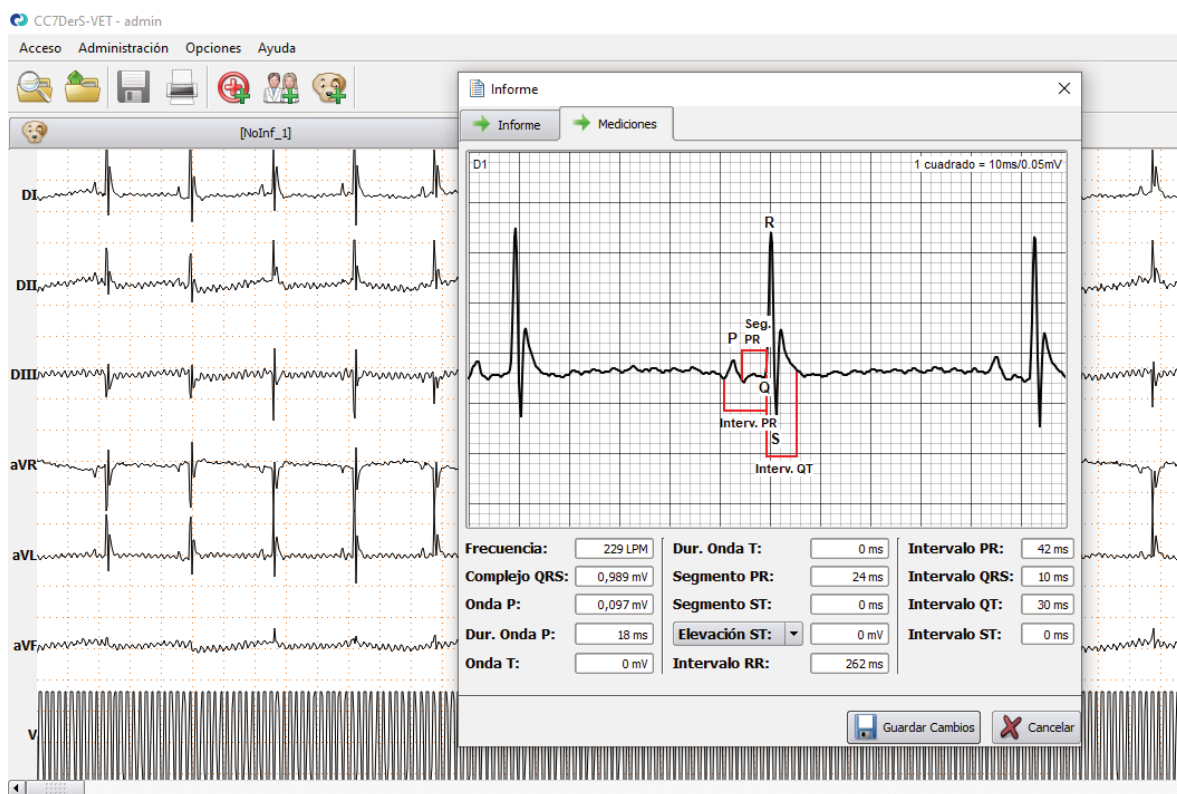


Figura 10: Electrocardiograma murino representativo y parámetros electrocardiográficos evaluados. Imagen representativa extraída del software CC7DerS-Vet utilizada para el análisis electrocardiográfico, en la que se señalan los principales parámetros evaluados: onda P, segmento PR, intervalo PR, complejo QRS e intervalo QT.

1.III.7) Enzimas y Biomarcadores Cardíacos y Hepáticos

La actividad sérica de las enzimas Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT/AST) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT/ALT) se determinó en suero (extraído en el punto final) utilizando el *kit* Transaminasas 200 (Wiener Lab). Este método se basa en la reacción de Reitman y Frankel, donde los productos enzimáticos (oxalacetato/piruvato) reaccionan con 2,4-dinitrofenilhidracina para formar un complejo coloreado. La absorbancia final se leyó a 505 nm y los resultados se calcularon a partir de una curva de calibración de piruvato de sodio.

La actividad de la isoenzima Creatina Kinasa MB (CK-MB), un indicador de injuria del miocardio, se analizó en suero o plasma utilizando el método UV CK-MB NAC U (Wiener Lab). El procedimiento se realizó en una cubeta a 25°C utilizando el Reactivo único y 40 µL de muestra. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 340 nm durante 3 minutos, calculando la actividad en U/L a partir del cambio promedio de absorbancia por minuto $\Delta A/\text{min}$.

La concentración del óxido nítrico (ON), medida a través de su producto de oxidación el nitrito (NO), se realizó mediante la reacción de Griess. La cuantificación se realizó en microplaca,

incubando 100 μ L del Reactivo de Griess con 50 μ L de muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia final se midió a 548 nm. La concentración se determinó mediante una curva estándar de nitrito de sodio, con un límite de detección de 1.0 μ M.

Se procesaron únicamente muestras de plasma que no presentaron signos de hemólisis, ya que esta genera interferencias en las lecturas espectrofotométricas y altera los valores basales.

1.III.8) Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas. Las comparaciones entre dos grupos independientes se efectuaron utilizando el test U de Mann–Whitney, mientras que las variables categóricas, como la proporción de animales afectados por arritmias, se analizó con el Test Exacto de Fisher.

Los datos se presentan como media $\pm$ SEM o como mediana y rango, de acuerdo con la naturaleza de la variable analizada. El procesamiento estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.), estableciéndose un nivel de significancia de $p < 0,05$.

1.IV) Resultados

1.IV.1) Modelo de infección: C57BL/6-Dm28c

1.IV.1) a) Parasitemia, supervivencia y parámetros clínicos

En este modelo de infección de ratones C57BL/6 con la cepa *Dm28c*, el 41,6% de los animales desarrolló parasitemia positiva, mientras que la supervivencia fue del 100% (Figura 11). Los análisis posteriores se realizaron exclusivamente en los animales parasitológicamente positivos ($n = 5$). Si bien no se dispuso del registro cuantitativo del peso corporal para este grupo, los ejemplares no presentaron signos clínicos detectables (score = 0) ni evidencias visuales de deterioro o pérdida de condición física en comparación con el grupo control.

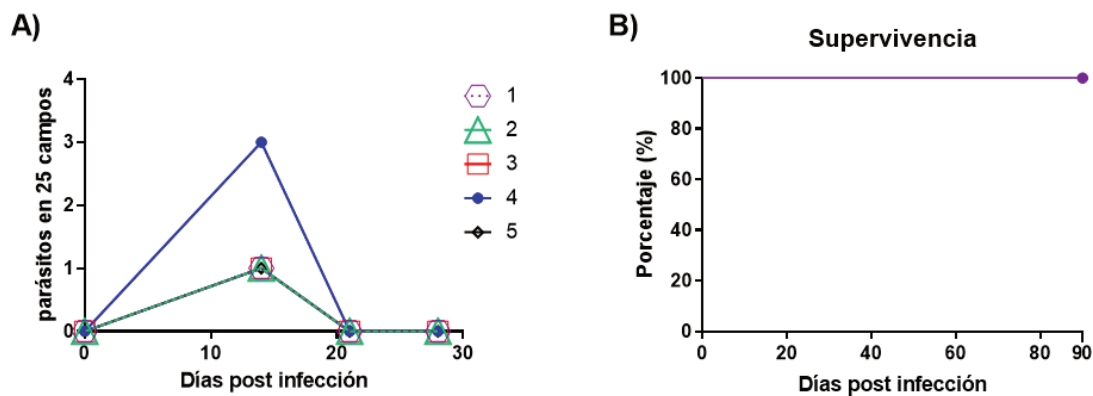


Figura 11: Evaluación de parámetros de infección del modelo C57BL/6-Dm28c. A) Parasitemia evaluada por microscopía directa contando 25 campos ópticos a los días 14, 21 y 28 post infección. **B)** Supervivencia del grupo experimental evaluado.

1.IV.1) b) Histología

Como se observa en la Figura 12, el score combinado de daño para el corazón (Figura 12A) y el músculo esquelético (Figura 12B) fue mínimo. Solo uno de los cinco animales infectados presentó alteraciones leves en ambos tejidos, lo cual no representó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control sano. La Figura 12C muestra las imágenes microscópicas representativas de estos cortes.

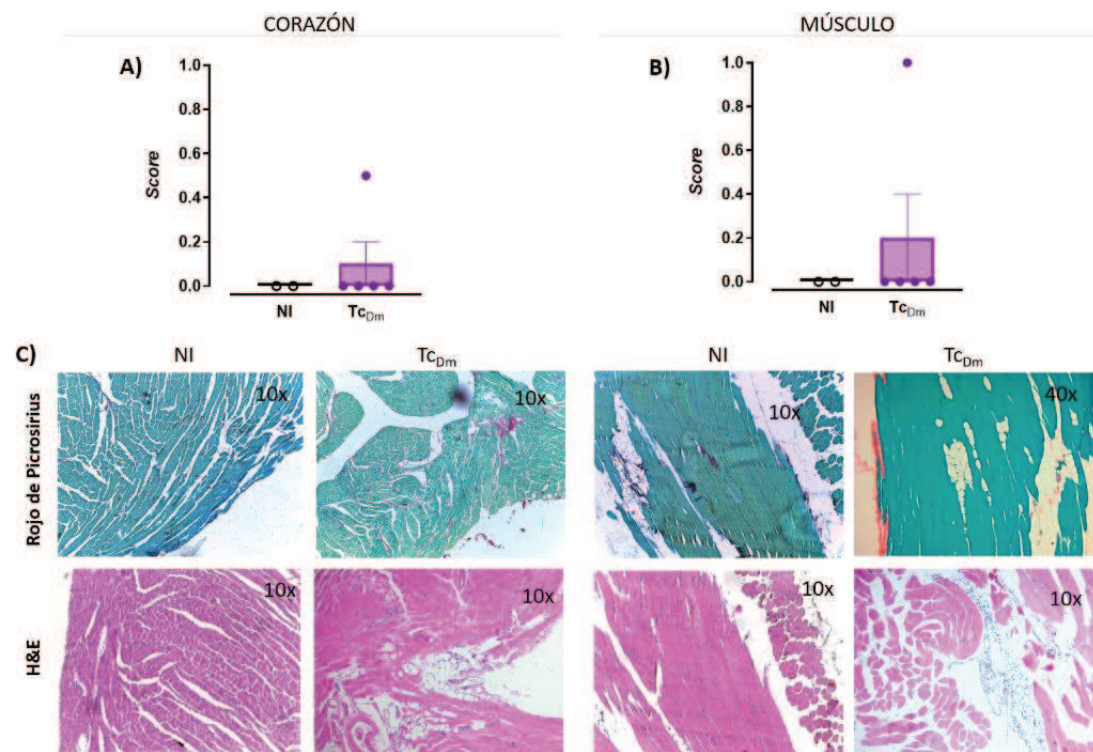


Figura 12: Análisis histológico del modelo de infección C57BL/6-Dm28c. *Score* combinado de daño tisular, integrando los parámetros de inflamación y fibrosis para **A)** corazón y **B)** músculo esquelético. **C)** Imágenes microscópicas representativas de fibrosis (Picrosirius Red) e infiltrados inflamatorios (H&E) en tejido cardíaco y muscular.

1.IV.1) c) Electrocardiografía

Debido a fallas técnicas imprevistas en el sistema de adquisición de señales eléctricas durante el periodo de evaluación de este grupo experimental, no se dispone de registros electrocardiográficos procesables.

1.IV.1) d) Marcadores séricos de daño tisular

En relación con los marcadores séricos, se observó un aumento significativo en los niveles de ON y GPT en el grupo infectado respecto del control (Figura 13A y 13D). En contraste, los niveles de CK-MB y GOT no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 13B y 13C).

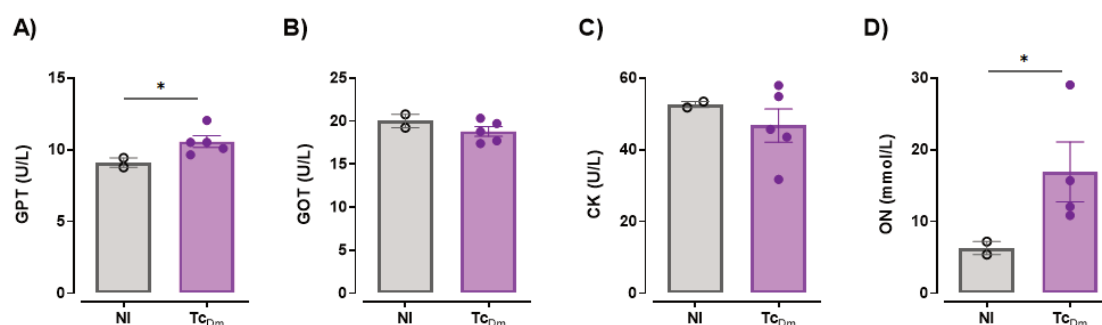


Figura 13: Evaluación de marcadores de daño tisular e inflamación en el modelo de infección C57BL/6-Dm28c: Se determinaron los niveles séricos de distintos biomarcadores con el fin de evaluar la integridad tisular y el estado inflamatorio sistémico. **A)** Concentración de transaminasa glutámico pirúvica (GPT). **B)** Concentración de transaminasa glutámico oxalacética (GOT). **C)** Niveles de creatina quinasa MB (CK-MB) como marcador de daño cardíaco. **D)** Concentración de óxido nítrico (ON), indicador del estado inflamatorio sistémico. La significancia estadística se indica como *p < 0,05.

1.IV.2) Modelo de infección: C57BL/6-Tulahuen cl2

1.IV.2) a) Parasitemia, supervivencia y parámetros clínicos

En el modelo de infección con 500 tripomastigotes de la cepa Tulahuen cl2 en ratones C57BL/6, todos los animales presentaron parasitemia positiva al día 14 postinfección (Figura 14A); sin embargo, la supervivencia fue del 40% (Figura 14B), por lo que el modelo no cumplió con los criterios previstos para considerarse no letal.

En la evaluación clínica, la mayoría de los ratones infectados mostró scores clínicos elevados, con presencia de más de un signo clínico visible (Figura 14C). Solo un animal no presentó signos clínicos detectables y correspondió al de menor parasitemia. Los tres ratones que exhibieron los scores clínicos más altos coincidieron con los animales que no sobrevivieron y que presentaron las parasitemias sanguíneas más elevadas.

En cuanto al peso corporal, si bien se observó una disminución del peso corporal en el grupo infectado, la marcada variabilidad observada dentro de este grupo, ausente en el grupo control, impidió que la diferencia entre ambos grupos alcanzara significación estadística (Figura 14E y D).

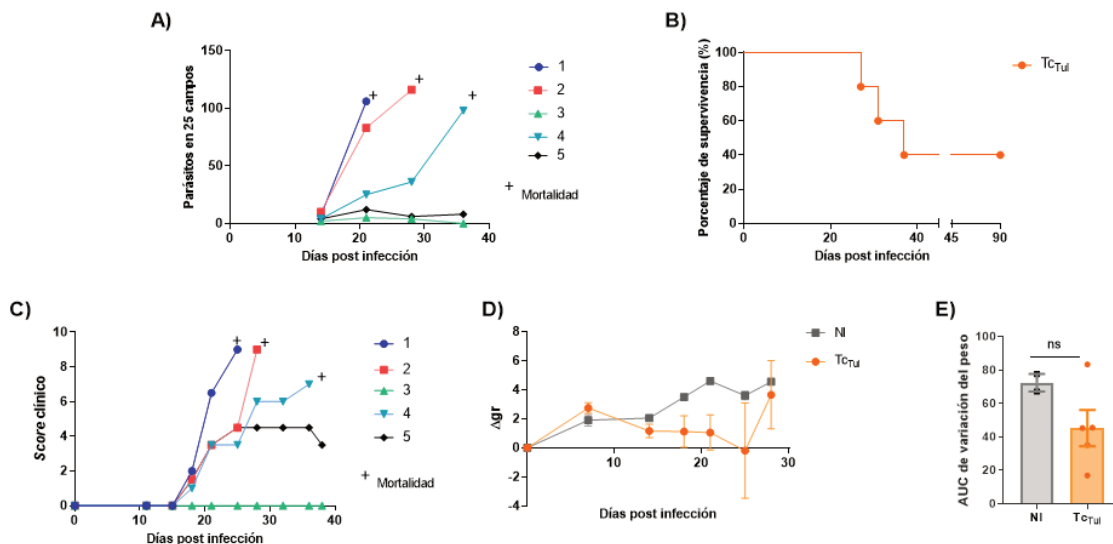


Figura 14: Evaluación de parámetros de infección del modelo C57BL/6-Tulahuen cl2. **A)** Parasitemia evaluada por microscopía directa contando 25 campos ópticos a los días 14, 21, 28 y 35 post infección. **B)** Supervivencia del grupo experimental infectado **C)** Score clínico relacionado a la aparición de síntomas en los ratones infectados **D)** Evaluación de la variación en el peso de los ratones infectados y controles no infectados a distintos días post infección. La variación del peso se calculó restando, para cada ratón, el peso medido en cada punto temporal respecto del peso inicial. **E)** AUC: área bajo la curva de la variación del peso evaluada.

1.IV.2) b) Histología

El análisis histopatológico no fue realizado debido a la elevada mortalidad y a la variabilidad en la presentación de los signos clínicos, así como a la necesidad de priorizar el uso de recursos experimentales. En este contexto, se optó por evaluar biomarcadores séricos de daño tisular e inflamación, que permiten obtener información relevante a nivel sistémico con un menor costo experimental.

1.IV.2) c) Electrocardiografía

El análisis electrocardiográfico (Figura 15), aunque limitado por el reducido número de ratones sobrevivientes ($n = 2$), sugirió un posible incremento en la frecuencia cardíaca (Figura 15A) y del intervalo QTc (Figura 15D), sin alcanzar significancia estadística. Por otro lado, no se detectó la presencia de arritmias (como extrasístoles o bloqueos auriculoventriculares) en los animales evaluados. Asimismo, los parámetros correspondientes al intervalo PR y al segmento PR se mantuvieron dentro de los rangos de normalidad y sin diferencias respecto al grupo control (datos no mostrados).

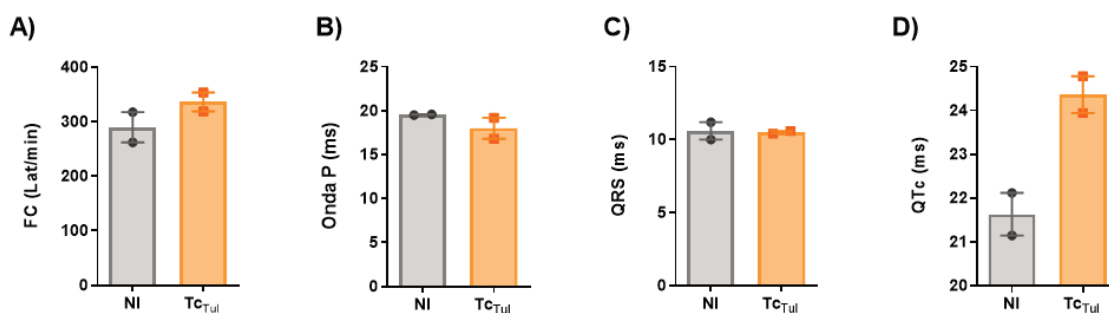


Figura 15: Evaluación electrocardiográfica en el modelo de infección C57BL/6-Tulahuen cl2. Se evaluó la funcionalidad eléctrica del corazón mediante el análisis de parámetros de conducción y del ritmo cardíaco. **A)** Frecuencia cardíaca expresada como latidos por minuto. **B)** Duración de la onda P. **C)** Duración del complejo QRS. **D)** Intervalo QT corregido (QTc). Los parámetros se expresan en milisegundos (ms).

1.IV.2) d) Marcadores séricos de daño tisular / inflamación

Respecto de los marcadores séricos de daño tisular (Figura 16), solo se detectaron diferencias en las transaminasas GOT (Figura 16B), las cuales, contrariamente a lo esperado, presentaron niveles más bajos en el grupo infectado en comparación con el control.

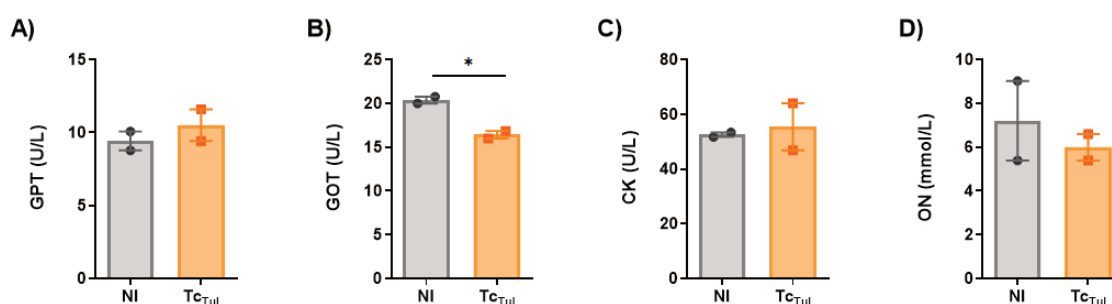


Figura 16: Evaluación de marcadores de daño tisular e inflamación en el modelo de infección C57BL/6-Tulahuen cl2: Se evaluaron en suero biomarcadores asociados al daño tisular y al estado inflamatorio sistémico. **A)** Transaminasa glutámico pirúvica (GPT). **B)** Transaminasa glutámico oxalacética (GOT). **C)** Creatina quinasa MB (CK-MB), utilizada como marcador de daño cardíaco. **D)** Óxido nítrico (ON), como indicador de inflamación sistémica. La significancia estadística se expresa como * $p < 0,05$.

1.IV.3) Modelo de infección: BALB/c-CL Brener

En el modelo de infección utilizando ratones BALB/c y tripomastigotes de la cepa *CL Brener*, la parasitemia resultó negativa en todos los días evaluados (14, 21 y 28 postinfección). Los animales no presentaron signos clínicos ni variaciones significativas en el peso corporal respecto del grupo control. Dado que no se observaron indicadores de infección activa, se decidió no avanzar con análisis adicionales en este modelo.

1.IV.4) Modelo de infección: BALB/c-Tulahuen vía oral

1.IV.4) a) Parasitemia, supervivencia y parámetros clínicos

En el modelo de infección oral con la cepa Tulahuen cl2 en ratones BALB/c, se observó parasitemia positiva en 6 de los 15 animales inoculados (40%), los cuales fueron considerados para los análisis posteriores. La parasitemia de los ratones positivos se muestra en la Figura 17A. De estos, la supervivencia fue del 83,3% (5/6) (Figura 17B).

Todos los ratones infectados presentaron signos clínicos visibles durante el curso de la infección (Figura 17C). El único animal que no sobrevivió mostró un score clínico elevado y, al igual que lo observado en otros modelos, fue incapaz de controlar la parasitemia al día 21 postinfección, presentando un aumento sostenido de la misma hasta el día 28 postinfección.

En relación con el peso corporal, el grupo infectado mostró una disminución que comenzó alrededor del día 10 postinfección, iniciando la recuperación antes del día 30 (Figura 17D). El análisis del área bajo la curva (AUC) confirmó que esta variación del peso fue significativamente mayor en el grupo infectado en comparación con el control (Figura 17E).

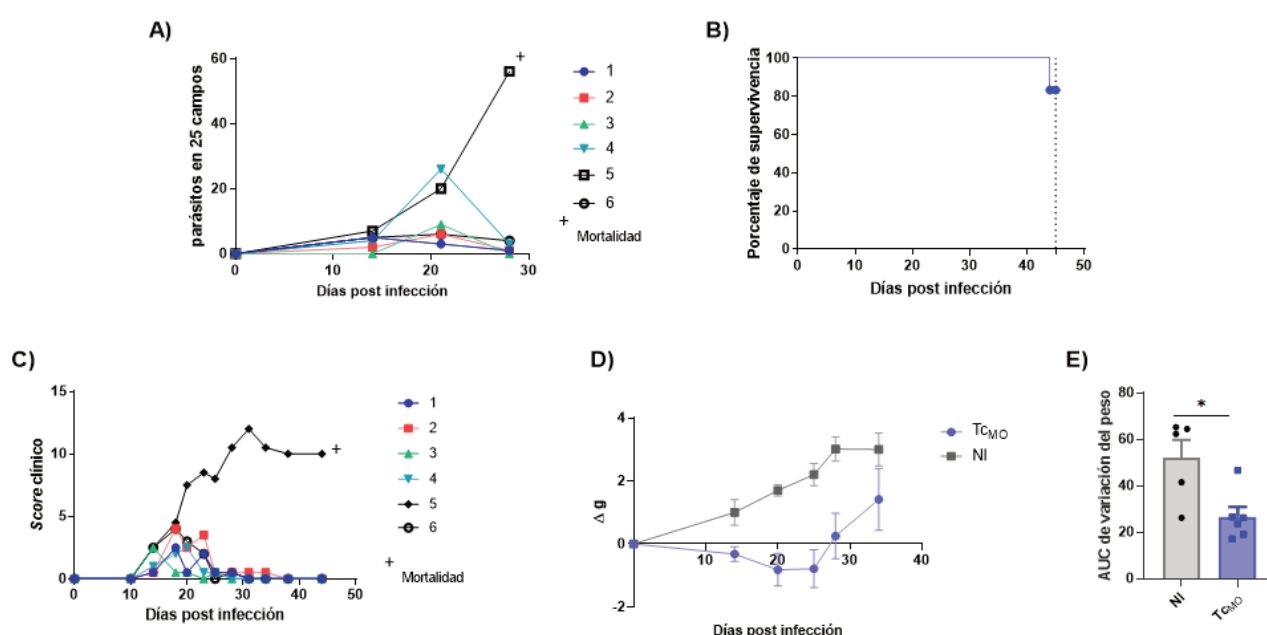


Figura 17: Evaluación de parámetros de infección del modelo BALB/c-Tulahuen por vía oral. A) Parasitemia evaluada por microscopía directa contando 25 campos ópticos a los días 14, 21 y 28 post infección. B) Supervivencia del grupo experimental infectado C) *Score* clínico relacionado a la aparición de síntomas en los ratones infectados D) Evaluación de la variación en el peso de los ratones infectados y controles no infectados a distintos días post infección. La variación del peso se calculó restando, para cada ratón, el peso medido en cada punto temporal respecto del peso inicial. E) AUC: área bajo la curva de la variación del peso evaluada. La significancia estadística se indica como * $p < 0,05$.

1.IV.4) b) Histología

El análisis histopatológico realizado al día 45 postinfección evidenció que el grupo infectado presentó un aumento significativo del *score* histológico combinado, que integra los parámetros de infiltrados inflamatorios y fibrosis, en el tejido cardíaco en comparación con el grupo no infectado (Figura 18A).

En el músculo esquelético, si bien el *score* histológico conjunto mostró una tendencia a aumento en el grupo infectado, esta diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 18B).

La Figura 18C muestra las imágenes microscópicas representativas de los cortes histológicos.

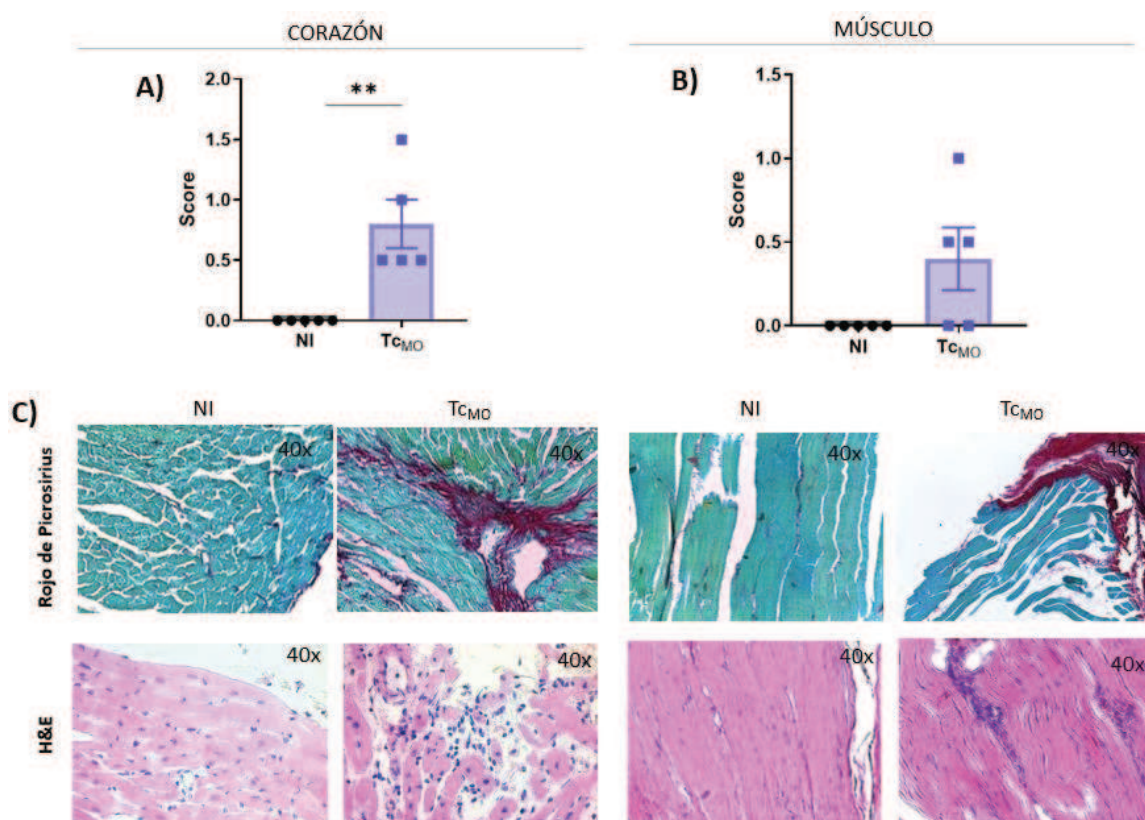


Figura 18: Análisis histológico del modelo de infección oral BALB/c-Tulahuen c12. *Score* combinado de daño tisular, integrando los parámetros de inflamación y fibrosis para **A)** corazón y **B)** músculo esquelético. **C)** Imágenes representativas de fibrosis (rojo de picrosirius) e infiltrados inflamatorios (H&E) en tejido cardíaco y muscular. Aumento: 40x.

1.IV.4) c) Electrocardiografía

El análisis electrocardiográfico mostró que el grupo infectado presentó un aumento significativo de la frecuencia cardíaca (Figura 19A) y del intervalo QT corregido (QTc) (Figura 19B) en comparación con el grupo control. No se observaron diferencias significativas en la duración de la onda P (Figura 19B) ni del complejo QRS (Figura 19D) entre los grupos.

Al igual que en los modelos anteriores, el intervalo PR y el segmento PR no mostraron diferencias estadísticas, por lo que se omitieron de las gráficas siguiendo el criterio de presentación de este capítulo.

En cuanto a la incidencia de alteraciones electrocardiográficas (Figura 19D), el 50% de los animales infectados presentó algún tipo de alteración, mientras que en el grupo control este porcentaje fue del 20%, sin alcanzarse diferencias estadísticamente significativas.

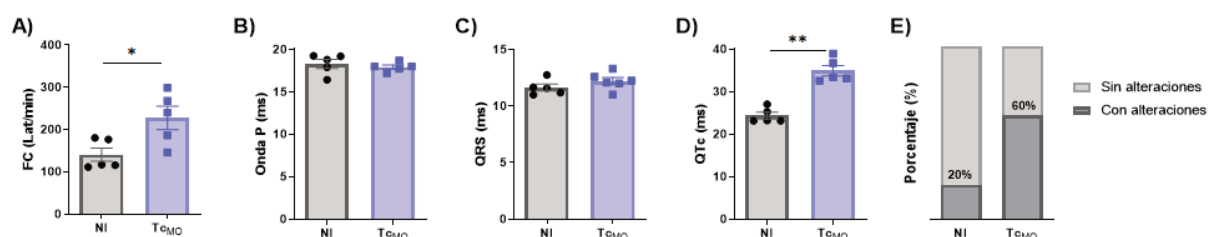


Figura 19: Evaluación electrocardiográfica en el modelo de infección oral BALB/c-Tulahuen cl2. Se evaluó la funcionalidad eléctrica del corazón mediante el análisis de parámetros de conducción y del ritmo cardíaco. **A)** Frecuencia cardíaca expresada como latidos por minuto. **B)** Duración de la onda P. **C)** Duración del complejo QRS. **D)** Intervalo QT corregido (QTc). Los parámetros se expresan en milisegundos (ms). **E)** Incidencia de arritmias. La significancia estadística se indica como * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

1.IV.4) d) Marcadores séricos de daño tisular

Respecto de los marcadores séricos de daño tisular, el grupo infectado presentó aumentos significativos en las concentraciones séricas de GPT (Figura 20A), GOT (Figura 20B) y CK-MB (Figura 20C) en comparación con el grupo control. El análisis de óxido nítrico no pudo ser realizado debido a la insuficiente cantidad de muestra disponible.

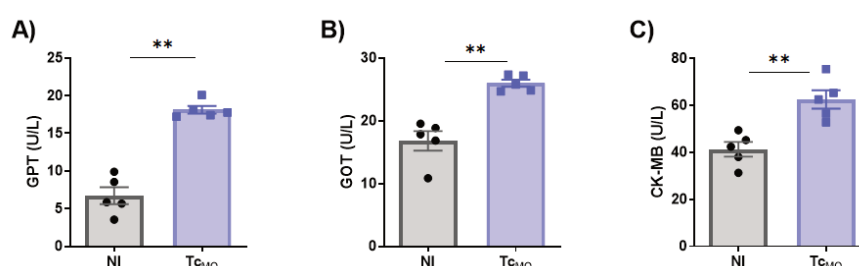


Figura 20: Evaluación de marcadores de daño tisular e inflamación en el modelo de infección oral BALB/c-Tulahuen cl2. Se evaluaron en suero biomarcadores asociados al daño tisular y al estado inflamatorio sistémico. **A)** Transaminasa glutámico pirúvica (GPT). **B)** Transaminasa glutámico oxalacética (GOT). **C)** Creatina quinasa MB (CK-MB), utilizada como marcador de daño cardíaco. La significancia estadística se expresa como ** $p < 0,01$.

1.IV.5) Modelo de infección: BALB/c-Tulahuen cl2 vía intradérmico

1.IV.5) a) Parasitemia, supervivencia y parámetros clínicos

En el modelo de infección intradérmica con la cepa Tulahuen en ratones BALB/c, todos los animales desarrollaron parasitemia positiva (Figura 21A), criterio utilizado para la inclusión de los animales en los análisis posteriores. El pico de parasitemia se registró al día 21 postinfección. El único animal que no logró controlar la parasitemia a ese tiempo fue el que no sobrevivió, mientras que los restantes ratones presentaron una reducción progresiva de los niveles de parásitos en sangre. La supervivencia global del grupo fue del 83,3% (5/6) (Figura 21B).

En cuanto a los parámetros clínicos (Figura 21C), todos los ratones infectados presentaron signos clínicos visibles. Asimismo, los animales infectados mostraron una disminución significativa del peso corporal en comparación con el grupo control (Figura 21E). El análisis temporal del peso corporal (Figura 21D) evidenció que dicha disminución ocurrió en torno al día 21 postinfección y que, a partir de aproximadamente el día 40, los animales comenzaron a recuperar peso, alcanzando valores similares a los del grupo control hacia el día 90 postinfección.

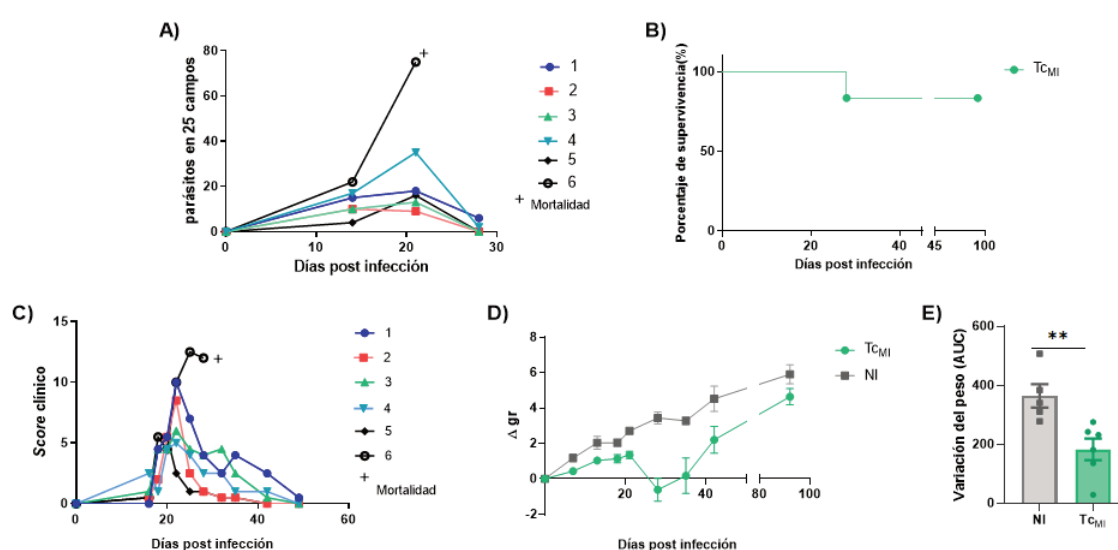


Figura 21: Evaluación de parámetros de infección del modelo BALB/c-Tulahuen por vía intradérmica. A) Parasitemia evaluada por microscopía directa contando 25 campos ópticos a los días 14, 21 y 28 post infección. **B)** Supervivencia del grupo experimental infectado **C)** *Score* clínico relacionado a la aparición de síntomas en los ratones infectados **C)** Evaluación de la variación en el peso de los ratones infectados y controles no infectados a distintos días post infección. **E)** La variación del peso se calculó restando, para cada ratón, el peso medido en cada punto temporal respecto del peso inicial. AUC: área bajo la curva de la variación del peso evaluada. La significancia estadística se indica como **p < 0,01.

1.IV.5) b) Histología

El análisis histológico reveló que 2 de los 5 animales infectados evaluados presentaron lesiones leves tanto en tejido cardíaco (Figura 22A) como en músculo esquelético (Figura 22B). Sin embargo, al considerar el conjunto del grupo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros histológicos analizados en comparación con el grupo control. Se muestran imágenes microscópicas representativas de los cortes histológicos en la Figura 22C.

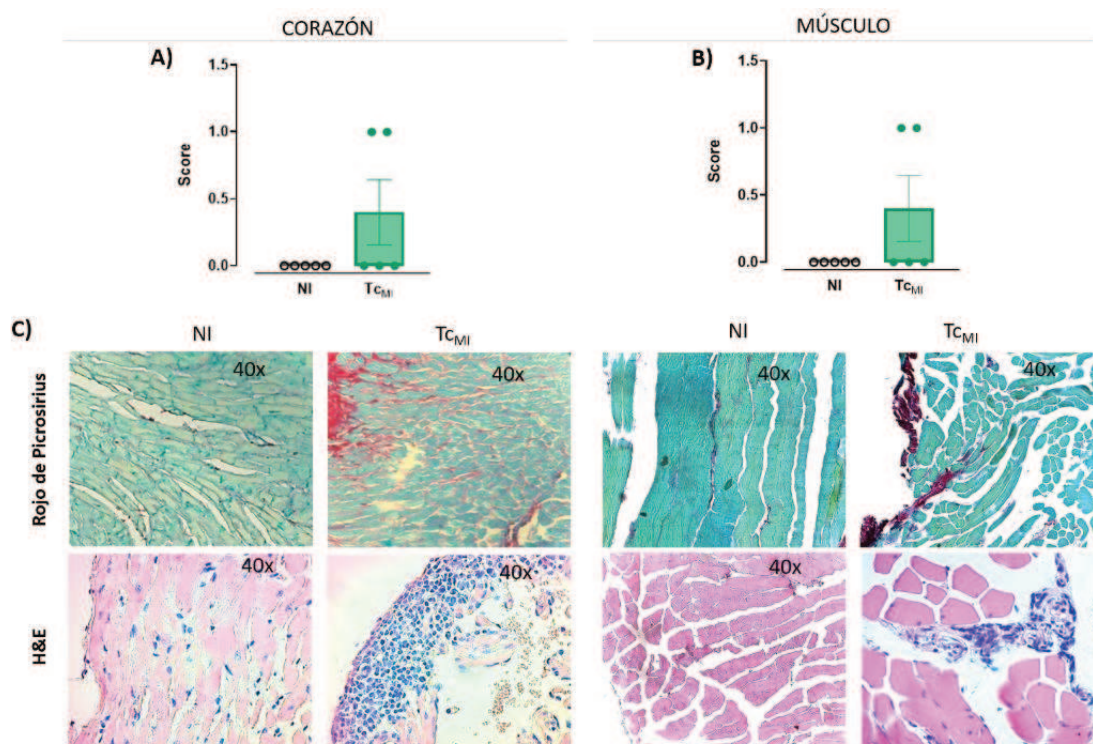


Figura 22: Análisis histológico del modelo de infección intradérmico BALB/c-Tulahuen cl2. A) Score combinado de daño tisular, integrando los parámetros de inflamación y fibrosis para corazón y **B) músculo esquelético. C) Imágenes representativas de infiltrados inflamatorios (H&E) y fibrosis (rojo de picrosirius)** en tejido cardíaco y muscular. Aumento: 40×.

1.IV.5) c) Electrocardiografía

El análisis electrocardiográfico se realizó con un tamaño muestral de $n = 4$ en el grupo infectado, debido a la imposibilidad de obtener el registro en uno de los animales.

Este mismo reveló un aumento significativo de la frecuencia cardíaca (Figura 23A) y de la duración del intervalo QTc (Figura 23C) en los ratones infectados en comparación con el grupo control. De manera inesperada, se observó una disminución significativa en la duración del complejo QRS (Figura 23D) en el grupo infectado, mientras que no se detectaron diferencias significativas en la duración de la onda P (Figura 23B) entre los grupos.

Los parámetros correspondientes al intervalo PR y al segmento PR no evidenciaron variaciones significativas en este modelo y, por tal motivo, estos datos no se incluyen en las representaciones gráficas.

En cuanto a las alteraciones del ritmo (Figura 23E), el 50% de los ratones infectados presentó alteraciones electrocardiográficas, mientras que en el grupo control estas se observaron en el 40% de los animales. Dado que dichas alteraciones también estuvieron presentes en animales no infectados, no puede descartarse que estén asociadas, al menos en parte, a efectos de la anestesia utilizada durante el registro.

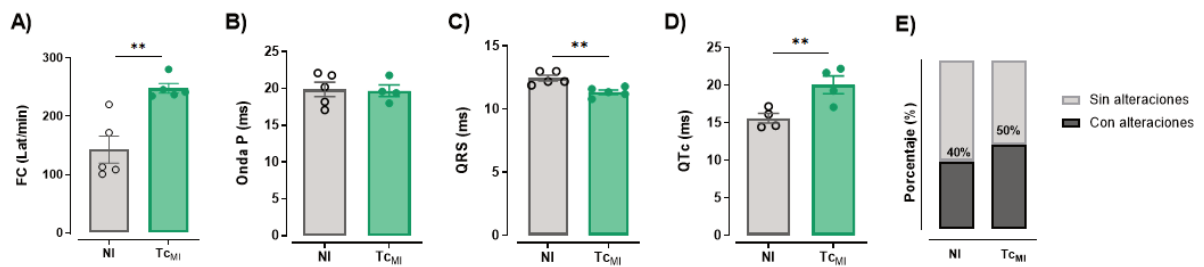


Figura 23: Evaluación electrocardiográfica en el modelo de infección intradérmica BALB/c-Tulahuen cl2. Se evaluó la funcionalidad eléctrica del corazón mediante el análisis de parámetros de conducción y del ritmo cardíaco. **A)** Frecuencia cardíaca expresada como latidos por minuto. **B)** Duración de la onda P. **C)** Duración del complejo QRS. **D)** Intervalo QT corregido (QTc). Los parámetros se expresan en milisegundos (ms). **E)** Incidencia de arritmias. La significancia estadística se indica como * $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$.

1.IV.5) d) Marcadores séricos de daño tisular

Respecto de los marcadores séricos de daño tisular e inflamación, se observaron aumentos significativos en los niveles de las transaminasas GPT y GOT (Figura 24A y B), así como en la CK-MB (Figura 24C), en el grupo infectado en comparación con el grupo control. Asimismo, se detectó un incremento significativo en la concentración sérica de óxido nítrico (Figura 24D), indicativo de un estado inflamatorio sistémico exacerbado.

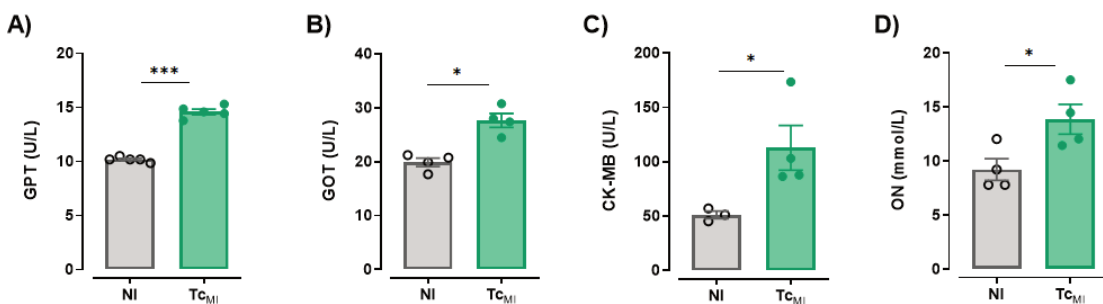


Figura 24: Evaluación de marcadores de daño tisular e inflamación en el modelo de infección intradérmica BALB/c-Tulahuen cl2. Se evaluaron en suero biomarcadores asociados al daño tisular y al estado inflamatorio sistémico. **A)** Transaminasa glutámico pirúvica (GPT). **B)** Transaminasa glutámico oxalacética (GOT). **C)** Creatina quinasa MB (CK-MB), utilizada como marcador de daño cardíaco. **D)** Óxido

nítrico (ON), como indicador de inflamación sistémica. La significancia estadística se expresa como * $p < 0,05$ o *** $p < 0.001$.

1.V) DISCUSIÓN

La evaluación de los distintos modelos de infección experimental permitió identificar variaciones críticas en la interacción entre la cepa de *T. cruzi* y el linaje del animal de experimentación. Este análisis se realizó sobre los modelos disponibles durante esta etapa experimental. Comenzando con el binomio C57BL/6-Dm28c, este mostró una baja infectividad y virulencia, evidenciada por una tasa de infección de apenas el 40%, niveles mínimos de parasitemia y una ausencia de score clínico o daño histológico en tejido cardíaco y muscular. Estos resultados coinciden con caracterizaciones recientes que definen a la cepa Dm28c como un modelo de baja virulencia (capaz de inducir una respuesta inflamatoria controlada y limitada en el tiempo). Es probable que, al combinar una cepa de agresividad intrínsecamente moderada con un linaje murino como el C57BL/6 (descrito como más resistente debido a su capacidad de establecer una respuesta inmune equilibrada), se haya alcanzado un nivel de atenuación que impidió establecer una infección efectiva bajo el inóculo utilizado (158). Aunque las alteraciones en los niveles de GPT y óxido nítrico sugieren un estímulo biológico, la falta de una infección robusta indica que este modelo requeriría un incremento en el inóculo para establecer una infección efectiva.

Por el contrario, el modelo C57BL/6-Tulahuen cl2 presentó una virulencia excesiva por vía intraperitoneal, con una mortalidad del 60% y una marcada heterogeneidad entre los individuos. Esta baja supervivencia limitó el análisis de los 90 días post-infección a solo dos ejemplares, lo que imposibilita una interpretación estadística clara de las alteraciones en la frecuencia cardíaca y el intervalo QTc observadas. Es probable que la implementación de una vía de inoculación menos agresiva permitiera moderar esta letalidad inicial, sugiriendo que el esquema intraperitoneal no es el más adecuado para estudios de cronicidad en este binomio. Asimismo, el modelo BALB/c-CL Brener fue descartado debido a que no se detectó parasitemia ni signos clínicos de enfermedad en ninguno de los casos evaluados. Dada la ausencia de una infección detectable bajo estas condiciones, sería necesario evaluar este binomio utilizando dosis de inóculo superiores para inducir una respuesta patogénica.

En cuanto a los modelos que mostraron una evolución más favorable para el estudio, la infección de ratones BALB/c con la cepa Tulahuen cl2 por vía intradérmica demostró ser altamente eficaz, con una supervivencia superior al 80% y alcanzando una infectividad del 100%. Este grupo presentó manifestaciones clínicas claras y, en la fase crónica, un incremento significativo en los biomarcadores de daño tisular e inflamación, junto con alteraciones electrocardiográficas. Finalmente, el modelo por vía oral con la misma cepa, aunque exhibió una infectividad menor a

la esperada (40%), resultó particularmente relevante debido a su capacidad para inducir daño cardíaco específico. A los 45 días post-infección, este modelo mostró lesiones histopatológicas de moderadas a leves en el miocardio y alteraciones eléctricas en el 60% de los animales, acompañadas de un aumento en los marcadores séricos de daño.

La evaluación de los modelos experimentales realizados reforzó la influencia determinante de la genética del huésped en el curso de la infección por *T. cruzi*. En este estudio, la cepa Tulahuen cl2 exhibió comportamientos marcadamente contrastantes según el linaje murino utilizado: mientras que en ratones BALB/c se logró una supervivencia adecuada para el estudio de la fase crónica, el modelo en C57BL/6 mostró un patrón de alta mortalidad que dificultó su seguimiento.

Este comportamiento es coincidente con lo descrito por Roggero et al. (159), quienes observaron que la infección con la cepa Tulahuen conlleva una progresión más acelerada de la enfermedad y una mayor mortalidad en ratones C57BL/6 en comparación con los BALB/c. Según estos autores, dicha susceptibilidad no parece estar estrictamente relacionada con la carga parasitaria, sino con un desbalance inmunológico derivado de una relación desequilibrada entre mediadores pro y antiinflamatorios (159).

Esta heterogeneidad en la respuesta frente a una misma cepa también se observa con otros linajes murinos; por ejemplo, se ha reportado que los ratones CBA/J son significativamente más propensos a desarrollar patologías crónicas severas en comparación con los BALB/c (160). En conjunto, estas divergencias evidencian que la variabilidad de la respuesta inmune según el linaje es un factor condicionante de la evolución clínica. Otros ejemplos de esta influencia genética incluyen la modulación diferencial de la expresión de marcadores de superficie y el perfil de citocinas en células dendríticas (161), así como variaciones drásticas en la función de los neutrófilos entre distintos linajes tras la infección con la misma cepa (162).

Pese a estas marcadas diferencias entre linajes, se han identificado mecanismos de regulación inmune que actúan de manera similar en distintos huéspedes. Un ejemplo clave es el control de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), cuya manipulación ha demostrado potenciar la eficacia de estrategias inmunoterapéuticas. Este enfoque ha sido validado tanto en ratones BALB/c como C57BL/6, logrando protección frente a dinámicas de infección contrastantes, que abarcan desde cepas de alta virulencia como Tulahuen hasta modelos de persistencia tisular como Dm28c (163).

Otra variable determinante en el curso de la infección fue la elección de la vía de entrada, incluso manteniendo constante el binomio (BALB/c - Tulahuen cl2). Es bien conocido que el

comportamiento de este modelo por la vía intraperitoneal se caracteriza por una letalidad y una carga parasitaria elevadas, comportamiento ampliamente documentado tanto en la bibliografía general como en antecedentes de nuestro laboratorio (104,105,110,112). Por este motivo, se descartó su uso para el binomio BALB/c - Tulahuen cl2 en favor de una vía que permitiera un curso clínico más controlado.

De este modo, la implementación de rutas de inoculación alternativas permitió sortear las limitaciones de la vía sistémica tradicional. Nuestros hallazgos son consistentes con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo en Prochetto et al. (81), quienes establecieron que la vía intradérmica es una estrategia eficaz para moderar la agresividad inicial de la infección, facilitando la caracterización de las lesiones cardíacas y las alteraciones funcionales en la etapa crónica. Por otro lado, la utilización de la vía oral concuerda con lo descrito por Pacini et al. (145), quien detalla que esta ruta de ingreso es capaz de establecer una infección persistente y patogénica.

Al contrastar las rutas evaluadas en este capítulo, observamos que la vía intradérmica resultó ser claramente infectiva y virulenta sin comprometer la supervivencia, mientras que la infección por vía oral exhibió una menor infectividad y virulencia inicial; no obstante, esta última logró establecer afecciones crónicas a los 45 dpi, con lesiones en el tejido cardíaco incluso más pronunciadas. Esta observación sugiere que el sitio de inoculación no solo condiciona la supervivencia del huésped, sino que es capaz de redefinir el tropismo orgánico del parásito. En apoyo a esta idea, estudios comparativos con la cepa Tulahuen han demostrado que la administración intranasal, frente a la vía subcutánea, induce una parasitemia baja y menor mortalidad, pero resulta en un elevado parasitismo en el cerebro (164).

Esta variabilidad en la respuesta del huésped según el sitio de inoculación guarda coherencia con lo descrito en la clínica humana. Se ha descrito que la ruta de infección es un determinante crítico de la severidad, observándose que los brotes de transmisión oral en pacientes suelen asociarse a manifestaciones mucho más graves y tasas de letalidad superiores en comparación con la transmisión vectorial clásica (36,165). Si bien en el presente modelo murino la infección oral mostró un perfil de virulencia moderado en la etapa aguda, el hecho de que la ruta de inoculación sea capaz de modificar el compromiso tisular y la cinética de la enfermedad (tanto en el ámbito experimental como en el clínico) subraya la importancia de estudiar estas vías alternativas para obtener una visión más completa de la patología.

El estudio detallado de los parámetros electrocardiográficos es fundamental debido a su relevancia en la patología humana, donde el ECG constituye la herramienta no invasiva más

importante para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes después de la serología. En la clínica humana, la aparición de anomalías marca la transición hacia la fase crónica sintomática, periodo en el cual una parte considerable de los pacientes desarrolla miocardiopatía severa con riesgo de muerte súbita (151,166).

La caracterización del modelo mediante electrocardiografía (ECG) permitió traducir el impacto de la infección en alteraciones concretas de la conducción eléctrica. En ambos binomios evaluados BALB/c- Tulahuen cl2 (oral e intradérmico), se observó un incremento en la frecuencia cardíaca y un alargamiento del intervalo QTc. Este último constituye un marcador de inestabilidad eléctrica y vulnerabilidad miocárdica, sugiriendo un remodelamiento de la repolarización ventricular inducido por el entorno patológico y el estrés oxidativo (142,151,166). Sin embargo, el ensanchamiento del complejo QRS fue un hallazgo exclusivo del modelo intradérmico. Este ensanchamiento refleja un retraso en la despolarización ventricular, fenómeno que suele asociarse a la presencia de focos inflamatorios o fibrosis que interrumpen la propagación uniforme del impulso en el sistema de conducción distal (167,168).

Respecto a la incidencia de arritmias, los resultados evidenciaron la complejidad de este parámetro en modelos experimentales. Si bien el grupo infectado por vía oral mostró una tendencia superior de individuos afectados (60%) frente a su control (20%), la presencia de arritmias en los grupos no infectados (alcanzando un 40% en el modelo Tulahuen) sugiere un efecto secundario de la anestesia utilizada. Este fenómeno, documentado en la experimentación con roedores (169,170), resalta la importancia de interpretar la inestabilidad eléctrica como un evento multifactorial, donde la infección por *T. cruzi* actúa exacerbando una susceptibilidad basal del sistema de conducción.

Esta disfunción eléctrica se complementó con el análisis de la arquitectura cardíaca mediante histopatología. La evaluación de los cortes de tejido reveló una respuesta heterogénea entre los modelos: mientras que en la infección oral se observaron lesiones pronunciadas y persistencia parasitaria a los 45 dpi, el daño tisular no fue constante en todos los individuos del modelo intradérmico ni en el binomio C57BL/6 - Dm28c. Esta variabilidad subraya que la arquitectura tisular puede parecer preservada en ciertos estadios o modelos, lo que dificulta la caracterización de la patología basándose únicamente en la observación microscópica convencional.

Para complementar el análisis histopatológico y profundizar en el impacto sistémico de la infección, se evaluó el perfil bioquímico sérico, centrándose en marcadores de daño tisular (GOT, GPT), injuria miocárdica específica (CK-MB) y estrés oxidativo (Óxido Nítrico). En los

ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuen cl2, se observó un incremento significativo de GOT, GPT y CK-MB, independientemente de la vía de infección (oral o intradérmica). La elevación de las transaminasas refleja un compromiso sistémico y hepático que coincide con lo reportado por Nguyen et al. (171), mientras que el aumento de la isoenzima CK-MB evidencia una injuria directa sobre los cardiomiocitos. Está reportado que la liberación de esta enzima es un indicador robusto de la ruptura de la membrana celular miocárdica producto de la agresión parasitaria y la respuesta inflamatoria local (155,172).

Por el contrario, el perfil bioquímico en el linaje C57BL/6 mostró una dependencia estricta de la cepa utilizada. En el binomio C57BL/6 - Dm28c, solo se detectó un aumento de GPT y óxido nítrico (ON) en suero sin cambios en la CK-MB, lo que sugiere un predominio del componente inflamatorio y hepático sobre el daño estructural cardíaco. Un comportamiento diferente se observó con la cepa Tulahuen cl2 en este mismo linaje, donde no se registraron alteraciones significativas en los marcadores evaluados.

Cabe destacar que, si bien el aumento de los biomarcadores no siempre se correlacionó con un daño histológico visible al microscopio en todos los individuos (específicamente en el modelo intradérmico y en el binomio C57BL/6 - Dm28c), esta discrepancia no invalida el daño, sino que refuerza la sensibilidad de los biomarcadores séricos como un indicador temprano de injuria celular. En este sentido, está descrito que la elevación de la CK-MB puede actuar como un marcador predictivo, detectando alteraciones en la permeabilidad de la membrana de los cardiomiocitos antes de que se establezcan lesiones inflamatorias o fibróticas crónicas detectables por histopatología (173).

De igual manera, el incremento de ON en suero se vincula con un ambiente proinflamatorio que afecta la funcionalidad del órgano. Estudios previos han demostrado que niveles elevados de este mediador se correlacionan con alteraciones electrocardiográficas, lo que indica que el corazón puede sufrir fallas en la conducción y contractilidad debido al estrés oxidativo, incluso cuando su arquitectura tisular parece preservada en el análisis microscópico (174,175).

Así, el perfil bioquímico observado en nuestros modelos sugiere que, aunque la arquitectura tisular parezca conservada, existe un ambiente de estrés oxidativo y daño celular activo que compromete la funcionalidad cardíaca.

El estudio de la fase crónica de la infección plantea desafíos metodológicos complejos, donde la marcada heterogeneidad en la presentación de los síntomas clínicos representan variables difíciles de controlar que impactan directamente en la potencia de los análisis estadísticos. Además, cabe destacar que el número de animales de experimentación utilizados en esta etapa

exploratoria para seleccionar el modelo ha sido reducido, lo que sumado a la alta dispersión en los parámetros evaluados puede enmascarar diferencias significativas entre los grupos, convirtiendo la variabilidad de los síntomas en un obstáculo constante para la interpretación de los resultados.

A pesar de que la optimización de los primeros modelos permitiría ajustar los niveles de virulencia y profundizar en los parámetros de daño crónico, debido a los plazos de ejecución del proyecto de tesis se optó por la selección de los modelos por vía intradérmica y oral para continuar con el segundo objetivo. Esta decisión se fundamenta en que ambos binomios, una vez establecida la cronicidad, lograron desarrollar alteraciones eléctricas, así como también incrementos significativos en los marcadores séricos de daño. Particularmente en el caso del modelo oral, pese a de presentar una infectividad menor a la esperada, la presencia de lesiones cardíacas histológicas lo consolida como un modelo válido para la evaluación integral de la patología.

Capítulo 2:

Eficacia terapéutica comparada de la vacuna mucosal (TSNt–c-di-AMP) y sistémica (TSNt–ISPA) en modelos murinos de infección crónica por *T. cruzi*.

2.1) Introducción

El mayor desafío terapéutico en la enfermedad de Chagas reside en la fase crónica, donde la persistencia del parásito en tejidos de difícil acceso y una inflamación sostenida derivan en la miocarditis fibrosante (41). En este contexto, la vacunación terapéutica surge como una herramienta para modular el sistema inmune, buscando no solo el control de la carga parasitaria, sino también la mitigación del daño tisular mediado por la propia respuesta del hospedador.

El presente capítulo se centra en confirmar y cuantificar la efectividad de la vacunación terapéutica basada en un fragmento recombinante de la trans-sialidasa (TSNt) en los dos modelos de infección crónica seleccionados previamente como los más idóneos: el modelo de infección oral y el modelo de infección intradérmica. El éxito de estas estrategias se evalúa mediante la disminución significativa de la carga parasitaria y la mitigación de las lesiones cardíacas, parámetros críticos para detener la progresión de la enfermedad de Chagas.

En nuestro grupo, junto con el de la Dra Perez del IDICER (Rosario, Argentina), hemos desarrollado una vacuna nasal basada en la hipótesis de que podría brindar protección no solo frente a infecciones transmitidas por la picadura del vector o por transfusión, sino también frente a aquellas adquiridas por vía oral a través de alimentos contaminados. Este enfoque aprovecha la capacidad de la inmunización nasal para estimular respuestas tanto sistémicas como mucosales en puntos clave de entrada, como la conjuntiva y la cavidad bucal. Dicha estrategia adquiere una relevancia crítica ante el cambio epidemiológico observado en las últimas dos décadas, donde la transmisión oral ha consolidado al Chagas como una enfermedad de transmisión por alimentos de alta gravedad clínica y mortalidad (21,35,36). Ante la necesidad de desarrollar herramientas eficaces para el manejo de estas infecciones, en este capítulo se evalúa la respuesta terapéutica utilizando precisamente los modelos de infección oral e intradérmico.

Diversos investigadores han validado la eficacia de la vía intranasal utilizando diversos candidatos vacunales y sistemas de adyuvantes (115,117,176). Por un lado, se ha demostrado que la trans-sialidasa (TS) administrada como vacuna de subunidad proteica, en combinación con el adyuvante CpG (un ligando de TLR9), es capaz de inducir una respuesta inmunitaria mucosal profiláctica robusta (177). Estos estudios evidenciaron que la inmunización nasal con TS y CpG genera anticuerpos IgA secretora en las mucosas, los cuales son capaces de opsonizar al parásito e inhibir su invasión inicial en sitios de entrada como la conjuntiva (176). Por otro

lado, se ha explorado el uso de la proteína de superficie de amastigote ASP2 mediante el empleo de vectores virales recombinantes, como el virus de Sendai. En esta estrategia, el propio vector viral actúa como un potente adyuvante natural al ser reconocido por receptores de inmunidad innata, activando una respuesta de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y altos niveles de IFN- γ tras una única dosis nasal (178).

Más recientemente, se ha avanzado hacia el uso de antígenos quiméricos que integran regiones inmunogénicas de ASP2, cruzipaina y la TS, como es el caso del inmunógeno Traspain. La administración nasal de Traspain, combinada con el adyuvante c-di-AMP, ha demostrado una protección superior al inducir una inmunidad celular polifuncional. Este esquema permitió la generación de linfocitos T específicos, la reducción de la carga parasitaria en tejidos y previno el desarrollo de alteraciones cardíacas durante la fase crónica de la infección (115).

En cuanto a nuestra estrategia, la formulación diseñada utiliza el fragmento recombinante de la TS (Grupo 1) combinado con c-di-AMP. Como se describió previamente, este segundo mensajero bacteriano actúa como un potente adyuvante inmunomodulador al activar la vía STING, promoviendo la maduración de células dendríticas y una respuesta adaptativa integral (179). Esta combinación (TSNt+A) ha demostrado ser eficaz en la inducción de protección tanto local como sistémica.

Los antecedentes de nuestro grupo en un contexto preclínico (145) confirman la viabilidad de este enfoque. La administración nasal de TSNt+A no solo atenuó las manifestaciones clínicas en la fase aguda de la infección oral, sino que su protección se extendió a la fase crónica. Dicha protección mostró en una clara reducción de la miocarditis crónica, la fibrosis y las alteraciones electrocardiográficas funcionales. Este efecto se asoció con una disminución en la expresión de la citocina profibrótica TGF- β (145). Asimismo, la formulación TSNt+A indujo una respuesta robusta en el tejido linfoide asociado a la mucosa nasal (NALT), influyendo tanto en las respuestas inmunes humorales como celulares sistémicas, y reduciendo significativamente la parasitemia y la carga parasitaria en corazón, músculo esquelético e intestino, junto con marcadores de daño hepático y muscular. En conjunto, estos resultados demuestran la factibilidad de desarrollar una vacuna mucosal contra *T. cruzi* basada en TS y c-di-AMP, capaz de mitigar la progresión de la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) (145).

Dada la evidencia que respalda el efecto beneficioso de la vacunación profiláctica con TSNt+A sobre la fase crónica de la infección —y considerando que la mayoría de los pacientes con enfermedad de Chagas son diagnosticados en esta etapa—, también nos propusimos evaluar su potencial como herramienta terapéutica. Con este objetivo, comparamos el grado de protección

frente a la progresión de la enfermedad crónica, así como las respuestas inmunes asociadas, inducidas por estrategias de vacunación profiláctica versus terapéutica. Cabe destacar que las vacunas terapéuticas no fueron analizadas en los estudios de vacunación por mucosas previamente mencionados, y en particular en la vía nasal, por lo que esta aproximación constituye un aporte original al campo.

Cabe aclarar que, si bien en el marco de una colaboración entre los laboratorios de Santa Fe y Rosario se realizó una comparación directa entre los esquemas profiláctico y terapéutico (180), en este trabajo se exponen y analizan exclusivamente los resultados correspondientes a la eficacia de la estrategia terapéutica. Los datos relativos a la comparación con la administración profiláctica en términos de protección crónica no se incorporan aquí por haber sido publicados de manera independiente, permitiendo así que este capítulo se centre en la validación del efecto terapéutico.

En paralelo, evaluamos la eficacia de una estrategia de vacunación sistémica por vía subcutánea. Esta vía busca determinar si la reactivación de la inmunidad celular es suficiente para detener la progresión del daño cardíaco en un escenario que imita el contacto sistémico tras la infección por vectores. Para ello utilizamos el adyuvante ISPA, desarrollado en nuestro laboratorio, el cual optimiza la presentación del antígeno mediante su estructura de partículas lipídicas, favoreciendo una respuesta celular eficaz sin la necesidad de dosis elevadas de inmunógeno.

La eficacia de esta formulación de subunidad ha sido validada previamente por nuestro grupo, tanto en modelos profilácticos como terapéuticos. En un modelo profiláctico, utilizando adyuvantes de estructura similar a ISPA (ISCOMATRIX), la vacunación indujo una respuesta Th1 con producción de IgG2a, perfil que resultó determinante para controlar la carga parasitaria y reducir la miocarditis (104).

Por otro lado, la capacidad terapéutica de la combinación TSNT-ISPA fue confirmada en modelos de infección crónica con diferentes linajes de *T. cruzi* (Sylvio X10/4 y Tulahuen cl2) (81). En dichas investigaciones, la administración subcutánea de tres dosis logró reducir significativamente la parasitemia tisular, la inflamación y la fibrosis miocárdica.

En ambos modelos, los beneficios inmunológicos se tradujeron en una disminución del área de fibrosis y una mejora en los parámetros electrocardiográficos, lo que redujo notablemente la incidencia de arritmias en los animales tratados.

Por lo tanto, este capítulo se propone profundizar en la comparación de la vía sistémica consolidada frente a la vía mucosal. El objetivo es validar ambas estrategias terapéuticas en modelos murinos de infección crónica, utilizando diferentes vías de entrada del parásito,

permitiendo determinar la versatilidad de estas herramientas inmunológicas frente a la complejidad de la enfermedad de Chagas.

2.II) Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto terapéutico de las vacunas nasal y subcutánea en los modelos de infección seleccionados en el Capítulo 1.

Objetivos particulares

- Evaluar la vacuna nasal (TSNt + c-di-AMP) en el modelo crónico de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén cl2.
- Evaluar la vacuna subcutánea (TSNt + ISPA) en el modelo crónico de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén cl2.

2.III) Métodos

A continuación, se describen los materiales y métodos utilizados para el estudio de la inmunoterapia con Transialidasa en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*. El estudio se estructuró en dos modelos experimentales (infección oral e intradérmica), evaluando la eficacia del tratamiento a través de parámetros electrofisiológicos, parasitológicos e inmunológicos en puntos temporales preestablecidos antes y después de la intervención terapéutica.

2.III.1) Animales de experimentación

Al igual que en el capítulo anterior, se utilizaron ratones hembra BALB/c de 6–8 semanas de edad, adquiridos y mantenidos bajo las mismas condiciones de bioterio. La manipulación de los animales se realizó siguiendo los lineamientos institucionales para su utilización y a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, con aprobación del Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la FBCB-UNL (protocolo n.º CE2018-42).

2.III.2) Parásitos

Para los experimentos realizados en este capítulo se utilizaron tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* exclusivamente cepa Tulahuen cl2. Los parásitos fueron obtenidos a partir de ratones Cb1 infectados mantenidos en el Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER), que gentilmente cedió los animales para cada ensayo.

La obtención, purificación, recuento y ajuste de la concentración de tripomastigotes se realizó siguiendo el protocolo específico descrito en el Capítulo 1 para la cepa Tulahuen cl2.

2.III.3) Infección

Para el establecimiento de los modelos terapéuticos se utilizaron dos vías de infección, ambas empleando tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* viables de la cepa Tulahuen cl2.

En el modelo de infección oral —correspondiente al esquema tratado mediante vacunación intranasal— los ratones BALB/c fueron infectados por vía oral al inicio del experimento con una dosis de 3000 tripomastigotes en un volumen total de 50 µL de solución fisiológica estéril.

En el modelo de infección intradérmica —correspondiente al esquema tratado mediante vacunación subcutánea— los ratones BALB/c fueron infectados al inicio del experimento mediante la inoculación de 1000 tripomastigotes en la almohadilla plantar de cada animal, utilizando un volumen final de 10 µL de solución fisiológica estéril.

En ambos modelos, el día de infección se definió como el día cero postinfección (0 dpi), a partir del cual se contabilizaron todos los tiempos experimentales. La infección de todos los animales se confirmó a los 14 dpi mediante microscopía directa de sangre periférica. Una vez verificada, los ratones se redistribuyeron aleatoriamente entre los diferentes grupos experimentales antes de iniciar los tratamientos terapéuticos.

2.III.4) Expresión y purificación del antígeno recombinante TSnt

Como principal antígeno para la elaboración de las formulaciones vacunales de este trabajo, se utilizó un fragmento amino-terminal de la proteína Trans-sialidasa, denominado TSnt. Este fragmento de 35 kDa fue clonado previamente durante un trabajo de tesina de grado (181), abarcando desde el aminoácido 63 al 346 según la secuencia de referencia GenBank: AJ276679.1. Los cebadores para su obtención fueron diseñados para generar un fragmento de aproximadamente 800-900 pb sin la región SAPA, buscando no solo un candidato vacunal óptimo, sino también un tamaño accesible para su clonación y expresión en un sistema procariota.

Para la producción de la proteína, se utilizó el sistema de expresión del vector pET-28a(+) (Novagen™), el cual permite la purificación selectiva mediante una etiqueta de histidinas. Este plásmido fue transformado en células de *E. coli* BL21 (DE3), cepa elegida por su capacidad de transcribir eficientemente el vector mediante la T7 ARN polimerasa (portada en el profago λDE3) y por su deficiencia en proteasas, garantizando así la estabilidad del antígeno.

Posteriormente, se realizó un *screening* de los clones para identificar aquellos con mayor capacidad de producción. La expresión del fragmento se indujo con IPTG 0,1 mM durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante. La verificación de la producción de TSnt se realizó mediante SDS-PAGE al 15% (ver Anexo) en condiciones desnaturalizantes, empleando el marcador de peso molecular ProteinRuler® II (TransGen Biotech Co). Las muestras fueron preparadas por ebullición en buffer de muestra para SDS-PAGE (ver Anexo) y los geles se visualizaron mediante tinción con Azul de Coomassie (ver Anexo).

Una vez seleccionado el clon de mejor desempeño, se escaló el proceso a un volumen de 100 ml de medio LB. Tras la recuperación del pellet bacteriano, se procedió a la lisis celular por sonicación en frío con un Vibra-Cell (Sonic & Material Inc) hasta la clarificación del cultivo. Debido a que el fragmento TSnt se obtiene de forma insoluble en este sistema, los cuerpos de inclusión se resuspendieron en PBS-urea 8M. La purificación se llevó a cabo por cromatografía

de afinidad por ion metal inmovilizado (IMAC) utilizando columnas de Ni-NTA Agarosa (R901-15, Invitrogen™), mediante un gradiente de imidazol (20-500 mM).

Finalmente, las fracciones que contenían la proteína de interés se reunieron y concentraron con filtros Vivaspin® 20 (Sartorius) (MWCO 10.000 Da) mediante centrifugación a 8.000 g. La cuantificación del antígeno TS_{Nt} se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA) a 562 nm en un espectrofotómetro (Biotraza), empleando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) como referencia para la estandarización de las dosis de inmunización.

2.III.5) Esquemas terapéuticos de vacunación

Los esquemas terapéuticos se desarrollaron en dos modelos experimentales: infección oral tratada mediante vacunación intranasal e infección subcutánea tratada mediante vacunación intradérmica. En ambos casos, los animales fueron asignados a grupos infectados o no infectados y recibieron, según correspondiera, el tratamiento vacunal o únicamente buffer fosfato salino (PBS) administrado por la misma vía que el tratamiento y en las mismas fechas que el tratamiento.

2.III.5) a) Modelo oral – Vacunación intranasal

Para el modelo con infección oral, los ratones BALB/c fueron asignados a los grupos descritos en la Tabla 4 y Figura 25: TS_{MO}, Tc1_{MO}, Tc2_{MO}, NI1_{MO} y NI2_{MO} (n = 5–7 por grupo). Los grupos NI1_{MO} y NI2_{MO} se utilizaron como controles no infectados, mientras que Tc1_{MO} y Tc2_{MO} fueron controles infectados sin tratamiento que recibieron únicamente PBS. El grupo TS_{MO} fue infectado y tratado con la formulación intranasal compuesta por 10 µg de TS_{Nt} y 5 µg c-di-AMP (en 20 µL finales por dosis).

Para el experimento aquí descrito, se seleccionó la formulación basada en c-di-AMP, decisión fundamentada en evidencias obtenidas de manera simultánea mediante estudios colaborativos con el grupo de la Dra. Ana Rosa Pérez (IDICER-CONICET-UNR) (106).

El cronograma de trabajo se ejecutó en dos etapas: En la primera, los grupos Tc1_{MO} y NI1_{MO} fueron sacrificados a los 54 dpi para obtener parámetros basales previos al tratamiento. En la segunda etapa, se inició el esquema terapéutico para el grupo TS_{MO} a los 69 dpi, que consistió en tres inmunizaciones intranasales administradas a los 69, 84 y 99 dpi; durante esas mismas fechas, los grupos NI2_{MO} y Tc2_{MO} recibieron PBS por la misma vía. Las muestras posteriores al tratamiento y el sacrificio de los grupos TS_{MO}, NI2_{MO} y Tc2_{MO} se realizaron a los 135 dpi.

Tabla 4: Grupos experimentales para la formulación intranasal TSnt + c-di-AMP en el modelo de infección oral BALB/c - Tulahuen cl2. Se especifica el tamaño muestral (n), la condición de infección, el tratamiento administrado y el día de sacrificio (*end-point*).

Grupos		n	Infección	Tratamiento	End-point
TS _{MO}		7	Si	TSnt + c-di-AMP	135 dpi
Tc _{MO} Controles infectados	Tc1 _{MO}	6	Si	Solución salina	54 dpi
	Tc2 _{MO}	6	Si	Solución salina	135 dpi
NI _{MO} Controles sanos	NI1 _{MO}	5	No	Solución salina	54 dpi
	NI2 _{MO}	5	No	Solución salina	135 dpi

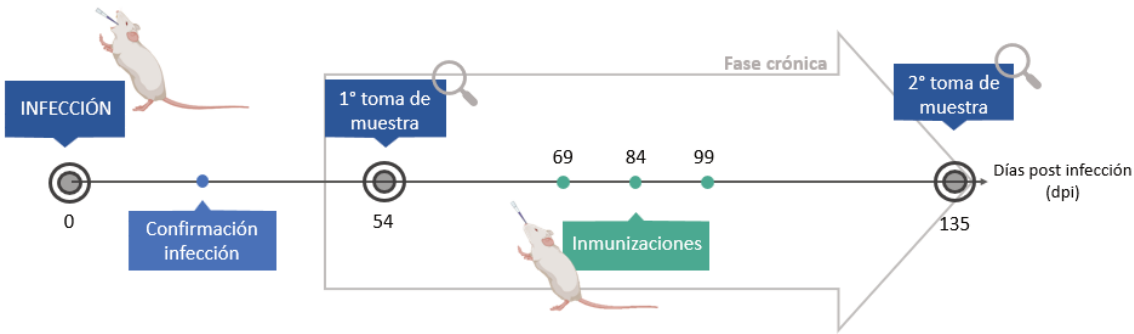


Figura 25: Esquema de trabajo empleado para la evaluación terapéutica de la formulación nasal TSnt + c-di-AMP en el modelo de infección oral BALB/c - Tulahuen cl2: Representación cronológica del protocolo que incluye la evaluación basal pre-tratamiento (54 dpi) y final post-tratamiento (135 dpi). Se indican los puntos de administración de las tres dosis intranasales del esquema terapéutico.

2.III.5) b) Modelo intradérmico – Vacunación subcutánea

En el modelo de infección intradérmico, los animales fueron organizados en cinco grupos (n = 5) detallados en la Tabla 5 y Figura 26: NI1_{MI} y NI2_{MI} como controles no infectados; Tc1_{MI} y Tc2_{MI} como controles infectados sin tratamiento que recibieron PBS por vía subcutánea; y TS_{MI} como grupo infectado y tratado mediante la formulación TSnt-ISPA (10 µg de TSnt y 3 µl de ISPA en un volumen final de 100 µL).

El cronograma experimental se dividió en dos etapas. Los grupos Tc1_{MI} y NI1_{MI} fueron sacrificados a los 96 dpi para obtener las muestras previas al tratamiento. En una segunda etapa, los animales del grupo TS_{MI} recibieron tres dosis subcutáneas a los 100, 110 y 120 dpi, mientras que los grupos NI2_{MI} y Tc2_{MI} recibieron PBS por la misma vía y en las mismas fechas. Finalmente, los grupos TS_{MI}, NI2_{MI} y Tc2_{MI} fueron sacrificados a los 135 dpi, luego de completado el esquema

terapéutico.

Tabla 5: Grupos experimentales para la formulación subcutánea TSnt + ISPA en el modelo de infección intradérmica BALB/c - Tulahuen cl2. Se presenta la distribución de los ratones BALB/c, especificando el tamaño muestral (n), la condición de infección, el tratamiento administrado por vía subcutánea y el tiempo de sacrificio (*end-point*).

Grupos		n	Infección	Tratamiento	End-point
TS _{MI}		5	Si	TSnt + ISPA	135 dpi
Tc _{MI} Controles infectados	Tc1 _{MI}	5	Si	Solución salina	96 dpi
	Tc2 _{MI}	5	Si	Solución salina	135 dpi
NI _{MI} Controles sanos	NI1 _{MI}	5	No	Solución salina	96 dpi
	NI2 _{MI}	5	No	Solución salina	135 dpi

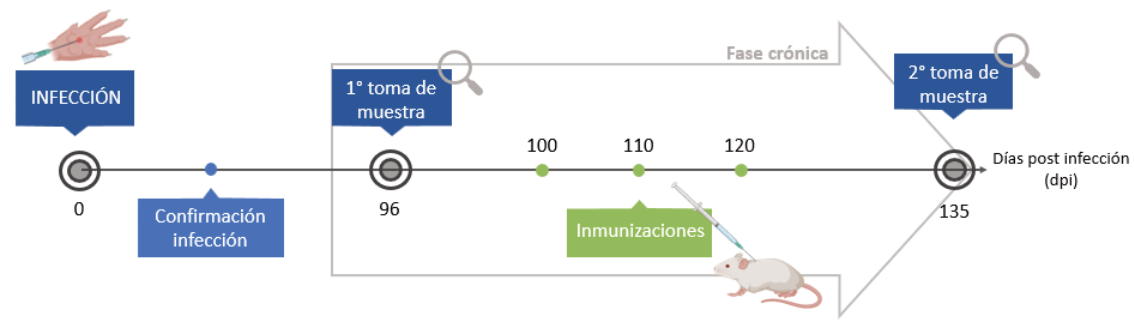


Figura 26: Esquema de trabajo empleado para la evaluación terapéutica de la formulación subcutánea TSnt + ISPA en el modelo de infección intradérmico BALB/c- Tulahuen cl2: Representación cronológica del protocolo que incluye la evaluación basal pre-tratamiento (96 dpi) y final post-tratamiento (135 dpi). Se indican los puntos de administración de las tres dosis subcutáneas del esquema terapéutico.

2.III.6) Histopatología

El procesamiento histológico y el análisis histopatológico se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1. Los corazones fueron extraídos a los 54 o 96 y 135 dpi. Los cortes histológicos (5 µm) fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para la evaluación de infiltrados inflamatorios y daño tisular, y con rojo de picrosirius para el análisis de fibrosis. En este estudio, la inflamación y la fibrosis se evaluaron y analizaron de manera independiente, asignando a cada parámetro un score de 0 a 3 (normal, leve, moderado o severo) según los criterios ya detallados. Este enfoque permitió caracterizar de forma específica el efecto de la intervención sobre cada tipo de lesión tisular.

2.III.7) Cuantificación de la carga parasitaria

Los tejidos (corazón, músculo e intestino) se recolectaron al momento del sacrificio de cada grupo experimental y se seccionaron transversalmente en tres partes. Una de ellas se utilizó para determinar la carga parasitaria mediante PCR cuantitativa (qPCR). La extracción de ADN se realizó según el método previamente descrito (182). En resumen, el ADN total se extrajo tras la desagregación tisular en un tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,1 M NaCl; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 300 µg/mL proteinasa K; Sigma). Las muestras se incubaron a 55 °C durante 2 h y se sometieron a dos extracciones con una mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma Chemical Co., EE. UU.). El ADN se precipitó añadiendo etanol frío (AAPER Alcohol and Chemical Co., Shelbyville, KY, EE. UU.) al doble del volumen de la muestra, seguido de incubación a -80 °C durante la noche. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 min, se lavaron con etanol al 70%, se secaron al vacío y se resuspendieron en agua estéril. Las concentraciones de ADN se ajustaron a 125 ng/µL para su uso como plantilla en las reacciones de qPCR.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis Biodyne) en un sistema StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). Se emplearon cebadores específicos para la amplificación del kADN de *T. cruzi* (S36: 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT G-3' y S67rev: 5'-GAA CCC CCC TCC CAA AAC C-3'). La curva de cuantificación de *T. cruzi* se generó siguiendo la metodología de Prochetto et al. (81), y se construyó una curva estándar para la cuantificación de ADN murino, utilizando los cebadores específicos descritos por Cummings y Talenton (182). La carga parasitaria se expresó como parásitos equivalentes por 250 ng de ADN murino.

2.III.8) Evaluación electrocardiográfica

Las alteraciones electrocardiográficas se evaluaron siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1. Los registros se realizaron en los puntos temporales definidos como pretratamiento (54 dpi para el modelo de infección oral y 96 dpi para el modelo intradérmico) y al finalizar el ensayo (135 dpi para ambos modelos). Se analizaron los siguientes parámetros: frecuencia cardíaca, onda P y los intervalos PR, QRS y QT, incluyendo la corrección del intervalo QT (QTc) (ver Figura 10, Capítulo 1). La detección de anomalías arrítmicas se realizó sobre las derivaciones I y II, y la presencia de arritmias se expresó como la proporción de animales que presentaron alguna alteración electrocardiográfica dentro de cada grupo.

2.III.9) Enzimas y Biomarcadores Cardíacos y Hepáticos

La actividad sérica de las enzimas Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT/AST), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT/ALT) y de la isoenzima Creatina Kinasa MB (CK-MB), así como la concentración de óxido nítrico (ON), se evaluaron en los puntos temporales pretratamiento y postratamiento definidos para cada modelo experimental, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1.

Los resultados de GOT, GPT y CK-MB se expresaron en U/L, mientras que la concentración de óxido nítrico se expresó en mmol/L.

2.III.10) Perfil de citocinas cardíacas por RT-qPCR

El perfil de citocinas se analizó en el corazón para el modelo oral a los 54 y 135 dpi. En resumen, un tercio de una sección transversal del corazón se homogeneizó mecánicamente en TRI-Reagent® (Sigma-Aldrich, EE. UU.). El ARN se retrotranscribió a cDNA utilizando RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo-Fisher Scientific, EE. UU.). La PCR en tiempo real se realizó en un equipo StepOnePlus (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE. UU.) utilizando Mix-5x-HOT-FIREPol®EvaGreen® qPCR-Mix Plus con ROX (Solis-BioDyne, Tartu, Estonia). El programa de amplificación incluyó una activación inicial a 95 °C por 15 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineamiento entre 59–62 °C y elongación a 72 °C por 20 s. La fluorescencia se registró al final de cada paso de extensión, y la especificidad de la amplificación se verificó mediante el análisis de la curva de disociación de los productos finales. La expresión génica relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (22, 23), usando la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia endógeno. Se confirmó que las eficiencias de amplificación fueran idénticas o similares entre los genes blanco y de referencia. Los cebadores utilizados se listan en la Tabla 6.

Tabla 6: Primers utilizados para el análisis de perfiles de citocinas y factores de transcripción mediante RT-qPCR.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IFN- γ	AGACAATCAGGCCATCAGCAAC	CTCATTGAATGCTTGGCGCTG
IL-17a	CAAAGCTCAGCGTGTCCAAA	CTCCCAGATCACAGAGGGATA
TGF- β	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	GGTTCATGTCATGGATGGTGC
IL-10	CAAGCCTTATCGGAAATGATCCA	CCTTGTAGACACCTTGGTCTTG
Foxp3	AAAGGAGAAGCTGGGAGCTATG	GTGGCTACGATGCAGCAAGAG
T-bet	AGCTCACCAACAACAAGGGG	CTGCGTTCTGGTAGGCAGTC
GAPDH	GAAGGTCGGTGTGAACGGAT	CGTTGAATTTGCCGTGAGTGGA

2.III.11) Detección de anticuerpos específicos en plasma

Las muestras de sangre se recolectaron al momento del sacrificio de los animales en ambos modelos para evaluar los niveles de anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2a. El plasma se obtuvo por centrifugación de sangre heparinizada a 2000 rpm y se almacenó a -20°C hasta su uso. La presencia de anticuerpos específicos se evaluó mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) indirecto, utilizando microplacas Nunc-Immuno Maxisorp™ de 96 pocillos de fondo plano (Thermo, Waltham, MA, EE. UU.). Las placas se sensibilizaron durante la noche a 4°C con $0,5\text{ }\mu\text{g/pocillo}$ del antígeno correspondiente, ya fuera TSNT recombinante purificada, homogenato total de *T. cruzi* (TH) o homogenato de tejido cardíaco murino, todos preparados en solución de sensibilización (ver Anexo).

El homogenato cardíaco se obtuvo a partir de corazones de ratones BALB/c sanos. Los tejidos se homogeneizaron por disrupción mecánica en tampón RIPA con cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), sometidos a ciclos de congelamiento-descongelamiento para asegurar la lisis completa, centrifugados a $14.000 \times g$ durante 5 min y finalmente se recuperó el sobrenadante. La concentración proteica se determinó mediante Pierce™ BCA Protein Assay (#A55865), siguiendo las indicaciones del fabricante, y la absorbancia se midió a 560 nm en un lector BioTek.

Al día siguiente, todas las placas se lavaron con la solución de lavado (ver Anexo), se bloquearon con $200\text{ }\mu\text{l}$ por pocillo de la solución de bloqueo (ver Anexo) y se incubaron durante 1 h a 37°C . Los plasmas murinos se diluyeron 1:100 en la solución de incubación (ver Anexo), se sembraron por duplicado y se incubaron durante 1 h a 37°C . Luego de un nuevo ciclo de lavados, se añadieron los anticuerpos secundarios de cabra correspondientes (anti-ratón IgG, IgG1 o IgG2a, conjugados a HRP; Abcam), en las diluciones indicadas para cada ensayo (1:10.000 o 1:20.000), y se incubaron durante 1 h a 37°C .

La reacción se reveló mediante TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) (Life Technologies™) y se detuvo con la solución de frenado (ver Anexo), según el procedimiento estandarizado. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de ELISA (Molecular Device Emax).

Los valores de corte se calcularon como la media de las DO de los controles negativos (NI), más dos desviaciones estándar. Los niveles de anticuerpos se expresaron como un índice obtenido al dividir la DO de cada muestra por su respectivo valor de corte.

2.III.12) Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas. Las diferencias entre

múltiples grupos se evaluaron mediante el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para las comparaciones post hoc. Cuando correspondió, las comparaciones entre dos grupos independientes se efectuaron utilizando el test U de Mann-Whitney. Para el análisis de variables categóricas, se utilizó el Test Exacto de Fisher.

Los datos se presentan como media $\pm$ SEM o como mediana y rango, de acuerdo con la naturaleza de la variable analizada. El procesamiento estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.), estableciéndose un nivel de significancia de $p < 0,05$.

2.IV) Resultados

Los resultados presentados en este capítulo se organizan en dos tipos de experimentos: (1) el tratamiento con vacuna nasal en el modelo oral; (2) el tratamiento con vacuna subcutánea en el modelo intradérmico.

Cabe destacar que, para facilitar la interpretación de las figuras correspondientes a los distintos experimentos, los grupos experimentales fueron identificados mediante un subíndice MO o MI según el experimento al que pertenecen (1 o 2 respectivamente).

2.IV.a) Modelo de infección oral y vacuna nasal: BALB/c-Tulahuen cl2. Evaluación Inmunológica del tratamiento terapéutico con TSNT-c-diAMP

2.IV.a.1) Daño cardíaco en la etapa crónica

La fibrosis y el infiltrado inflamatorio se evaluaron en todos los grupos del modelo oral y se analizaron cuantitativamente (Figuras 27A, C, respectivamente), como valores promedio de los puntajes. Imágenes representativas de las secciones histológicas teñidas se muestran en las Figuras 27B y D.

En comparación con el grupo NI_{MO}, los animales Tc1_{MO} y Tc2_{MO} presentaron los cambios más marcados. El análisis histológico del tejido cardíaco de los animales infectados reveló diferencias estadísticamente significativas en los puntajes de lesión en el grupo vacunado (TS_{MO}) y su control no vacunado (Tc1_{MO} y Tc2_{MO}), lo que indica que el tratamiento redujo la severidad de la miocarditis (Figuras 2C) y de la fibrosis (Figuras 2A).

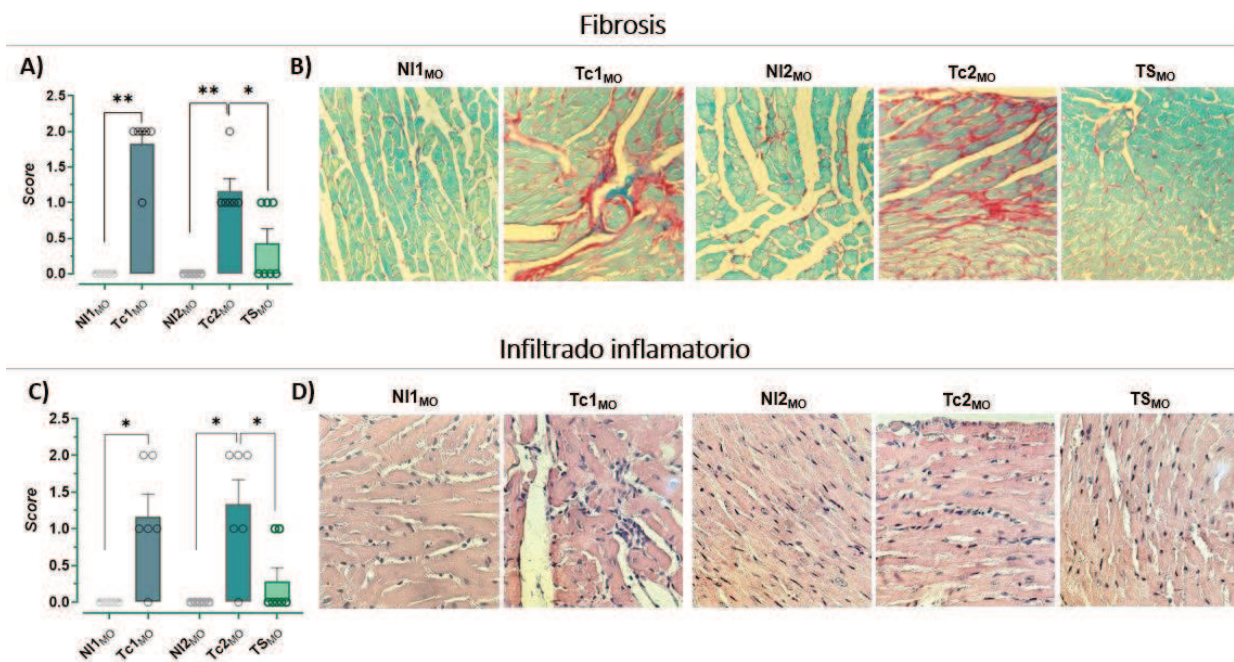


Figura 27: Análisis histológico cardíaco para evaluar la eficacia de la vacuna terapéutica en el modelo de infección oral. El análisis histopatológico clasificó las lesiones según su severidad en normal, leve o moderada. Se presentan los puntajes cuantitativos de daño correspondientes a **A)** fibrosis e **C)** intensidad de infiltrados inflamatorios. Se incluyen micrografías representativas de las secciones tisulares tomadas a 40x: **B)** fibrosis; **D)** infiltrados inflamatorios. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

2.IV.a.2) Carga parasitaria en tejido cardíaco

La carga parasitaria cardíaca en la etapa crónica de los grupos infectados no vacunados (Tc1_{MO} y Tc2_{MO}) fue baja (con valores <0.5 parásito eq/250 ng de ADN) (Figura 28). A pesar de la baja carga parasitaria general, pudo observarse una reducción significativa en los ratones tratados con la vacuna terapéutica (Figura 28).

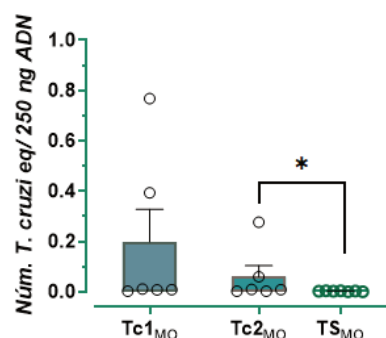


Figura 28: Evaluación de la carga parasitaria cardíaca para determinar la eficacia de la vacuna terapéutica en el modelo de infección oral. La carga parasitaria en el tejido se determinó mediante qPCR. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

2.IV.a.3) Mediciones de ECG y análisis de arritmias

Los parámetros onda P, QTc y QRS fueron analizados cuantitativamente como valores promedio en milisegundos (ms), y las arritmias fueron analizadas cualitativamente como la proporción de ratones afectados en cada grupo (Figura 29). Al comparar los grupos, solo se observó un prolongamiento notable del intervalo QTc en Tc1_{MO} vs NI1_{MO} en los registros de ECG realizados antes de la inmunización (54 dpi) (Figuras 29B). Sin embargo, las diferencias entre grupos a los 135 dpi no fueron significativas para estos parámetros. No se encontraron diferencias significativas entre grupos para los parámetros onda P y QRS.

El análisis de las arritmias, indicó que la proporción de animales afectados aumentó en los grupos infectados (Tc1_{MO} y Tc2_{MO}) en comparación con sus respectivos controles (NI1_{MO} y NI2_{MO}). Cabe destacar que la inmunización terapéutica tendió a revertir este efecto, disminuyendo el porcentaje de arritmias del 83.3% al 42.8% ($p = 0.0674$; Figura 29D), representando una reducción aproximada del 50%.

Es interesante el análisis de la evolución de las arritmias en el tiempo ya que, el grupo infectado Tc1_{MO}, analizado antes del inicio de la inmunización, presentó una incidencia de arritmias del 50%, la cual aumentó al 83.3% en el grupo Tc2_{MO} analizado a 135 dpi, aumento que no se observó en los ratones tratados (Figura 29D).

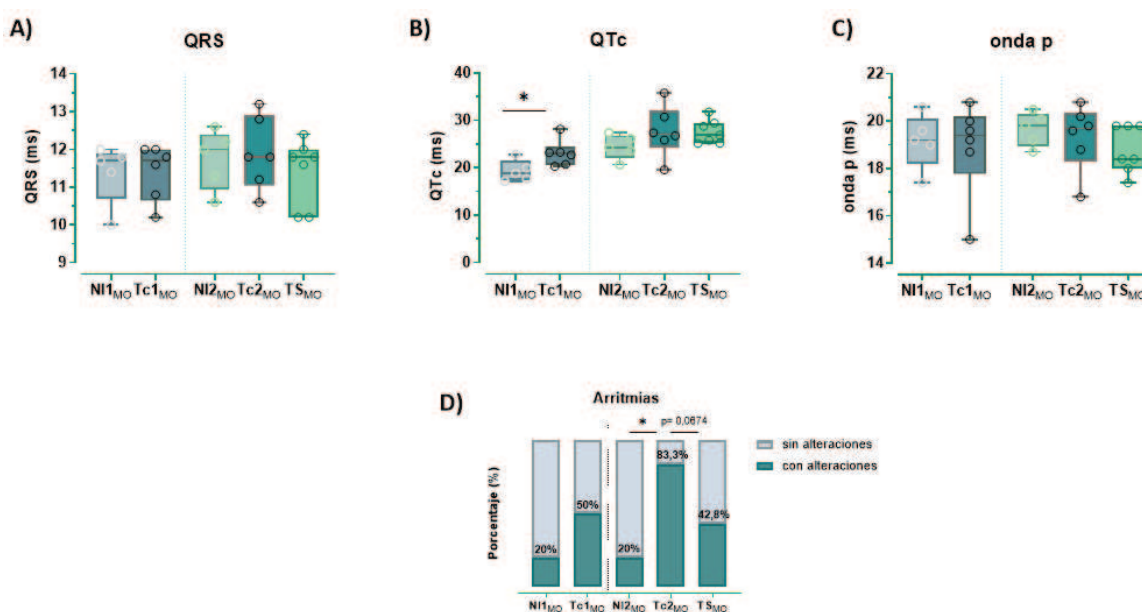


Figura 29: Alteraciones electrocardiográficas para la evaluación de la eficacia de la vacuna terapéutica en el modelo de infección oral. Se evaluó la funcionalidad eléctrica del corazón analizando los parámetros de conducción y el ritmo cardíaco. **A)** Duración del complejo QRS. **B)** Intervalo QT corregido (QTc). Los parámetros se expresan en milisegundos (ms). **C)** Duración de la onda P. **D)** Incidencia de arritmias detectadas en los grupos experimentales durante el esquema terapéutico. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

2.IV.a.4) Marcadores de daño tisular

Se cuantificó en suero ON como marcador del estado inflamatorio (Fig. 30D). Debido a problemas de procesamiento de las muestras no se pudo obtener suficiente cantidad de plasma para todas las determinaciones del grupo NI2_{MO} al día 135 pi. El grupo vacunado mostró una disminución significativa en los niveles de óxido nítrico. También se midieron los niveles de CK-MB en suero (Fig. 30C), observándose un incremento en los valores del grupo infectado al día 54 pi.

Se analizaron los niveles de las transaminasas glutámico pirúvica (GPT), glutámico oxalacética (GOT) en suero (Fig. 30A y 30B). Al igual que para ON, no se pudo procesar las muestras del grupo NI del día 135 pi para este marcador. En estos marcadores, para los grupos tratados y no tratado, a pesar de que algunos animales mostraron diferencias, los grupos no presentaron diferencias significativas debido la dispersión en los valores. Pudo observarse por tanto una mejora en los parámetros de inflamación a nivel sistémico señalados por ON y daño específico de corazón en las muestras de suero, aunque no pudo observarse diferencias en las transaminasas que marcan daño histológico correspondiente a otros tejidos.

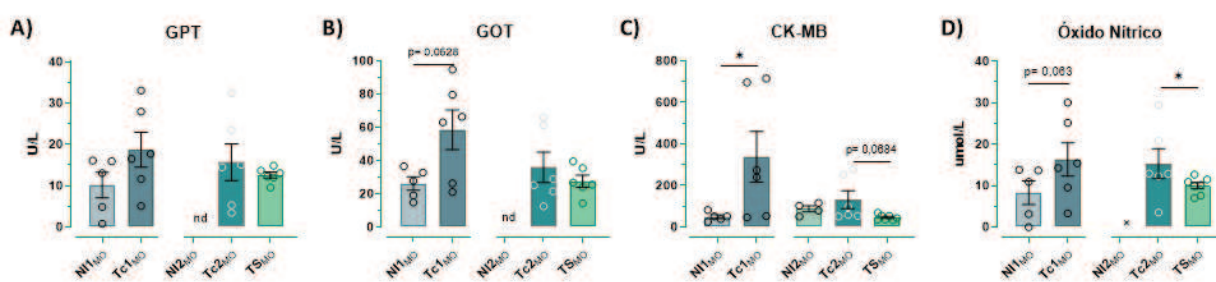


Figura 30: Marcadores séricos de daño tisular e inflamación para la evaluación de la eficacia de la vacuna terapéutica en el modelo de infección oral. Se cuantificaron los niveles de biomarcadores en suero para evaluar la integridad tisular y el estado inflamatorio sistémico. **A)** Concentración de Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT). **B)** Concentración de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT). **C)** Niveles de Creatina Quinasa MB (CK-MB) como marcador de daño cardíaco. **D)** Concentración de Óxido Nítrico (ON), indicador del estado inflamatorio sistémico. La cruz x indica que el grupo no fue evaluado. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

2.IV.a.5) Perfiles de expresión de citocinas y factores de transcripción cardíacos en la fase crónica

Como se muestra en la Figura 31, el análisis de la expresión génica en el tejido cardíaco del grupo crónicamente infectado (Tc1_{MO}) mostró un aumento de IFN- γ , IL-10, T-bet, junto con una tendencia al incremento de TGF- β ($p = 0,0887$), respecto a su control NI1_{MO}. Por el contrario, los

niveles de IL-17 y Foxp3 no mostraron alteraciones en este grupo.

Por su parte, el grupo Tc2_{MO} reveló un aumento significativo de TGF- β e IFN- γ , en comparación con su control no infectado (NI2_{MO}), acompañado de una mayor expresión de T-bet, en concordancia con la regulación positiva de IFN- γ . A diferencia de lo observado en Tc1_{MO}, en el grupo Tc2_{MO} los niveles de IL-10 se mantuvieron sin cambios, al igual que IL-17 y Foxp3.

Al evaluar el impacto del tratamiento, se observó que los niveles de TGF- β e IFN- γ y T-bet en los ratones vacunados (TS_{MO}) se mantuvieron similares a los de los ratones infectados no tratados (Tc2_{MO}), sin diferencias significativas. La vacunación terapéutica condujo a incrementos significativos en IL-17. Respecto a Foxp3, el grupo tratado presentó niveles significativamente superiores al control sano (NI2_{MO}) y, en comparación con Tc2_{MO}, se observó una tendencia al aumento ($p = 0.0903$). Los niveles de IL-10 fueron similares en estos los grupos, a pesar del aumento en Foxp3.

En conjunto, estos perfiles indican en la estrategia de inmunización un sesgo hacia una respuesta de tipo Th17.

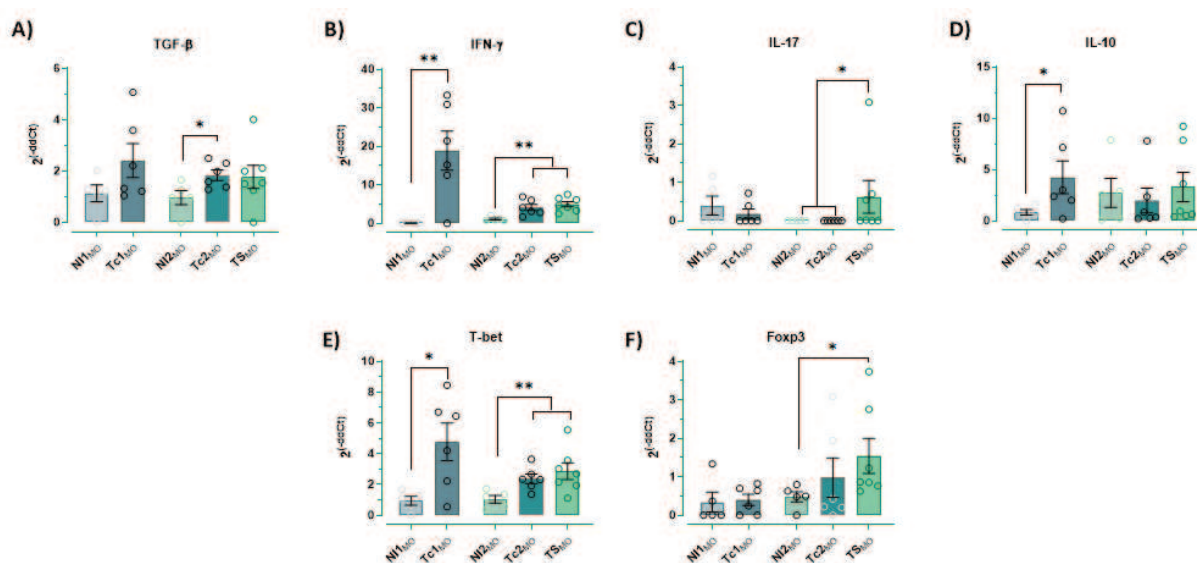


Figura 31: Perfil de respuesta inmune en el tejido cardíaco con la vacuna terapéutica en el modelo de infección oral. Se determinaron los niveles de expresión de citocinas y factores de transcripción en el tejido cardíaco mediante qPCR. Los paneles muestran la expresión relativa de: **A)** TGF- β ; **B)** IFN- γ ; **C)** IL-17; **D)** IL-10; **E)** T-bet; y **F)** Foxp3. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al control no infectado (NI).

2.IV.a.6) Respuesta de anticuerpos en la fase crónica

Los niveles de anticuerpos específicos contra TS en los ratones no vacunados se mantuvieron

similares entre el punto previo al tratamiento a los 54 dpi y los 135 dpi (Tc1 vs Tc2; IgG1: $p = 0,4178$; IgG2a: $p = 0,2279$; e IgG total: $p = 0,2424$). Los niveles de IgG total e IgG1 específicos contra TS fueron significativamente más altos en el grupo TS_{MO} que en los ratones Tc2_{MO} (Figuras 32A, B). Para IgG2a, los niveles de anticuerpos específicos contra TS tendieron a ser mayores en los ratones vacunados TS_{MO} respecto a los Tc2_{MO}, pero sin alcanzar significancia estadística (Figura 32C).

Como era esperado, durante la etapa crónica de la infección, todos los ratones infectados desarrollaron anticuerpos contra el homogenato total del parásito (HT) (Figuras 32D–F). Los ratones vacunados TS_{MO} mostraron niveles de IgG total e IgG1 específicas contra TH similares a los de los grupos no vacunados Tc2 (Figuras 32D y F). Cabe destacar que, en los tratamientos, los ratones vacunados exhibieron respuestas anti-TH específicas de IgG2a más bajas que el grupo infectado no vacunado (Figura 32F).

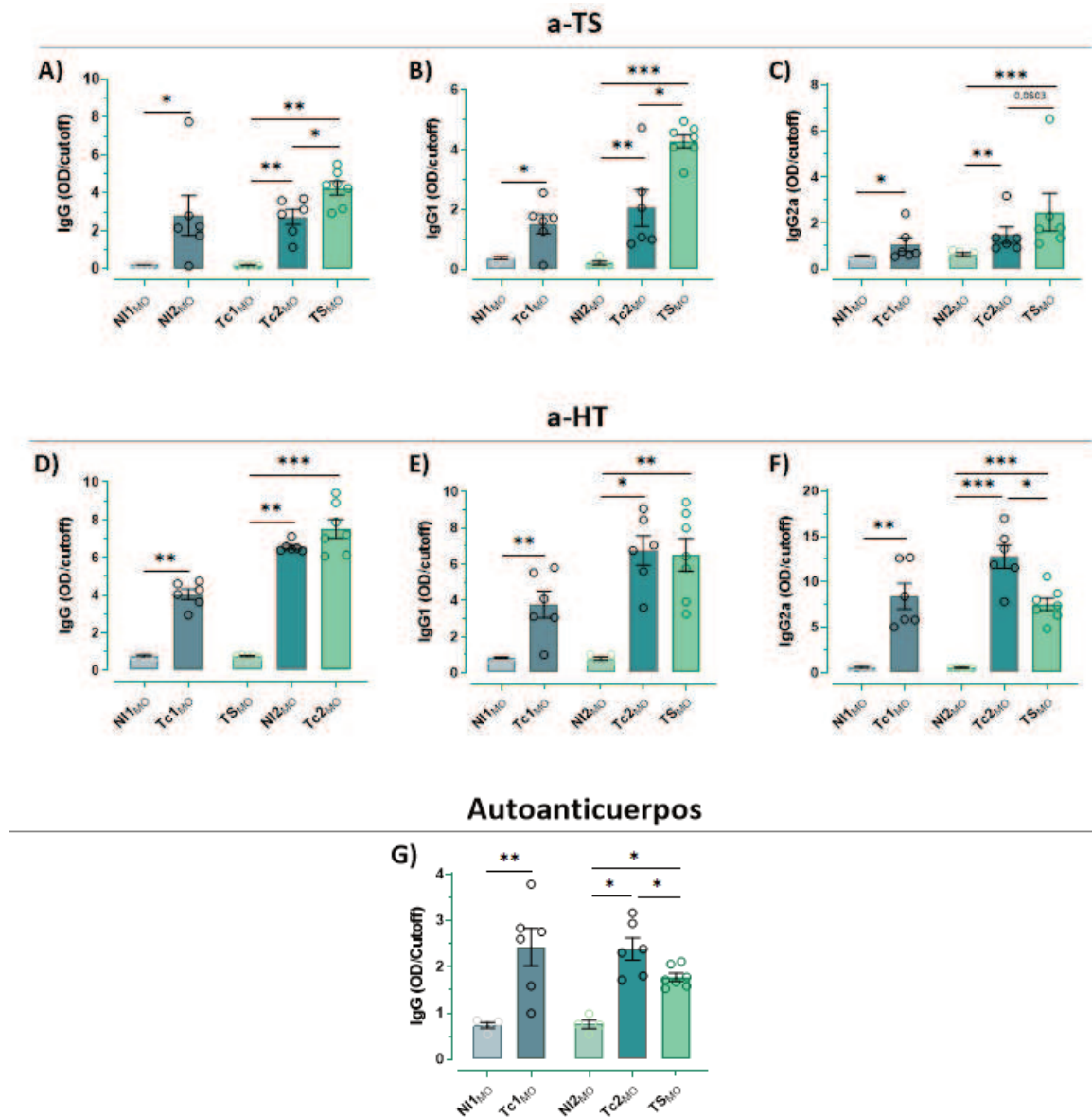


Figura 32: Evaluación de la respuesta inmune en suero de la vacuna terapéutica nasal en el modelo de infección oral. Se estudió la respuesta de anticuerpos y anticuerpos autorreactivos en la fase crónica de la infección tras la vacunación terapéutica. Las respuestas de anticuerpos anti-TS (a-TS) se evaluaron para **A)** IgG total, **B)** IgG1 e **C)** IgG2a. La respuesta anti-homogenato (a-TH) también se evaluó para **D)** IgG total, **E)** IgG1 e **F)** IgG2a. También se determinaron los anticuerpos **G)** IgG autorreactivos. Los niveles de anticuerpos se indican como la DO relativa al valor de corte del ensayo ELISA (DO/cutoff). La significancia estadística se indica como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Para evaluar si los tratamientos modulan los niveles de anticuerpos autorreactivos contra el corazón, contribuyendo potencialmente a la reducción del daño tisular, se analizó por ELISA el plasma de todos los ratones infectados frente a un homogenato de tejido cardíaco sano de BALB/c. Como era esperado, los controles NI no mostraron respuesta detectable, mientras que los ratones infectados no vacunados (Tc1_{MO} y Tc2_{MO}) exhibieron niveles elevados de anticuerpos autorreactivos cardíacos. Notablemente, vacunales redujeron marcadamente estos niveles (Figuras 32G).

2.VI.b) Modelo de infección intradérmica y vacuna subcutánea: BALB/c-Tulahuen cl2. Evaluación Inmunológica del tratamiento terapéutico con TSNT-ISPA

Este modelo, ya utilizado por el grupo, se implementó nuevamente para corroborar los resultados previos y analizar parámetros no estudiados anteriormente. En este contexto, se llevó a cabo un experimento para evaluar la eficacia del inmunógeno TSNT-ISPA, administrado como vacuna terapéutica en ratones con infección establecida.

2.IV.b.1) Daño cardíaco en la etapa crónica

Se evaluaron la fibrosis y el infiltrado inflamatorio en los animales del modelo intradérmico, observándose lesiones de intensidad leve a moderada. Las imágenes representativas de las secciones histológicas para fibrosis e infiltrados se presentan en las Figuras 33B y 33D, mientras que sus respectivos análisis cuantitativos se muestran en las Figuras 33A y 33C.

Los resultados mostraron que ambos grupos infectados sin tratamiento (Tc1_{MI} y Tc2_{MI}) presentaron niveles de fibrosis e infiltrados inflamatorios significativamente mayores que sus correspondientes controles sanos (NI1_{MI} y NI2_{MI}). Al analizar el impacto del tratamiento, el grupo vacunado no mostró diferencias con el grupo NI, lo que indica una preservación del tejido. Si

bien se observó una mejora general, el efecto fue más acentuado en la inflamación que en la fibrosis, con una tendencia a la disminución ($p = 0,0810$) al compararlo con el grupo infectado Tc2_{MI}.

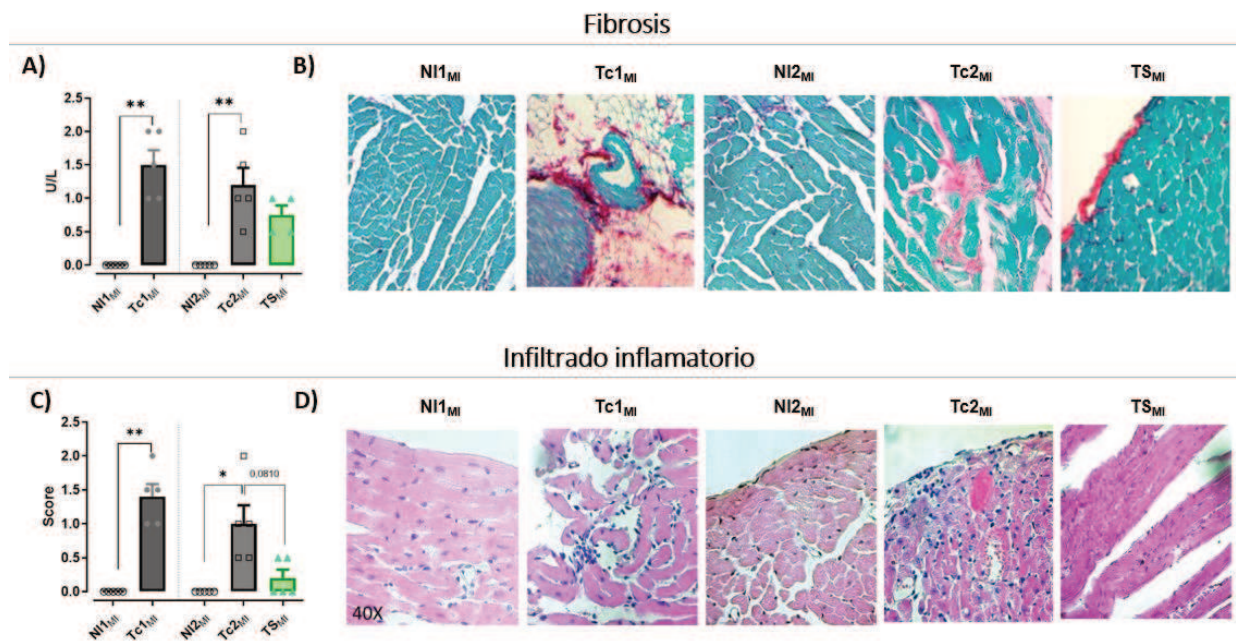


Figura 33: Evaluación de la histopatología cardíaca para analizar la eficacia de la vacuna terapéutica en el modelo de infección intradérmica. El análisis histopatológico clasificó las lesiones según su severidad en normal, leve o moderada. Se presentan los puntajes cuantitativos de daño correspondientes a **A)** fibrosis e **C)** intensidad de infiltrados inflamatorios. Se incluyen micrografías representativas de las secciones tisulares tomadas a 40x: **B)** fibrosis; **D)** infiltrados inflamatorios. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.IV.b.2) Carga parasitaria en tejido cardíaco

En el modelo de infección intradérmica, la presencia del parásito en el miocardio se mantuvo en niveles bajos en la etapa crónica de la infección. Las cuantificaciones de la carga parasitaria mediante qPCR se detallan en la Figura 34. Los resultados mostraron que, si bien el grupo infectado Tc1_{MI} presentaba una carga reducida a los 96 dpi, estos valores aumentaron hacia los 135 dpi en el grupo sin tratamiento (Tc2_{MI}). Al evaluar el efecto de la intervención, se observó que el grupo vacunado TS_{MI} pudo bajar este valor de forma significativa en comparación con el grupo Tc2_{MI}.

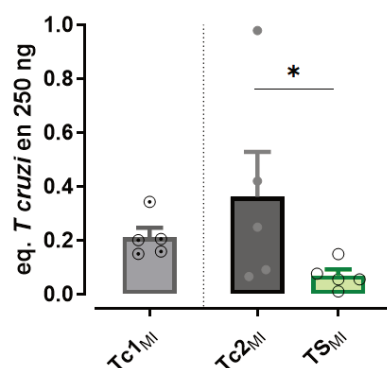


Figura 34: Evaluación de la carga parasitaria cardíaca como indicador de la eficacia de la vacuna terapéutica en el modelo de infección intradérmico. La carga parasitaria en el tejido se determinó mediante qPCR. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

2.IV.b.3) Alteraciones electrocardiográficas

En el modelo de infección intradérmico, el complejo QRS e intervalo QTc (Figura 35A y B) no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los tiempos evaluados. Por el contrario, el análisis de la onda P (Figura 35C) mostró una tendencia al incremento en el grupo Tc1_{MI} respecto al NI1_{MI} ($p = 0.0556$) previo a la inmunización (96 dpi). A los 135 dpi, este parámetro aumentó significativamente en el grupo Tc2_{MI} en comparación con NI2_{MI}. Por su parte, el grupo TS_{MI} presentó valores intermedios: si bien exhibió una reducción nominal respecto a Tc2_{MI}, esta diferencia no alcanzó significancia estadística, comportándose de manera similar frente al control NI2_{MI} (sin diferencias significativas).

El análisis de las arritmias (Figura 35D) mostró que, antes del tratamiento (96 dpi), la incidencia de alteraciones fue del 20% tanto en los animales sanos (NI1_{MI}) como en los infectados (Tc1_{MI}). Este porcentaje basal podría atribuirse a los efectos de la anestesia. Al evaluar la evolución temporal a los 135 dpi, se observó que la proporción de animales afectados se mantuvo estable en un 20% en casi todos los grupos, incluyendo los controles (NI2_{MI}) y los ratones que recibieron la inmunización terapéutica (TS_{MI}). El grupo infectado sin tratamiento (Tc2_{MI}) mostró un incremento en la incidencia, alcanzando el 40% a los 135 dpi, aunque este aumento no resultó estadísticamente significativo.

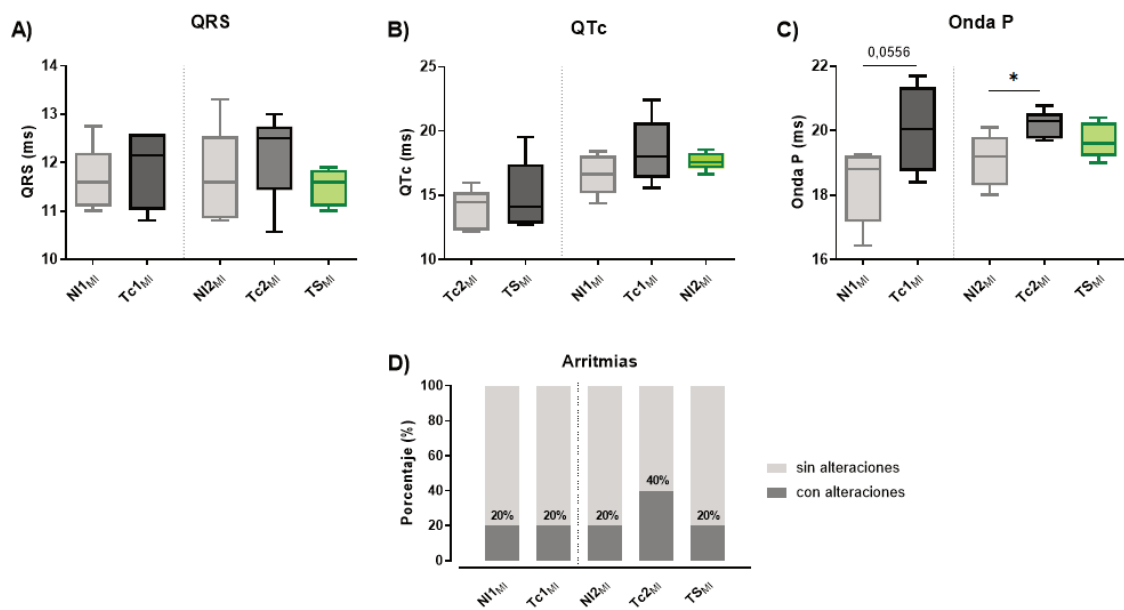


Figura 35: Evaluación de las alteraciones electrocardiográficas de la vacuna terapéutica subcutánea en el modelo de infección intradérmico. El monitoreo de la actividad eléctrica cardíaca se realizó analizando los parámetros de conducción y la frecuencia cardíaca. **A)** Duración del complejo QRS. **B)** Intervalo QT corregido (QTc). **C)** Duración de la onda P. Los parámetros se expresan en milisegundos (ms). **D)** Incidencia de arritmias detectadas en los grupos experimentales durante el esquema terapéutico. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

2.IV.b.4) Marcadores de daño tisular

Se evaluó el daño tisular mediante la cuantificación de biomarcadores plasmáticos. El análisis de GOT (Fig. 36A) evidenció un incremento significativo en el grupo infectado Tc1_{MI} respecto a su control NI1_{MI}. Los animales infectados sin tratamiento el Tc2_{MI} mantuvieron niveles elevados, mientras que la vacunación terapéutica TS_{MI} logró reducir significativamente la concentración de esta enzima en comparación con Tc2_{MI}.

En el caso de la isoenzima CK-MB (Figura 36B), se realizó únicamente sobre los sueros recolectados a los 135 dpi debido a que el volumen obtenido a los 96 dpi fue insuficiente. A su vez, algunos sueros fueron excluidos del análisis por presentar hemólisis visible que interfiere con la técnica. Es posible que debido a esta reducción en el n no haya sido suficiente para observar una diferencia estadística.

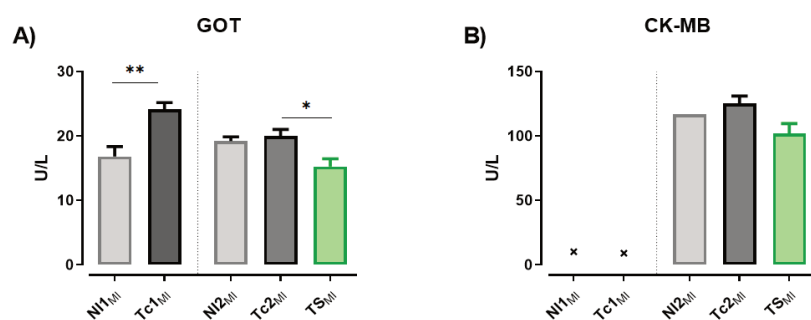


Figura 36: Evaluación de marcadores séricos de daño tisular e inflamación con la vacuna terapéutica subcutánea en el modelo de infección intradérmica. Se cuantificaron los niveles de biomarcadores en suero para evaluar la integridad tisular y el estado inflamatorio sistémico. **A)** Concentración de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT). **B)** Niveles de Creatina Quinasa MB (CK-MB) como marcador de daño cardíaco. La cruz x indica grupos no ensayados. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.IV.b.5) Respuesta humoral

Se evaluó la generación de anticuerpos anti-TSnt (Fig. 37A y B) y se encontró que el grupo que había recibido la formulación vacunal, grupo TS, mostró elevados niveles de anticuerpos contra dicha proteína.

Se evaluó también la presencia de anticuerpos específicos a través de la técnica de ELISA inmovilizando en la placa homogenato de *T. cruzi* (Fig. 37C y D). Se observó que todos los grupos infectados presentan anticuerpos anti-*T. cruzi*, sobre todo del isotipo IgG2a. Los niveles de IgG1 se han mantenido muy bajos a lo largo de la infección.

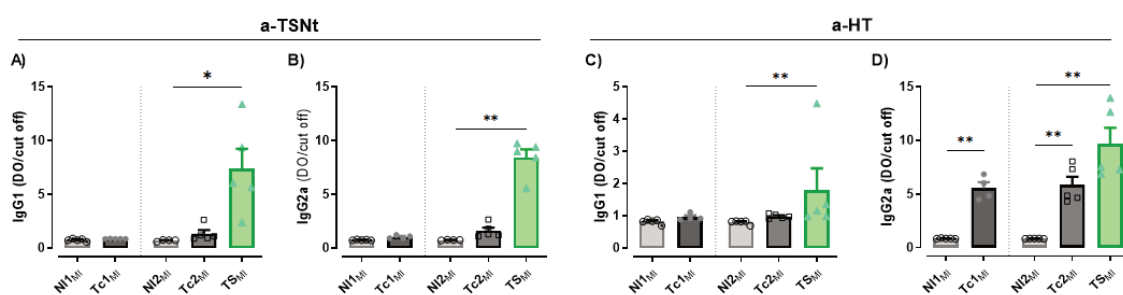


Figura 37: Evolución de anticuerpos en suero de la respuesta a los tratamientos con la vacuna terapéutica subcutánea en el modelo de infección intradérmica. **A)** Niveles de IgG1 anti-TSnt y **B)** niveles IgG2a anti-TSnt para los distintos tratamientos y tiempos, expresados como DO/Cut off. **C)** Niveles de IgG1 anti-*T. cruzi* y **D)** niveles IgG2a anti-*T. cruzi* para los distintos tratamientos y tiempos, expresados como DO/Cut off. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ Anova One-way, post test de Tukey). **Índice DO/cut off:** Densidad óptica leída a 450 nm/ (promedio de las DO de los No infectados/ 2x desvíos estándar de las DO de los No Infectados)

2.V) Discusión

En este capítulo evaluamos si la vacunación terapéutica puede disminuir o revertir el daño cardíaco y las arritmias en los dos modelos crónicos seleccionados y si dicha protección se correlaciona con diferencias en la respuesta inmune obtenida luego de los tratamientos. Los resultados obtenidos sugieren que la formulación terapéutica basada en la proteína trans-sialidasa (administrada por vía nasal o subcutánea) logró atenuar las alteraciones características de la fase crónica de la infección por *T. cruzi* y que dicha protección se asocia con una respuesta inmune diferencial.

La presencia de infiltrados inflamatorios y lesiones fibróticas son dos características histológicas distintivas de la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) y se correlacionan con la severidad clínica de la insuficiencia cardíaca (41,183,184). Estas alteraciones reflejan un proceso de remodelado patológico del miocardio, por lo que se consideran contribuyentes clave al deterioro cardíaco relacionado con Chagas (185). Típicamente, durante la fase crónica de la infección en ratones, el infiltrado inflamatorio es de intensidad baja a moderada (142,186).

En particular, en ratones hembra BALB/c infectados con la cepa Tulahuen, hemos informado previamente el desarrollo de inflamación y fibrosis moderadas en tejido cardíaco, independientemente de la vía de infección (81,145). En el presente estudio, reproducimos estos resultados en ambos modelos de infección; todos los grupos infectados presentaron miocarditis y lesiones fibróticas moderadas a los 90 y 135 dpi. Notablemente, tanto la vacuna nasal (TS_{MO}) como la subcutánea (TS_{MI}) redujeron significativamente este daño histológico con respecto a sus controles infectados, lo cual se reflejó en un infiltrado inflamatorio restringido a focos leves y dispersos, así como en una fibrosis marcadamente atenuada.

La administración terapéutica de la vacuna en la fase crónica enfrenta el desafío de revertir o detener un proceso fisiopatológico ya establecido. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores que, en diversos modelos murinos, ensayaron vacunas terapéuticas con distintos antígenos y formulaciones. Varias estrategias han demostrado eficacia en la reducción del daño histológico utilizando distintos antígenos; desde formulaciones monovalentes como Tc24 o TSA-1 (75,80) hasta combinaciones de antígenos o vectores de adenovirus que logran incluso la recuperación de proteínas de unión celular como la conexina-43 (83,84). Todo esto parece indicar que distintas formulaciones terapéuticas pueden modular el daño cardíaco crónico, independientemente del antígeno empleado.

Nuestros hallazgos en conjunto con los de otros grupos de trabajo, demuestran por tanto que

la intervención tardía con la formulación TS es capaz de alterar el curso natural de la patología murina. Esto posiciona a esta estrategia como una herramienta prometedora para detener la progresión hacia la insuficiencia cardíaca, un objetivo que los tripanocidas actuales (como el benznidazol) no siempre logran garantizar en pacientes crónicos según ensayos recientes (estudio BENEFIT (57)).

Dado que las alteraciones estructurales del miocardio tienen consecuencias funcionales, evaluamos a continuación si estas mejoras histológicas se reflejan en parámetros electrocardiográficos. Las alteraciones electrocardiográficas, junto con el análisis histológico, representan un enfoque valioso para evaluar las lesiones cardíacas causadas por la infección con *T. cruzi* (142). Aunque estas anomalías no replican completamente la cardiomiopatía chagásica crónica humana, sirven como un indicador potencial del daño funcional del corazón. Esto se debe al hecho que la inflamación persistente y la fibrosis reparativa alteran la organización del tejido cardíaco y favorecen la aparición de focos arritmogénicos, comprometiendo la función del miocardio (40,168).

En este contexto, otros investigadores y nosotros, hemos demostrado que la miocarditis crónica produce alteraciones electrocardiográficas en ratones BALB/c infectados por distintas vías con la cepa Tulahuen, (81,142,145,187). Además, estudios realizados en perros, un modelo con notables similitudes con la patología humana, han demostrado que las vacunas profilácticas previenen alteraciones electrocardiográficas en animales infectados (188).

Al analizar los intervalos QRS y QTc en ambos modelos estudiados, encontramos que el tratamiento terapéutico no fue efectivo para corregir dichas alteraciones. Cabe destacar que en trabajos previos del grupo utilizando el modelo intradérmico, sí se habían observado mejoras claras en estas alteraciones electrocardiográficas tras la vacunación terapéutica (81). De manera similar, evaluaciones de la misma formulación administrada por vía nasal pero de forma profiláctica y utilizando también un modelo oral, demostraron una reducción significativa en las alteraciones de QRS y QTc (180). Es importante aclarar que este último trabajo fue publicado en el marco de la presente tesis doctoral; sin embargo, algunos de sus resultados no fueron incorporados en el manuscrito actual, dado que no se ajustan al objetivo original centrado exclusivamente en la evaluación terapéutica.

La ausencia de reversión en las alteraciones de QRS y QTc en el presente ensayo, a diferencia de los antecedentes mencionados, podría deberse a la variabilidad natural y la heterogeneidad de las manifestaciones patológicas en la fase crónica, donde los tiempos de conducción suelen reflejar daños estructurales ya consolidados. Sin embargo, se pudieron observar mejoras de

otros indicadores funcionales. Por un lado, en el modelo intradérmico se logró la normalización de la onda P, lo que sugiere una recuperación de la dinámica auricular. Por otro lado, se registró una reducción significativa en la incidencia de arritmias, especialmente en el modelo oral.

Esta aparente disociación entre la aparición de alteraciones en los intervalos QRS, QTc y la onda P y la disminución de eventos arritmogénicos puede explicarse considerando que dichos parámetros reflejan alteraciones puntuales de la conducción y repolarización, mientras que la aparición de arritmias constituye un fenómeno multifactorial, resultado de la interacción entre procesos inflamatorios, fibrogénicos y de remodelado tisular (168).

El efecto terapéutico observado se ve reforzado con trabajos en modelos murinos, caninos y en primates no humanos. En ratones C57BL/6 infectados con la cepa Colombiana, la inmunoterapia con vectores de adenovirus (84) logró revertir arritmias y bloqueos auriculoventriculares de segundo grado ya establecidos. Resultados similares se observaron en modelos caninos; en perros Beagle infectados con la cepa H1 (189), la vacuna de ADN evitó alteraciones en la conducción y mantuvo el ritmo cardíaco cercano a los valores basales. Asimismo, en perros mestizos infectados con una cepa local H4 de Yucatán (190), el tratamiento con plásmidos codificantes de TSA-1 y Tc24 redujo la severidad y la frecuencia de las arritmias, retrasando la progresión de la miocardiopatía. Más recientemente, macacos Rhesus infectados crónicamente y tratados con una vacuna de ADN durante la fase crónica mostraron mejoras en parámetros electrocardiográficos (87).

En conjunto, estos resultados, junto con la evidencia previa generada por nuestro grupo y la de otros autores, muestran que la respuesta electrocardiográfica a la vacunación es beneficiosa, aunque puede variar según el modelo o el momento de intervención.

La eficacia de vacuna intranasal y subcutánea también se evidenció en su capacidad para reducir la carga parasitaria en tejido cardíaco. Ya hemos determinado en trabajos anteriores que la carga parasitaria se mantiene baja durante ambas fases, aguda y crónica de la infección oral si se aplica una vacuna profiláctica por vía nasal (106,145). Notablemente, ambas vacunas terapéuticas logran reducir la carga parasitaria, aun cuando el parásito ya se encontraba establecido en el tejido cardíaco antes de su administración. La presencia de parásitos en el corazón se considera un determinante clave en el establecimiento de lesiones (191,192), y varios autores han reportado una correlación entre la carga parasitaria y la severidad del daño (184,193,194). Por ello, una menor carga parasitaria podría haber contribuido a mejorar los parámetros cardíacos observados con ambos regímenes vacunales.

Además de la evaluación histológica y electrocardiográfica, incorporamos marcadores séricos de daño tisular para complementar el análisis funcional. En el modelo oral, los niveles de las transaminasas hepáticas (GOT y GPT) no difirieron significativamente entre los grupos infectados y vacunados, aunque el grupo Tc1_{MO} mostró una tendencia al aumento. Esto sugiere, por un lado, que la infección no generó un daño hepático detectable en este modelo y, por otro, que la formulación terapéutica administrada por vía nasal no induce hepatotoxicidad ni modifica de manera relevante el compromiso extracardíaco asociado a la infección crónica.

En cuanto a los niveles de ON, el grupo vacunado mostró una disminución significativa con respecto al control infectado, indicando una reducción del estado inflamatorio sistémico y del estrés oxidativo, ambos vinculados al daño tisular en la enfermedad de Chagas (175,195). A diferencia de lo reportado por Gupta et al. (83), donde los niveles de nitrito permanecieron elevados tras la vacunación, en nuestro modelo el grupo vacunado mostró una disminución significativa de ON. Esta reducción concuerda con lo descrito por Pereira et al. (84) y señala que la vacuna intranasal ejerce un efecto protector orientado a atenuar el estrés oxidativo y la inflamación que preceden a la necrosis celular.

Por otra parte, la creatina quinasa MB (CK-MB), un marcador sensible de daño cardíaco (173) (Fig. 30C), se encontró elevada en el grupo infectado Tc1_{MO} en el modelo oral. En conjunto, estos resultados señalan que la vacuna intranasal ejerce un efecto principalmente orientado a atenuar la inflamación sistémica y el daño cardíaco que son importantes en el contexto de la enfermedad. Por el contrario, la ausencia de cambios en los marcadores de daño tisular general sugiere que el compromiso sistémico extracardíaco fue limitado en este modelo.

En el modelo intradérmico, el análisis de GOT mostró un incremento significativo en el grupo infectado Tc1_{MI} respecto a su control NI1_{MI}. En la fase crónica tardía, los animales infectados sin tratamiento (Tc2_{MI}) mantuvieron niveles elevados, mientras que la vacunación terapéutica (TS_{MI}) logró reducir significativamente esta enzima. La CK-MB, evaluada únicamente en sueros de 135 dpi debido a limitaciones de muestra y una reducción adicional del tamaño experimental por hemólisis, no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a NI2_{MI}; no obstante, se observó una tendencia clara a la disminución de sus niveles en el grupo tratado TS en comparación con Tc2 ($p = 0.0571$). Considerando que la CK-MB es el marcador más específico de daño miocárdico, esta tendencia, junto con la disminución significativa de GOT, sugiere que la vacuna administrada por vía intradérmica contribuyó a preservar la integridad de las fibras cardíacas y a limitar la liberación de enzimas asociadas a injuria celular. Estos hallazgos se alinean con otras investigaciones previamente reportadas utilizando una vacuna terapéutica basada en el ADN de cruzipaina y GM-CSF (196), y con estudios posteriores donde una formulación

bicomponente resultó en niveles de CK y CK-MB significativamente menores (86).

En conjunto, ambos modelos muestran que las dos estrategias terapéuticas ejercen un efecto protector sobre el corazón. Tanto la inmunización nasal como la subcutánea lograron reducir los niveles de los marcadores de daño cardíaco (CK-MB y GOT) y de inflamación sistémica, aunque con diferentes grados de significancia estadística según el modelo. Específicamente, la inmunización nasal se destacó en la reducción del estrés oxidativo y la inflamación (ON), mientras que la vía subcutánea fue más efectiva en la disminución de las enzimas de daño celular (GOT y CK-MB). Estos hallazgos sugieren que ambas estrategias son efectivas para atenuar el daño miocárdico en la fase crónica, actuando sobre diferentes componentes de la lesión celular.

Podemos vincular el control de la carga parasitaria, la disminución de lesiones y mejora de la función cardíaca a un perfil inmunológico favorable. En trabajos previos con ratones inmunizados con TSnt + c-diAMP e infectados oralmente (145), asociamos este control a la capacidad del sistema inmune para manejar la infección durante la fase aguda. Dicho perfil se caracterizó por una fuerte respuesta de anticuerpos IgA en saliva e IgG2a en suero, junto con un incremento de células T CD8⁺ de memoria efectora y la producción de citocinas Th1 (IFN- γ y TNF- α) en órganos linfoides. Asimismo, existen indicios de que una respuesta similar podría estar mediando la protección tras la inmunización subcutánea. Según resultados de nuestro grupo con una formulación profiláctica basada en los mismos componentes (mTS + ISCOMATRIX) confirmaron una respuesta Th1 potente con alta secreción de IFN- γ por parte de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, y un incremento de IL-10.

En el presente estudio, dado que nuestro objetivo fue evaluar el potencial terapéutico una vez que el parásito está crónicamente establecido, analizamos la respuesta humoral sistémica, considerando que los anticuerpos pueden desempeñar roles tanto protectores como patológicos durante la infección crónica por *T. cruzi*. Para profundizar en la modulación inducida por la vacunación, abordamos un aspecto aún poco explorado en estudios de vacunas terapéuticas para la enfermedad de Chagas: la caracterización del perfil de anticuerpos inducido tras el tratamiento.

En nuestro trabajo, observamos que la vía de administración influyó determinantemente en el perfil de isotipos: la vacunación nasal favoreció predominantemente la producción de IgG1, mientras que la vía subcutánea indujo un sesgo hacia IgG2a. Sin embargo, más allá del isotipo, ambas estrategias convergieron en un efecto cualitativo que podría ser de importancia para el mecanismo de acción de la vacuna: un cambio en el foco del reconocimiento humoral. Se detectó una elevación de anticuerpos específicos contra el antígeno vacunal (TS) paralelamente

con una reducción en la reactividad frente a antígenos totales del parásito. Este patrón concuerda con hallazgos previos de nuestro grupo empleando formulaciones subcutáneas (81) y sugiere una reorientación del sistema inmune que atenúa la respuesta policlonal específica hacia antígenos no protectores (típica de la infección crónica y a menudo poco efectiva) en favor de una respuesta dirigida a un blanco molecular crítico.

La relevancia terapéutica de este perfil radica en la potencial funcionalidad de los anticuerpos inducidos frente a la progresión de la enfermedad. Al focalizar la respuesta hacia la trans-sialidasa, una molécula de superficie, se promueven mecanismos efectores específicos. En este sentido, previamente demostramos que los anticuerpos anti-TS inducidos por vacunación profiláctica nasal reducen la invasión parasitaria *in vitro* y mejoran la supervivencia en el desafío *in vivo* (106). Asimismo, hemos reportado capacidad de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) utilizando vectores que expresan TS (105). Por tanto, el aumento de anticuerpos anti-TS, junto con la disminución de aquellos dirigidos a antígenos no protectores o patogénicos del parásito, configura un escenario humoral que podría ser clave para el control de la patología crónica. Esta interpretación es sin dudas una hipótesis que debería ser estudiada en profundidad para determinar cuáles son las especificidades de los anticuerpos que disminuyen y si los desarrollados por la vacuna tienen efecto sobre la infección crónica.

Algunos anticuerpos perjudiciales descritos en la infección por *T. cruzi* han sido vinculados a eventos autoinmunes (197). Aunque el rol preciso de estos autoanticuerpos en la progresión clínica de la enfermedad de Chagas no está completamente claro, su posible participación en la patogénesis ha sido respaldada por estudios de transferencia pasiva que demostraron que pueden reproducir daño cardíaco en modelos animales (197). En nuestros experimentos, la vacunación terapéutica nasal redujo los niveles de autoanticuerpos reactivos contra tejido cardíaco. Esta reducción —en conjunto con el perfil favorable de citocinas, la menor carga parasitaria y los anticuerpos específicos inducidos por las vacunas— podría contribuir colectivamente a los efectos cardioprotectores observados bajo la estrategia vacunal. Dado que la mimetización molecular ha sido propuesta como un mecanismo detrás de la generación de autoanticuerpos (197), es plausible que los anticuerpos reducidos mediante la intervención con la vacuna estén vinculados a la disminución observada en la persistencia parasitaria. Su disminución podría reflejar una menor carga parasitaria durante la fase crónica, limitando así los eventos autoinmunes mantenidos en el tiempo.

A fin de profundizar en los mecanismos subyacentes a los cambios observados en el perfil humoral, caracterizamos también la respuesta celular en el tejido cardíaco (el órgano más afectado en la CCC) pero únicamente en el modelo oral, donde se encontraba disponible el

material biológico. En efecto, estos resultados no pueden interpretarse de manera lineal, ya que no existe consenso respecto del perfil inmunológico óptimo que una vacuna debería inducir durante la infección crónica para prevenir daño cardíaco. Aun así, comparaciones de perfiles de citocinas en pacientes crónicos con y sin cardiomiopatía ofrecen pistas sobre mecanismos inmunes potencialmente protectores (198). En nuestro modelo, los grupos Tc mostraron aumentos en la expresión de IFN- γ y T-bet en el corazón respecto de controles NI. Este patrón de citocinas se asemeja al perfil sistémico observado en pacientes con CCC revisado por Koh et al. (199). De hecho, niveles elevados de IFN- γ tanto sistémicos como cardíacos han sido fuertemente vinculados a mayor daño cardíaco en modelos murinos y en pacientes humanos (197–199).

La fibrosis en la infección por *T. cruzi* también ha sido ligada a TGF- β , usualmente actuando junto a IFN- γ (200). El efecto perjudicial de TGF- β fue confirmado en un modelo murino donde su neutralización redujo fibrosis y mejoró la función cardíaca (201). La vacuna terapéutica no redujo los niveles de TGF- β . Sin embargo, los animales TS_{MO} mostraron mayor expresión de T-bet respecto de NI2_{MO} y mayores niveles de Foxp3 respecto de Tc2_{MO}, posiblemente reflejando un inicio tardío de la modulación inmune. La vacunación terapéutica en la fase crónica parece inducir un perfil donde la respuesta inflamatoria parece ser contrarrestada por Tregs que expresan Foxp3. Cabe destacar que estos resultados podrían indicar un fenotipo tipo Th1 en células Foxp3⁺, tal como se ha informado previamente en modelos experimentales de *T. cruzi* (202). Este hallazgo contrasta notablemente con nuestros estudios en esquemas profilácticos (180), donde la inmunización temprana prevenía el alza de estos mediadores.

En el miocardio de los animales tratados (TS_{MO}), la expresión de IL-17 se encontró aumentada respecto al control infectado (Tc2_{MO}). Este incremento es consistente con el rol protector atribuido a dicha citocina en la fase crónica, donde se asocia a formas clínicas asintomáticas, menor disfunción cardíaca y control de la carga parasitaria (199,203–205). Simultáneamente, se detectó un aumento de Foxp3 en el grupo vacunado. La co-expresión de estos marcadores sugiere que la protección cardíaca en este modelo no depende de la supresión total de la respuesta inflamatoria, sino de un equilibrio mediado por células Th17 y mecanismos regulatorios que contrarrestan los niveles persistentes de IFN- γ . Es relevante notar que el aumento de Foxp3 no correlacionó con niveles de IL-10, indicando que esta regulación podría operar a través de vías independientes de la IL-10 clásica.

Un hallazgo revelador surge al comparar estos resultados con el esquema profiláctico publicado en Pacini et al (145): a pesar de las notables diferencias en el entorno de citocinas (donde la profilaxis previene el alza de IFN- γ y TGF- β), la IL-17 muestra un comportamiento convergente,

aumentando significativamente en ambos esquemas. Esta coincidencia identifica a la vía de IL-17 como un mecanismo efector transversal de la vacuna.

Al respecto, un equilibrio entre la respuesta efectora y reguladora es fundamental para disminuir la severidad de la enfermedad. Según Jones et al. (49), mientras que los pacientes con sintomatología clínica presentan un perfil Th1 predominante, aquellos que permanecen asintomáticos muestran un balance más equilibrado entre las respuestas Th1, Th2 y Th17. De este modo, la inducción de un perfil centrado en el eje IL-17/Tregs tras la vacunación permitiría emular este balance protector, favoreciendo el control de la patología crónica incluso ante la persistencia de mediadores inflamatorios.

En conjunto, estos datos refuerzan una idea central: la eficacia vacunal no depende de reproducir un único patrón inmunológico rígido, sino de inducir la modulación adecuada al contexto. Mientras la profilaxis actúa sobre un sistema naïve previniendo el establecimiento del daño, la inmunización terapéutica opera sobre un tejido ya lesionado, favoreciendo una reconfiguración tardía de las redes de citocinas —centrada en IL-17 y Tregs— para contener la inflamación crónica.

Finalmente, es necesario reconocer ciertas limitaciones en el presente capítulo derivadas de la complejidad logística y biológica inherente a los modelos crónicos de *T. cruzi*.

En primer lugar, la disponibilidad restringida de volumen de muestra biológica en el modelo intradérmico impidió la realización de determinaciones complementarias en este grupo, específicamente la cuantificación de carga parasitaria (qPCR), óxido nítrico y GPT. No obstante, respecto a la carga parasitaria, la notable consistencia fenotípica entre ambos modelos —donde el intradérmico replicó la reducción de arritmias y la preservación histológica observada en el modelo oral— permite inferir un control de la infección análogo al confirmado molecularmente en el grupo oral. En cuanto a los marcadores enzimáticos, si bien no se obtuvo el perfil de GPT, se priorizó el análisis de GOT y CK-MB por su mayor relevancia como indicadores específicos de daño muscular y cardíaco, los cuales mostraron tendencias consistentes con la protección tisular observada.

En segundo lugar, la baja carga parasitaria característica de la infección crónica impone per se un desafío técnico para su cuantificación, operando a menudo cerca de los límites de detección de la técnica. Aún bajo estas condiciones, en el modelo donde fue posible evaluarla, se evidenció el impacto de la terapia reduciendo aún más los niveles basales. Asimismo, variables pre-analíticas como la hemólisis limitaron el poder estadístico en el análisis de enzimas séricas en algunos grupos. Sin embargo, la robustez de los datos histopatológicos y funcionales (ECG) —

parámetros inalterables por estas limitaciones técnicas— compensa estas ausencias, confirmando la integridad tisular y funcional en los animales vacunados bajo ambos esquemas.

En tercer lugar, la caracterización profunda de la respuesta celular *in situ* (perfil de citocinas) se restringió al modelo de infección oral debido a la disponibilidad de material. Si bien esto impide una comparación directa de los mecanismos moleculares entre ambos modelos, la convergencia en los resultados clínicos, histológicos y humorales abre la posibilidad de que el tratamiento induzca mecanismos de protección comunes en ambos modelos. No obstante, será necesario corroborar en futuros estudios si la modulación del eje IL-17/Tregs se manifiesta del mismo modo en el modelo intradérmico.

Por último, es oportuno señalar que ciertos parámetros electrocardiográficos específicos, los cuales habían mostrado mejorías significativas en reportes previos o bajo esquemas profilácticos, no alcanzaron significancia estadística en este ensayo terapéutico. Dado que la fase crónica de la infección se caracteriza por una mayor heterogeneidad en la presentación clínica de los animales, es posible que la variabilidad biológica intrínseca haya enmascarado efectos más sutiles en dichos intervalos. Debido a esto, sería prudente plantear en el futuro repeticiones experimentales independientes a fin de aumentar el tamaño muestral acumulado y verificar si la falta de significancia en estos parámetros puntuales es un fenómeno biológico constante en el modelo terapéutico o una consecuencia de la dispersión muestral en este modelo de infección experimental.

Capítulo 3:

Estrategias quimio-inmunoterapéuticas:
evaluación de esquemas combinados de la
vacuna TSNt-ISPA y Benznidazol en la fase
crónica

3.1) Introducción

La limitación terapéutica del benznidazol en la fase crónica de la enfermedad de Chagas representa uno de los mayores desafíos en el manejo de la patología (57). Si bien el fármaco exhibe una potente actividad tripanocida en el compartimento vascular, su eficacia disminuye drásticamente cuando el parásito se establece en los tejidos (206). Al respecto, se ha propuesto que el tejido adiposo, entre otros órganos, actuaría como un reservorio crítico del parásito. Estos sitios funcionarían como nichos desde los cuales los parásitos pueden repoblar el torrente sanguíneo, siendo responsables de las recaídas observadas tras el tratamiento (207,208).

La ineficacia de los tratamientos actuales podría deberse a una menor accesibilidad del fármaco para compuestos de naturaleza hidrofílica o a una baja susceptibilidad intrínseca del parásito al encontrarse en un entorno rico en lípidos (5,206,207). Esta problemática se ve agravada por el amplio tropismo de *T. cruzi*, el cual puede hallarse en una gran diversidad de órganos durante la fase crónica, incluyendo el corazón, músculo esquelético, esófago, estómago, intestinos, riñones e hígado. Incluso se ha documentado su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica e infectar el sistema nervioso central (209–211).

Sumado a estas dificultades de acceso, otra teoría sugiere que el metabolismo rápido del benznidazol limita su éxito terapéutico. Esta farmacocinética genera una vida media plasmática corta y una biodistribución tisular que, aunque amplia, resulta insuficiente para sostener el efecto parasiticida en el tiempo (212).

Finalmente, un elemento crítico descubierto recientemente, es la existencia de formas resistentes en los tejidos: los amastigotes dormantes o quiescentes (213). Se ha demostrado que *T. cruzi* puede generar espontáneamente estos amastigotes intracitoplasmáticos no replicativos. Los mismos presentan una heterogeneidad fenotípica análoga a la de los *persisters* bacterianos, resistiendo la eliminación por compuestos tripanotóxicos altamente efectivos contra formas en división activa (214). Como se ha mencionado anteriormente, el benznidazol requiere de una activación metabólica por enzimas tripanosomales para ejercer su acción; sin embargo, en estas formas durmientes, dicha actividad enzimática se encontraría probablemente reducida o ausente debido a su estado de quiescencia, permitiendo al parásito evadir el efecto del fármaco (54,215,216).

Esta dormancia transitoria permite que una pequeña subpoblación de amastigotes sobreviva al tratamiento y, posteriormente, se reactive para generar tripomastigotes capaces de invadir nuevas células hospedadoras y restablecer la infección (213,217). En conjunto, esta combinación

de factores farmacocinéticos y persistencia biológica mantiene activa la respuesta inflamatoria, subrayando la necesidad de buscar estrategias complementarias que logren una depuración tisular definitiva.

Una alternativa que se propone en esta tesis es el uso combinado de benznidazol con componentes inmunológicos que potencien su efecto, tales como las vacunas terapéuticas. Esta estrategia se fundamenta en que, durante la progresión hacia la cronicidad, las células T CD8⁺ específicas del parásito sufren un agotamiento clonal. Este estado disfuncional se caracteriza por una hiperactivación prolongada y el aumento de receptores inhibitorios, como PD-1 y TIM-3, lo que deriva en un predominio de células efectoras terminales sobre las de memoria y compromete el control a largo plazo de la infección (218).

Existe evidencia de que el tratamiento antiparasitario puede mejorar la calidad de la respuesta de las células T CD8⁺, estableciéndose una correlación directa entre la robustez de estas respuestas y el desenlace clínico de la infección (218). En forma inversa, se ha descrito que una respuesta inmune efectora activa, mediada por citoquinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12, es indispensable para potenciar la eficacia del benznidazol (219). En base a esta información, puede postularse que la inmunoterapia favorecería los mecanismos de control parasitario y el éxito del tratamiento farmacológico, el cual, a su vez, sería necesario para lograr un efecto más significativo de la vacuna.

Un hecho adicional a tener en cuenta es que, el benznidazol podría ejercer un efecto facilitador sobre la acción de la vacuna al reducir la carga parasitaria y la presión antigénica constante. Esto permitiría atenuar parcialmente el estado de agotamiento inmunológico, generando un entorno más reactivo para la expansión y diferenciación de linfocitos T CD8⁺ específicos. En este ambiente con menor carga parasitaria, la inmunización con formulaciones adyuvadas, podría promover una eliminación más eficiente de amastigotes residuales y el establecimiento de una respuesta de memoria más robusta (80,220).

Además, considerando que el fenómeno de dormancia asociado a la persistencia parasitaria y a las fallas terapéuticas observadas tras el tratamiento quimioterapéutico, la estrategia de combinar benznidazol con una vacuna terapéutica adquiere un sólido fundamento biológico. En este contexto, mientras el benznidazol actuaría preferentemente sobre parásitos metabólicamente activos durante el período de administración, las formas dormantes podrían evadir dicha acción y reactivarse posteriormente, contribuyendo a la persistencia de la infección. Por otra parte, una vacuna terapéutica capaz de inducir una respuesta inmune específica y sostenida en el tiempo podría permitir el reconocimiento y la eliminación de estos parásitos al

momento de su reactivación, complementando al tratamiento farmacológico. De este modo, el abordaje combinado no solo potenciaría la reducción inicial de la carga parasitaria, sino que también favorecería el control a largo plazo de la infección, disminuyendo la probabilidad de persistencia y progresión hacia la enfermedad crónica.

La plataforma de vacunación desarrollada en nuestro laboratorio ha demostrado generar una respuesta celular y humoral equilibrada, logrando una protección significativa frente a la infección aguda y reduciendo el daño tisular (101,104,110). Estas características la posicionan como un candidato ideal para ser integrada en un esquema combinado que tenga como objetivo no solo eliminar el parásito residual, sino también modular el ambiente inflamatorio crónico.

La integración de la inmunoterapia también permitiría alcanzar un equilibrio terapéutico donde sea posible reducir la dosis acumulada de benznidazol sin comprometer la eficacia del tratamiento (221,222) (ver Tabla 7). De este modo, gracias a la potenciación inmunológica que otorga la vacuna, se compensaría la menor dosis farmacológica, permitiendo mitigar la toxicidad sistémica y los efectos adversos asociados al fármaco, mientras se logra un control parasitario superior mediante una respuesta inmune efectora y de memoria robusta.

Bajo esta lógica de potenciación mutua, surge la posibilidad de explorar esquemas de dosificación optimizados que difieran del tratamiento convencional, como el distanciamiento temporal de las dosis de Bz que se ha diseñado como estrategia para permitir la reactivación de los amastigotes dormantes hacia formas replicativas, volviéndolos así susceptibles a la acción del fármaco (213).

La exploración de estrategias quimio-inmunoterapéuticas hasta la fecha es todavía limitada y se encuentra en plena evolución, tal como se resume en la Tabla 7. La exploración de esquemas combinados ha sido abordada en primer lugar por el grupo de Jones y colaboradores, quienes inicialmente validaron el concepto de "quimioterapia ligada a vacunas" (*vaccine-linked chemotherapy*) en modelos de fase aguda. En sus primeros estudios (221,222), demostraron que la combinación de benznidazol con la vacuna basada en el antígeno Tc24-C4 no solo mejoraba la eficacia del fármaco, sino que inducía una respuesta inmune tipo Th17 y CD8⁺ robusta, reduciendo significativamente la carga parasitaria y el daño cardíaco temprano.

Posteriormente, el mismo equipo de investigación trasladó sus esfuerzos hacia la fase crónica temprana (223–225). En estos trabajos, se observó que la intervención combinada prevenía el desarrollo de fibrosis cardíaca y mejoraba la función del miocardio, incluso cuando se utilizaban dosis reducidas de benznidazol. Estos hallazgos marcaron un hito al demostrar que el sistema inmune puede ser reentrenado para controlar la infección en etapas donde el fármaco solo suele

fallar.

Tabla 7: Antecedentes experimentales de estrategias de quimio-inmunoterapia contra la infección por *T. cruzi*.

Fase de tratamiento	Formulación Vacunal	Esquema de benznidazol	Modelo experimental (animal - <i>T. cruzi</i>)	Resultados principales	Referencia
Aguda	Tc24+E6020	25mg/kg o 100mg/kg por 7 días consecutivos antes de la inmunización	BALB/c - H1	Vacuna + 25 mg/kg de Bz igualó la eficacia de la dosis curativa (100 mg/kg) en reducción de carga parasitaria. ↑ CD8+ y Th1 (IFN-γ). ↓ Inflamación cardíaca	Jones et al. 2018 (221)
Aguda	Tc24+E6020	25mg/kg o 100mg/kg por 7 días consecutivos, concurrente con la inmunización	BALB/c - H1	↓ Inflamación cardíaca y carga parasitaria Respuesta balanceada TH1, TH2, TH17	Cruz-Chan et al. 2021 (222)
Crónica	TSNt+ISPA	100 mg/kg por 30 días consecutivos luego de la inmunización	BALB/c-Tulahuen cl2 BALB/c-Sylvio x10/4	Mejora en parámetros electrocardiográficos. ↓ Carga en sangre y en tejido cardíaco. ↓ Daño tisular cardíaco Tratamiento mixto fue superior a las monoterapias en el modelo Tulahuen cl2	Prochetto et al. 2022 (81)
Crónica temprana	TSA-1-C4+ Tc24-C4+ E6020	25mg/kg por 7 días concurrente con la inmunización	BALB/c - H1	Prevención de fibrosis cardíaca (superior a los monotratamientos). ↓ Miocarditis, carga en corazón y músculo Activación CD8+. ↑ LT de memoria central.	Dzul-Huchim et al. (223)
Crónica temprana	Tc24-C4 +E6020	25mg/kg por 20 días concurrente o secuencial con la inmunización	BALB/c - H1	Mejoras de la función y estructura cardíaca. ↓ Carga parasitaria en corazón y Fibrosis cardíaca. Respuesta inmune equilibrada	Jones et al. 2023 (224)
Crónica temprana	Tc24-C4 +E6020	25mg/kg por 18 días antes de la inmunización	BALB/c - H1	↓ Carga y fibrosis hepática Respuesta Th1/Th17 sistémica Sin toxicidad hepática	Nguyen et al. 2023 (225)
Crónica	ARNm (Cruzaina, Tc24 y TS)	100mg/kg por 5 días consecutivos antes de la inmunización	C3H/HeN – K98	Reversión de alteración ECG. ↓ Inflamación en musculo esquelético Modulación Th1/Th2. ↑ Respuesta CD8+	Delfino et al. 2025 (226)

No obstante, los estudios en la fase crónica establecida son aún más escasos y representan la frontera actual de esta estrategia. En este contexto, nuestro grupo de trabajo realizó una contribución novedosa (81) al evaluar un esquema terapéutico durante la etapa crónica de la infección crónica por *T. cruzi* utilizando una vacuna, seguida de un tratamiento con benznidazol. De hecho, el primer trabajo que se publicó en la literatura con este enfoque para tratar la infección crónica establecida del modelo murino corresponde al de dichos resultados (81). En ese trabajo se describió un protocolo de tratamiento en el cual se aplica un esquema vacunal durante la fase crónica de la infección con tres dosis de la formulación TSNT-ISPA desarrollada en el laboratorio. Un mes después de finalizada la vacunación, se aplica un tratamiento de benznidazol convencional (100mg/kg de administración oral de Bz por 30 días). El esquema se ensayó en dos modelos experimentales siendo estos: ratones BALB/c infectados con la cepa Sylvio X10/4 y ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuen cl2. En ambos modelos, la administración terapéutica de TSNT-ISPA redujo las alteraciones en el ECG y el daño del tejido cardíaco observados en la fase crónica. Además, el tratamiento con la vacuna disminuyó significativamente la carga parasitaria cardíaca en los ratones infectados con ambas cepas. El tratamiento combinado, pero no la administración de Bz o de la vacuna por separado, permitió restaurar los parámetros del ECG en los ratones infectados con la cepa Tulahuen cl2. Estos resultados sugirieron el potencial terapéutico de la formulación TSNT-ISPA en ratones BALB/c crónicamente infectados con las cepas Sylvio X10/4 o Tulahuen cl2. En los ratones infectados con la cepa Tulahuen cl2 de *T. cruzi*, el tratamiento combinado con la vacuna y Bz tuvo un efecto más favorable sobre la evolución de la enfermedad cardíaca que los tratamientos individuales con la vacuna o con Bz por separado. Los resultados reforzaron la idea de que la inmunización previa puede optimizar la respuesta al fármaco en un estadio avanzado de la infección.

La relevancia de esta área ha sido ratificada por investigaciones de vanguardia, como la de Delfino y colaboradores (226), quienes han explorado el uso de vacunas de ARN mensajero (mRNA-Tc-Vax) en fase crónica. Sus hallazgos demuestran que la combinación de esta plataforma con benznidazol logra una sinergia capaz de revertir alteraciones electrocardiográficas y reducir significativamente la fibrosis y el infiltrado inflamatorio en tejidos periféricos. Esta progresión en la literatura, desde la fase aguda hasta los modelos crónicos más complejos, subraya la importancia de continuar profundizando en el diseño de protocolos que logren no solo una depuración tisular definitiva, sino también una recuperación funcional y una reversión del daño inmunopatológico.

En esta tesis se buscó profundizar y optimizar esa línea de trabajo. Inicialmente, se evaluaron nuevos modelos de infección crónica para visualizar daños mayores a los reportados en BALB/c-

Tulahuen cl2 (81). Sin embargo, tal como se indica en el capítulo 1, los nuevos modelos evaluados (salvo el modelo oral que fue analizado en el capítulo 2), no superaron los niveles de daño del modelo original. Por esa razón, se decidió continuar la investigación con el modelo mencionado, manteniendo la vía de infección intradérmica y la administración de la vacuna por vía subcutánea. Esta decisión permitió dar continuidad a los protocolos establecidos por nuestro grupo y asegurar la comparabilidad con resultados previos.

Tras repetir el estudio de Prochetto et al. (81), se propuso una estrategia que lograra mejorar dicho tratamiento. La propuesta con la que se trabajó se basa en la investigación de Wait et al. (227), que sugiere que durante la infección crónica por *T. cruzi*, la respuesta inmune puede sufrir senescencia, lo que podría estar limitando el efecto de la vacuna terapéutica. Nuestra estrategia inicial de tratar primero con vacuna y luego con Bz se fundamentaba en la necesidad de tener una respuesta inmune efectora activa para aumentar la eficacia del fármaco (228,229). Sin embargo, si la senescencia está ocurriendo en nuestro modelo, la inmunización resultaría ineficaz para potenciar el efecto del Bz.

Para contrarrestar este fenómeno, se planteó que una administración inicial de Bz previa al tratamiento mixto resultaría beneficiosa. En efecto, se ha descrito que ratones crónicamente infectados y tratados exitosamente con benznidazol muestran una reprogramación de la respuesta inmune hacia un aumento de linfocitos T con fenotipo de memoria central. Esto confiere una alta protección frente a un nuevo desafío en comparación con animales no tratados (220), un fenómeno que también fue reportado en humanos (53).

Con este objetivo, se llevó a cabo un primer paso exploratorio evaluando si un tratamiento con Bz, iniciado en la etapa temprana de la infección crónica a los 45 días post-infección (antes de lo previamente ensayado) y durante un período más corto, podría mejorar la respuesta inmune y reducir la carga parasitaria. Se optó por ensayar un ciclo de 7 días debido a que los principales efectos adversos suelen manifestarse después de este lapso (58). Esta reducción en el tiempo de tratamiento permitiría aumentar la adhesión de los pacientes al evitar las interrupciones asociadas a la toxicidad del fármaco. Habiendo confirmado que un tratamiento inicial con Bz induce una respuesta superior a la obtenida con la vacuna en algunos parámetros, se consideró de incorporar el principio propuesto por el grupo del Dr. Tarleton, cuyos estudios demuestran que la administración de dosis alternadas puede ser más eficaz que una dosis única prolongada, especialmente para la eliminación de parásitos durmientes (213,230). Siguiendo esta lógica de fraccionamiento, se decidió ensayar un tratamiento secuencial compuesto por una fase inicial con benznidazol, seguida de la inmunización y un refuerzo final con el mismo fármaco.

3.II) Objetivos

3.II.a) Objetivo General

Optimizar una estrategia de tratamiento mixto basada en la administración de la vacuna TSNT y Benznidazol.

3.II.b) Objetivos Específicos

- Reevaluar la estrategia de tratamiento mixto previamente descrita por el grupo de investigación.
- Determinar la utilidad de realizar un tratamiento previo con Bz en comparación con la administración inicial de la vacuna.
- Ensayar un esquema de tratamiento secuencial que combine ambas estrategias.

3.III) Métodos

En el presente capítulo, se seleccionó el modelo de infección intradérmica con la cepa Tulahuen cl2 de *T. cruzi* en ratones de la cepa BALB/c, con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento mixto.

3.III.1) Animales de experimentación

Para los experimentos descritos en este capítulo se utilizaron ratones hembra BALB/c de 5 a 8 semanas de edad, mantenidos bajo las mismas condiciones de bioterio y cuidados experimentales detallados en el Capítulo 1. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las normativas institucionales vigentes y contaron con la aprobación del Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la FBCB-UNL (protocolo n.º CE2018-42).

3.III.2) Parásitos

Para los experimentos desarrollados en este capítulo se emplearon tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen cl2, obtenidos a partir de ratones Cb1 infectados mantenidos en el Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER). El procesamiento de los parásitos, incluyendo su purificación, recuento y ajuste de la concentración, se realizó conforme al protocolo previamente descrito para esta cepa en el Capítulo 1.

3.III.3) Infección

Para el establecimiento de las infecciones crónicas, los ratones BALB/c fueron infectados al inicio del experimento mediante la inoculación intradérmica de 1.000 tripomastigotes sanguíneos viables de *T. cruzi* cepa Tulahuen cl2 por animal, utilizando un volumen final de 10 µL de solución fisiológica estéril.

Al igual que lo descrito en los capítulos previos, el momento de la inoculación se consideró como día 0 post infección (0 dpi), y a partir de ese punto se establecieron todos los tiempos experimentales. La infección fue confirmada a los 14 dpi mediante el análisis por microscopía directa de sangre periférica. Tras la confirmación de la parasitemia, los animales fueron asignados de manera aleatoria a los distintos grupos experimentales previo al inicio de los tratamientos terapéuticos.

3.III.4) Obtención de los antígenos vacunales TSNT

Para el desarrollo de las formulaciones vacunales evaluadas en este capítulo, se procedió a la expresión y purificación del antígeno TSNT, siguiendo la metodología detallada exhaustivamente en el Capítulo 2 (Sección 2.III.4).

Brevemente, se utilizó un fragmento amino-terminal de 35 kDa de la proteína Trans-sialidasa de *T. cruzi* (aa 63-346; GenBank: AJ276679.1), el cual carece de la región SAPA. La producción se llevó a cabo mediante el sistema de expresión procariota pET-28a(+) en células de *E. coli* BL21 (DE3), cuya inducción se realizó con IPTG 0,1 mM.

Debido a la naturaleza insoluble del fragmento en este sistema, la proteína se recuperó a partir de cuerpos de inclusión resuspendidos en PBS-urea 8M. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad por ion metal inmovilizado (IMAC) en columnas de Ni-NTA, aprovechando la etiqueta de histidinas del vector. Tras la elución con un gradiente de imidazol, las fracciones de interés fueron concentradas mediante ultrafiltración (MWCO 10.000 Da) y cuantificadas por el método del ácido bicinonínico (BCA), utilizando BSA como estándar para la posterior preparación de las dosis de inmunización.

3.III.5) Diseños experimentales

Con el propósito de alcanzar una respuesta terapéutica óptima, el trabajo experimental se desarrolló de manera secuencial y progresiva. Inicialmente, se estableció una línea de base mediante un esquema mixto ya empleado en el laboratorio (Diseño I). A partir de los resultados obtenidos en esta primera etapa, se consideró necesario el refinamiento del protocolo original mediante la optimización de variables críticas (Diseño II), lo que condujo finalmente a la implementación de un esquema de tratamiento secuencial adaptado (Diseño III). Este abordaje dinámico permitió ajustar la estrategia terapéutica con el fin de maximizar la sinergia entre los componentes y potenciar el efecto preventivo y/o curativo del tratamiento.

3. III.5) a) Diseño Experimental I: Tratamiento mixto en el modelo intradérmico

Este primer diseño consistió en la validación de la eficacia de la terapia mixta durante la fase crónica de la infección, utilizando el esquema terapéutico descrito por Prochetto et al. (81). Para ello, los ratones fueron infectados por vía intradérmica con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen cl2, confirmándose la parasitemia al día 21 post infección (pi). A partir del día 100 pi, los animales comenzaron a recibir los distintos esquemas terapéuticos, conformándose los siguientes grupos experimentales (n=5): TS¹ (ratones infectados e inmunizados con la formulación vacunal TSNT-ISPA), Bz¹ (ratones infectados y tratados con benznidazol), Mixto (ratones infectados, inmunizados con la formulación vacunal y posteriormente tratados con el

parasitocida) y un grupo control infectado que no recibió tratamiento (Tc^1). Además, se incluyó un grupo control no infectado ni tratado (NI^1). El esquema general de los tratamientos empleados en este ensayo se presenta en la Figura 38.

La formulación vacunal TSnt-ISPA fue administrada por vía subcutánea en tres dosis, los días 92, 102 y 112 pi, inoculando 10 μ g de TSnt y 3 μ L de ISPA en un volumen final de 100 μ L. El tratamiento con benznidazol (Bz) se aplicó durante 30 días consecutivos, a una dosis de 100 mg/kg/día por vía oral, desde el día 130 hasta el día 160 pi.

El punto final del experimento se estableció al día 197 pi. En ese momento, a los animales se les realizaron electrocardiogramas (ECG) y posteriormente fueron sacrificados para la obtención de las muestras biológicas correspondientes.



Figura 38: Diseño experimental I: Esquema de trabajo empleado para la evaluación del tratamiento mixto con la formulación TSnt + ISPA y BZN en el modelo de infección intradérmico BALB/c- Tulahuen cl2

3. III.5) b) Diseño Experimental II: Optimización del esquema terapéutico en el modelo intradérmico

Con el fin de evaluar el efecto de un esquema acortado de benznidazol, se realizó un ensayo exploratorio comparando una administración de 7 días frente a la inmunoterapia. El diseño experimental y la línea temporal de los tratamientos empleados en este ensayo se esquematizan en la Figura 39.

Se emplearon ratones BALB/c infectados intradérmicamente con 1000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen cl2. A los 46 días post infección (dpi), un grupo de animales recibió tratamiento con benznidazol a una dosis subóptima comprobada en ensayos previos de 100 mg/kg/día durante 7 días consecutivos (81), administrado por vía oral (grupo Bz², n=6); el esquema cronológico de este tratamiento se detalla en la Figura 39A. Con el fin de comparar

los parámetros inmunológicos inducidos por el tratamiento farmacológico con los generados por la inmunoterapia, se incluyó el grupo TS² (n=5), el cual recibió únicamente la formulación vacunal TSnt-ISPA, administrada por vía subcutánea los días 46, 56 y 66 dpi, siguiendo el esquema presentado en la Figura 39B. En cada dosis se inocularon 10 µg de TSnt y 3 µL de ISPA en un volumen final de 100 µL.

Asimismo, se incluyó un grupo el grupo Tc² (n=5), conformado de ratones infectados no tratados que recibieron PBS como control experimental. El punto final del ensayo se estableció a los 100 dpi, momento en el cual los animales fueron sacrificados para la obtención de las muestras biológicas correspondientes.

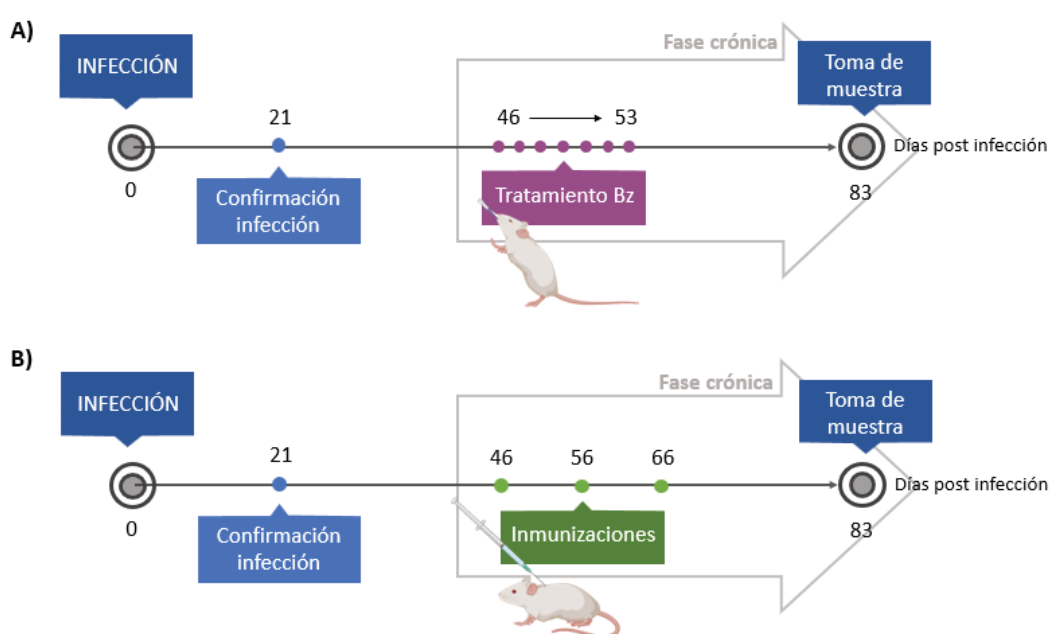


Figura 39: Diseño experimental II: Evaluación independiente de monoterapias (Bz y formulación vacunal TSnt + ISPA) para la optimización del tratamiento mixto. Cronograma de tratamiento para los grupos de control terapéutico en el modelo BALB/c - Tulahuen cl2: A) esquema de administración de BZN en dosis reducida y B) esquema de inmunización con la vacuna TSnt + ISPA.

3. III.5) c) Diseño Experimental III: Implementación del esquema secuencial en el modelo intradérmico.

Este diseño consistió en la evaluación de un esquema terapéutico integral y secuencial destinado a maximizar la respuesta combinada entre la inmunización terapéutica y el fármaco.

El protocolo se estructuró en tres etapas consecutivas: (i) un tratamiento corto inicial con benznidazol (Bz), destinado a reducir la carga parasitaria y contrarrestar los mecanismos de

inmunosupresión; (ii) la administración de la formulación vacunal, para inducir una respuesta inmune específica; y (iii) una segunda ronda de tratamiento con Bz, con el fin de potenciar la eliminación de parásitos remanentes. El diseño experimental y la línea temporal completa de los tratamientos empleados en este esquema se presentan en la Figura 40.

Para este estudio, ratones BALB/c fueron infectados intradérmicamente con 1000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen cl2. Una vez confirmada la infección, los animales fueron distribuidos en siete grupos experimentales ($n = 7-8$), además de un grupo control no infectado (NI³, $n = 6$).

El grupo experimental principal (Grupo Bz-TS-Bz³) recibió un primer tratamiento con Bz durante 7 días consecutivos, iniciado a los 52 días post infección (dpi). Un mes después de finalizado este tratamiento, los animales fueron inmunizados con la formulación vacunal TSnt-IPSA los días 89, 99 y 109 dpi. Posteriormente, se administró una segunda ronda de tratamiento con Bz, también durante 7 días consecutivos, comenzando un mes después de la última dosis de la vacuna (139 dpi). El punto final del experimento se estableció a los 190 dpi, momento en el cual los animales fueron sacrificados para la obtención de las muestras biológicas correspondientes.

Como grupos controles se incluyeron: un grupo infectado no tratado (Tc³); un grupo tratado únicamente con Bz (Bz³); un grupo inmunizado únicamente con la formulación vacunal (TS³); y un grupo que recibió la vacuna seguida de una única ronda de tratamiento con Bz (TS-Bz³).

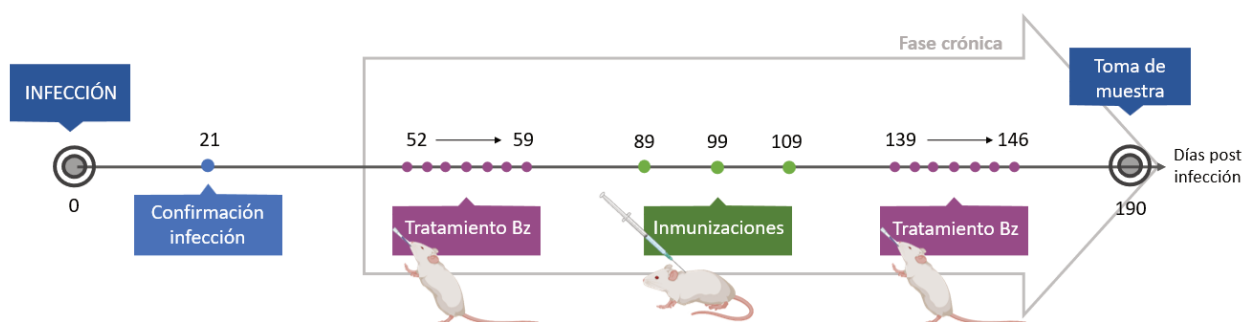


Figura 40: Esquema de trabajo secuencial de terapia mixta (TSnt + ISPA + Bz) para el modelo de infección intradérmica BALB/c-Tulahuen cl2.

3.III.6) Histopatología

El procesamiento y análisis de las muestras se realizaron siguiendo el procedimiento y el sistema de puntuación descritos en el Capítulo 1. Los corazones fueron extraídos al punto final de cada

experimento y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar el infiltrado inflamatorio y con rojo de picrosirius para la fibrosis. En ambos casos, se asignó un score de 0 a 3 según la intensidad del daño (normal, leve, moderada o severa).

Para el análisis de los resultados del Diseño I, se utilizó un score histológico combinado que integró ambos parámetros por animal, manteniendo la metodología previa del grupo. En cambio, para el Diseño III, se optó por un análisis desglosado donde la inflamación y la fibrosis se evaluaron y representaron de manera independiente. Este refinamiento en el procesamiento de los datos permitió una caracterización más específica del efecto del tratamiento sobre cada tipo de lesión tisular.

3.III.7) Cuantificación de la carga parasitaria

La carga parasitaria tisular se determinó mediante PCR cuantitativa (qPCR), siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 2. Los tejidos cardíacos fueron recolectados al punto final del experimento, seccionados transversalmente y procesados para la extracción de ADN total.

La cuantificación del ADN de *T. cruzi* se realizó utilizando cebadores específicos para el kDNA del parásito y un sistema StepOne™ Real-Time PCR, normalizando los resultados respecto del ADN murino. La carga parasitaria se expresó como parásitos equivalentes por 250 ng de ADN murino.

3.III.8) Electrocardiogramas

El análisis electrocardiográfico se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1. Los registros se obtuvieron al finalizar cada uno de los ensayos experimentales. Se analizaron los siguientes parámetros: frecuencia cardíaca, onda P y los intervalos PR, QRS y QT, incluyendo la corrección del intervalo QT (QTc). La detección de anomalías arrítmicas se realizó sobre las derivaciones I y II, y la presencia de arritmias se expresó como la proporción de animales que presentaron alguna alteración electrocardiográfica dentro de cada grupo.

3.III.9) Enzimas y Biomarcadores Cardíacos y Hepáticos

La actividad sérica de las enzimas Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT), Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) y de la isoenzima Creatina Kinasa MB (CK-MB), así como la concentración de óxido nítrico (NO), se determinaron en el punto final experimental, siguiendo

el procedimiento descrito en el Capítulo 1.

Los resultados de GOT/AST, GPT/ALT y CK-MB se expresaron en U/L, mientras que la concentración de óxido nítrico se expresó en mmol/L.

3.III.10) Detección de anticuerpos específicos en plasma

Los niveles de anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2a se determinaron en plasma obtenido al momento del sacrificio de los animales, siguiendo el procedimiento de ELISA indirecto descrito en el Capítulo 2.

Las microplacas se sensibilizaron con antígeno TS recombinante purificado u homogenato total de *T. cruzi* (TH), según el ensayo correspondiente. Los resultados se expresaron como un índice de reactividad, calculado como el cociente entre la densidad óptica (DO) de cada muestra y su respectivo valor de corte, definido como la media de las DO de los controles no infectados más dos desviaciones estándar.

3.III.11) Cuantificación de citocinas sistémicas

La determinación de las citocinas se realizó mediante ensayos ELISA de tipo sándwich, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Para las mediciones en suero, se cuantificaron los niveles de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF- β 1) utilizando kits de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). En el caso de TNF- α se emplearon microplacas sensibilizadas con anticuerpo de captura específico y se detectó la citocina con un anticuerpo biotinilado y Estreptavidina-HRP, con un rango de sensibilidad de 8 a 1000 pg/mL. Para TGF- β 1, las muestras de suero fueron sometidas a un pretratamiento de activación ácida con HCl 1N y posterior neutralización con NaOH 1N para permitir la detección de la forma biológicamente activa, empleando una curva estándar con un rango de 31,3 a 2000 pg/mL.

En todos los ensayos, la reacción colorimétrica se desarrolló con sustrato TMB, se detuvo mediante la adición de solución de *stop* ácida y la densidad óptica se leyó a 450 nm en un lector de microplacas, calculando las concentraciones finales por interpolación en las respectivas curvas estándar.

3.III.12) Cultivo celular y evaluación de la respuesta inmune por citometría de flujo

Para caracterizar la respuesta inmune celular generada por los distintos tratamientos, se procedió al análisis de los esplenocitos obtenidos de los ratones sacrificados en el punto final experimental. Los bazo fueron procesados de manera mecánica para obtener esplenocitos frescos, los cuales, tras la lisis de glóbulos rojos con NH_4Cl , se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin (Gibco) y 0,4 mM de 2-mercaptoetanol.

Las células se sembraron a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/mL en placas de 48 pocillos (Nunc). Con el fin de potenciar la presentación antigénica y la consecuente activación de los linfocitos T, los esplenocitos se co-cultivaron con células dendríticas activadas y se estimularon con 10 $\mu\text{g/mL}$ de homogenato estéril de *T. cruzi*. Para el análisis de citocinas secretadas, los cultivos se mantuvieron durante 72 horas a 37 °C y 5% de CO_2 , momento en el cual los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados para su posterior evaluación.

En paralelo, se realizó un ensayo para determinar la producción intracitoplasmática de citocinas mediante citometría de flujo. En este caso, el co-cultivo de esplenocitos y células dendríticas se estimuló con el homogenato del parásito durante un periodo total de 15 horas. Este protocolo incluyó una fase inicial de 6 horas de estímulo, seguida de 9 horas de incubación en presencia de inhibidores del transporte intracelular proteico (BD GolgiStop) para provocar la acumulación de las citocinas en el citoplasma.

Debido a las especificaciones técnicas del citómetro disponible (BD Accuri C6 Plus, USA), el cual cuenta con cuatro canales de detección, y en función de los anticuerpos disponibles, se diseñaron dos paneles de marcación independientes:

- Panel CD4: Evaluación de activación y perfil de citocinas en linfocitos T colaboradores utilizando anti-CD4/APC, anti-CD44/FITC, anti-IL-10/PerCP y anti-IFN- γ /PE.
- Panel CD8: Evaluación de potencial citotóxico y efector mediante anti-CD8/PerCP, anti-CD107/PE, anti-TNF- α /FITC y anti-IFN- γ /APC.

El procedimiento de marcación comenzó con la incubación de los anticuerpos de superficie por 30 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas y resuspendidas en una solución de fijación y permeabilización durante 30 minutos a 4 °C. Tras un nuevo lavado, se procedió a la incubación con los anticuerpos monoclonales intracitoplasmáticos anti-IFN- γ (PE o APC), anti-IL-10/PerCP (Invitrogen) o anti-TNF- α /FITC (Miltenyi), siendo el resto de los reactivos procedentes

de BD Pharmingen (USA).

Se adquirió un mínimo de 1×10^5 eventos por muestra en el citómetro Accuri C6 Plus y los análisis de frecuencia se realizaron utilizando el software FlowJo (Beckton Dickinson, USA).

3.III.13) Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron utilizando estadística no paramétrica. Para la comparación de más de dos grupos se aplicó el test de Kruskal–Wallis, seguido del test de Dunn para las comparaciones post hoc. Las variables categóricas se evaluaron mediante la prueba de chi-cuadrado. Para el análisis de variables categóricas, como la proporción de animales afectados por arritmias, se utilizó el Test Exacto de Fisher.

Los resultados se expresaron como media $\pm$ SEM o como mediana y rango, según correspondiera. Los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.) y se consideraron significativas las diferencias con valores de $p < 0,05$.

3.IV) Resultados

Los resultados presentados en este capítulo se organizan en tres tipos de experimentos: (1) el tratamiento secuencial con vacuna y benznidazol previamente descrito en Prochetto et al. (81); (2) una prueba de concepto destinada a evaluar la utilidad de iniciar el tratamiento con benznidazol; y (3) un ensayo definitivo basado en un esquema secuencial que incluyó la administración de benznidazol, seguida de la vacuna y, finalmente, un segundo ciclo de benznidazol.

Cabe destacar que, para facilitar la interpretación de las figuras correspondientes a los distintos experimentos, los grupos experimentales fueron identificados mediante un superíndice que indica el experimento al que pertenecen (1, 2 o 3).

3.IV.a) Diseño Experimental I: Tratamiento mixto en el modelo intradérmico

En esta primera etapa, se evaluó la eficacia del tratamiento mixto (Vacuna + Benznidazol) en comparación con la administración individual de cada componente. El propósito de este ensayo fue determinar si la combinación de la inmunoterapia y el fármaco logra una mejora en la carga parasitaria y la función cardíaca frente a las monoterapias.

3.III.a.1) Evaluación del daño histopatológico tisular en la fase crónica

A los 198 días post-infección (dpi), se evaluó el daño tisular mediante el análisis conjunto de la fibrosis y los infiltrados inflamatorios.

En el tejido cardíaco, todos grupos infectados Tc¹, TS¹ y Bz¹ presentaron un incremento en el daño histopatológico en comparación con el grupo no infectado (NI¹) (Figura 41A). Si bien el grupo tratado con la vacuna (TS¹) mostró los valores numéricos más elevados de lesión, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre este y los grupos Tc¹ o Bz¹. Por su parte, el grupo de tratamiento mixto (TS+Bz¹) no presentó diferencias significativas respecto al grupo NI¹, indicando una preservación de la arquitectura miocárdica. Imágenes representativas de la fibrosis y de los infiltrados inflamatorios en el tejido cardíaco se muestran en las Figuras 41B y 41C, respectivamente.

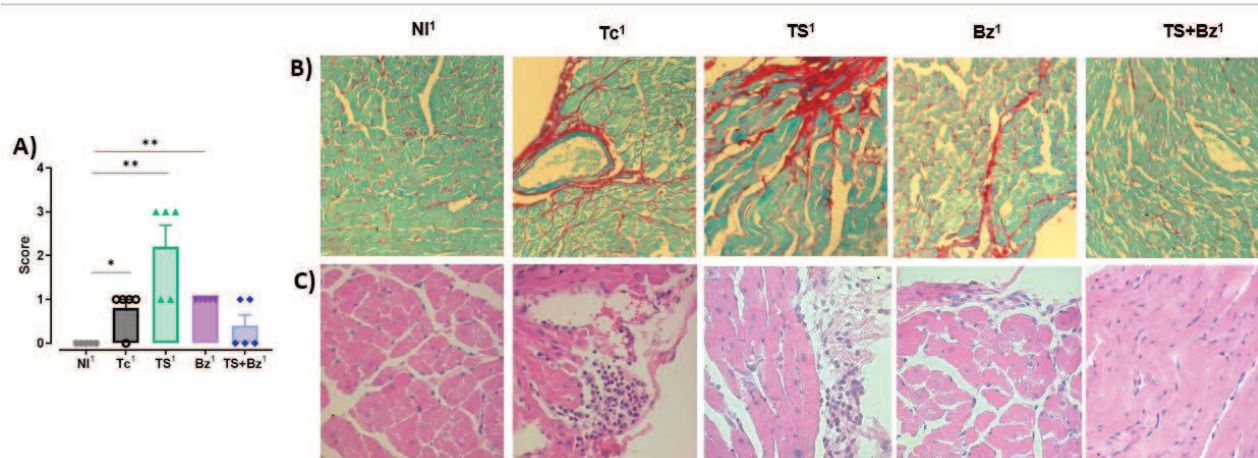


Figura 41: Análisis histológico cardíaco para evaluar la eficacia del tratamiento mixto en el modelo de infección intradérmico. El daño se categorizó mediante un *score* semicuantitativo que integra la severidad de las lesiones, el grado de fibrosis y la intensidad de los infiltrados inflamatorios (normal, leve o moderada). **A)** Representación de los valores del *score* obtenido en miocardio. Micrografías representativas de cortes histológicos (40×): **B)** fibrosis y **C)** focos inflamatorios en tejido cardíaco; Los datos se presentan como [media ± SEM]. Significancia estadística: *p < 0,05; **p < 0,01.

3.IV.a.2) Evaluación de la carga parasitaria en la etapa crónica

La carga parasitaria en tejido cardíaco durante la etapa crónica (198 dpi) fue baja en todos los grupos infectados (Tc¹, TS¹, Bz¹ y TS+Bz¹), con valores inferiores a 0.5 equivalentes de parásito por 250 ng de ADN de tejido cardíaco (Figura 42). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales.

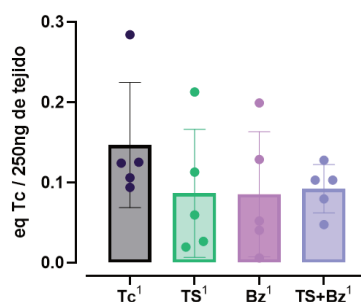


Figura 42: Análisis de la carga parasitaria cardíaca para evaluar la eficacia del tratamiento mixto en el modelo de infección intradérmico. La carga parasitaria en el tejido se determinó mediante qPCR a los 198 días post infección.

3.IV.a.3) Mediciones de ECG y análisis de arritmias

A los 198 dpi, se realizó el análisis de la actividad eléctrica cardíaca mediante electrocardiografía (ECG). Para las condiciones NI¹ y Tc¹ se trabajó con n= 4, debido a que los registros de uno de los

animales por grupo no fueron de calidad suficiente para su análisis. Los parámetros evaluados incluyeron la duración de la onda P, el complejo QRS y el intervalo QT corregido (QTc). Cabe destacar que no se incluyen en los gráficos del intervalo y el segmento PR, ya que no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos evaluados, una constante que se ha mantenido en la totalidad de los experimentos realizados para esta tesis.

El análisis de la onda P reveló un incremento significativo en su duración en el grupo Tc¹ respecto al control sano (Figura 43A), mientras que los grupos tratados (TS¹, Bz¹ y TS+Bz¹) no mostraron diferencias respecto al grupo NI¹. En cuanto a la duración del complejo QRS y el intervalo QTc, no se detectaron variaciones significativas entre los grupos experimentales analizados (Figuras 43B y 43C).

En relación con el porcentaje de arritmias, se observó un aumento numérico en la proporción de animales afectados en el grupo Tc¹ en comparación con el grupo NI¹. No obstante, esta diferencia no alcanzó la significancia estadística, posiblemente debido al tamaño reducido de la muestra. Se observó que el grupo Bz¹ presentó la menor proporción de animales con alteraciones, y se registró la presencia de un animal afectado en el grupo control (NI¹).

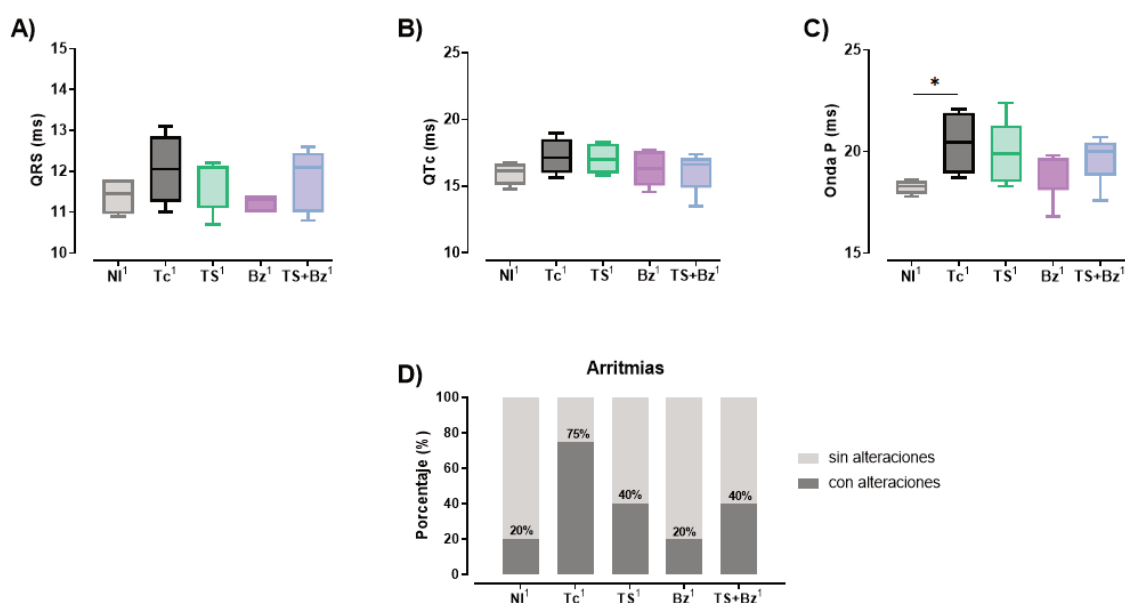


Figura 43: Alteraciones electrocardiográficas para la evaluación de la eficacia del tratamiento mixto en el modelo de infección intradérmico. Se evaluó la funcionalidad eléctrica del corazón analizando los parámetros de conducción y el ritmo cardíaco. **A)** Duración del complejo QRS. **B)** Intervalo QT corregido (QTc). **C)** Duración de la onda P. Los parámetros se expresan en milisegundos (ms). **D)** Incidencia de arritmias detectadas en los grupos experimentales. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

3.IV.a.4) Evaluación de biomarcadores de daño tisular

A los 198 dpi, se determinaron los niveles plasmáticos de las transaminasas glutámico pirúvica (GPT), marcador de daño hepático (Figura 44A), y glutámico oxalacética (GOT), indicadora de lesión en diversos tejidos incluyendo corazón, hígado y músculo esquelético (Figura 44B). Asimismo, se cuantificó la actividad de la creatina quinasa MB (CK-MB) como marcador específico de injuria miocárdica (Figura 44C). Los tres marcadores presentaron un comportamiento similar, con niveles significativamente elevados en el grupo Tc¹ en comparación con el control sano. Por el contrario, todos los grupos tratados (TS¹, Bz¹ y TS+Bz¹) mostraron niveles de estas enzimas similares a los del grupo NI¹, sin diferencias significativas entre los distintos esquemas terapéuticos.

Adicionalmente, se analizó la concentración de óxido nítrico (ON) en suero como indicador del estado inflamatorio sistémico (Figura 44D). En concordancia con los marcadores de daño tisular, el grupo Tc¹ exhibió niveles elevados de ON. En contraste, todos los grupos tratados presentaron una disminución significativa de este marcador, alcanzando valores basales similares a los del grupo NI¹, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados.

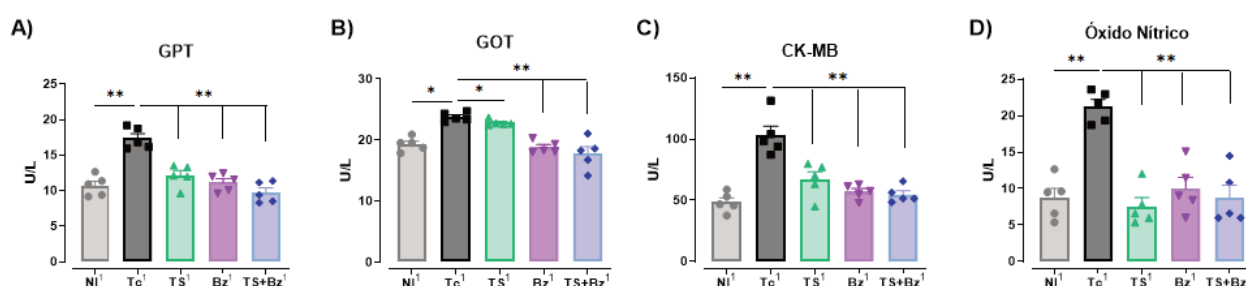


Figura 44: Análisis de los marcadores séricos de daño tisular e inflamación para evaluar la eficacia del tratamiento mixto en el modelo de infección intradérmica. Se cuantificaron los niveles de biomarcadores en suero para evaluar la integridad tisular y el estado inflamatorio sistémico. **A)** Concentración de Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT). **B)** Concentración de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT). **C)** Niveles de Creatina Quinasa MB (CK-MB) como marcador de daño cardíaco. **D)** Concentración de Óxido Nítrico (ON), indicador del estado inflamatorio sistémico. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

3.IV.a.5) Respuesta de anticuerpos tras el tratamiento

Los niveles de anticuerpos IgG1 específicos contra TS fueron significativamente más altos en el grupo TS¹ en comparación con los grupos no vacunados (NI¹, Tc¹ y Bz¹) (Figura 45A). Por su parte, el grupo TS+Bz¹ mostró niveles levemente superiores a los controles no vacunados, aunque menores a los del grupo TS¹; debido a la dispersión observada, estas diferencias no alcanzaron

significancia estadística.

En cuanto a los niveles de IgG2a específicos contra TS (Figura 45B) ambos grupos vacunados (TS¹ y TS+Bz¹) mostraron niveles significativamente más elevados respecto al control NI¹, con una magnitud de respuesta superior a la observada para el isotipo IgG1. Cabe destacar que el incremento en el grupo TS+Bz¹ fue de menor magnitud que el observado en el grupo que recibió únicamente la inmunoterapia.

En lo que respecta a la respuesta de anticuerpos contra el homogenato total del parásito (HT), todos los grupos infectados presentaron incrementos leves en los niveles de IgG1; no obstante, los grupos Tc¹ y TS¹ alcanzaron diferencias significativas respecto al control sano (NI¹) (Figura 45C).

Por su parte, los niveles de IgG2a específicos contra HT mostraron incrementos de mayor magnitud en comparación con el isotipo IgG1. En este caso, los grupos Tc¹, TS¹ y Bz¹ exhibieron niveles significativamente más elevados que el grupo NI¹. Por el contrario, el grupo mixto (TS+Bz¹) presentó valores menores que el resto de los grupos infectados, sin mostrar diferencias significativas respecto al grupo NI¹ (Figura 45D).

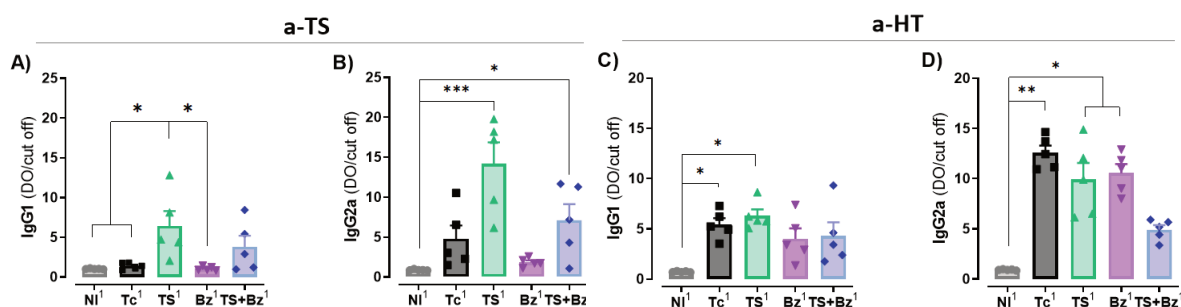


Figura 45: Evaluación de la respuesta inmune en suero del tratamiento mixto en el modelo de infección intradérmica. Se estudió la respuesta de anticuerpos en la fase crónica de la infección tras los respectivos tratamientos. Las respuestas de anticuerpos anti-TS (a-TS) se evaluaron para, IgG1 (A) e IgG2a (B). La respuesta anti-homogenato (a-HT) también se evaluó para IgG1 (C) e IgG2a (D). Los niveles de anticuerpos se indican como la DO relativa al valor de corte del ensayo ELISA. La significancia estadística se indica como: *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001.

3.IV.a.6) Evaluación de citocinas séricas en la fase crónica.

Para caracterizar la respuesta inflamatoria y pro-fibrótica sistémica en la fase crónica, se cuantificaron los niveles séricos de TGF-β1 (Figura 46) y TNF-α.

El análisis del TGF-β1 mostró que los animales del grupo Tc presentaron los niveles más elevados de esta citocina, con una diferencia altamente significativa respecto al control sano. Asimismo,

los grupos tratados con las monoterapias TS¹ y Bz¹ también exhibieron valores significativamente superiores al grupo NI¹. Si bien los tres tratamientos mostraron una tendencia a disminuir los niveles de esta citocina en comparación con el grupo Tc¹, esta reducción no alcanzó la significancia estadística. Cabe destacar que el tratamiento mixto (TS+Bz¹) fue el único que logró una disminución tal que sus valores no presentaron diferencias significativas respecto al grupo NI¹.

Respecto a la determinación de TNF- α , las densidades ópticas de todas las muestras analizadas se situaron por debajo del límite de sensibilidad de la curva estándar. Debido a que este ensayo requiere un volumen considerable de muestra, no fue posible realizar una nueva determinación.

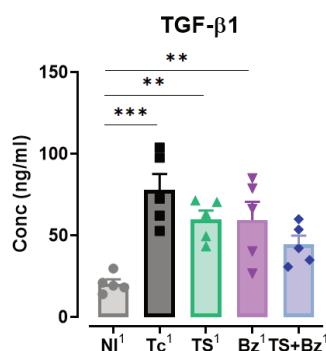


Figura 46: Perfil de citocinas sistémicas de los tratamientos con vacuna, Bz o mixto en el modelo de infección intradérmico. Se determinó la concentración de citocinas proinflamatorias y reguladoras en suero. Niveles de TGF- β . Los resultados se expresan como ng/ml y representan la media $\pm$ SEM de cada grupo experimental. La significancia estadística se indica como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.IV.b) Diseño Experimental II: Optimización del esquema terapéutico en el modelo intradérmico

Tras validar el esquema mixto, se realizó un ensayo exploratorio para determinar si una única ronda de 7 días de benznidazol es capaz de generar una respuesta biológica medible. Este diseño funcionó como una prueba de concepto para evaluar la utilidad de un tratamiento corto farmacológico antes de su integración en un esquema de doble ronda, analizando marcadores tempranos de carga parasitaria y respuesta inmune.

3.IV.b.1) Evaluación de la carga parasitaria

La presencia de ADN de *T. cruzi* en el tejido cardíaco se evaluó mediante qPCR, registrándose nuevamente niveles de persistencia parasitaria bajos en todas las condiciones experimentales (Figura 47).

Al comparar los grupos infectados, se observó que el tratamiento con benznidazol (grupo Bz²)

logró una reducción de la carga parasitaria significativamente mayor en comparación con el grupo Tc^2 . Por su parte, el grupo vacunado (TS^2) mostró una tendencia hacia la disminución de la carga respecto al control infectado, aunque sin alcanzar la significancia estadística convencional ($p = 0.0729$).

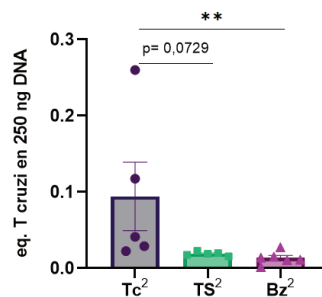


Figura 47: Carga parasitaria cardíaca como indicador para la optimización del esquema de tratamientos individuales de vacuna o Bz en el modelo de infección intradérmico. La carga parasitaria en el tejido se determinó mediante qPCR a los 83 días post infección. La significancia estadística se indica como $**p < 0.01$, para Tc^2 vs TS^2 $p=0.0729$.

3.IV.b.2) Evaluación de biomarcadores de daño tisular

En esta etapa, se evaluaron los niveles de las transaminasas hepáticas y la concentración de óxido nítrico como indicadores del estado general y la severidad del proceso inflamatorio.

Respecto a la enzima GPT (Figura 48A), el grupo Tc^2 exhibió los valores más elevados, observándose una marcada tendencia hacia la disminución de este marcador en los grupos tratados, tanto para el grupo Bz^2 ($p = 0.056$) como para el grupo TS^2 ($p = 0.0915$). En cuanto a la actividad de la GOT (Figura 48B), el grupo Tc^2 presentó niveles significativamente superiores a los grupos tratados. Finalmente, el análisis del ON (Figura 48C) reveló un perfil similar. El grupo Tc^2 mostró los niveles más altos de este marcador inflamatorio ya que el tratamiento con Bz^2 logró una reducción significativa respecto al control infectado. Por otro lado, el grupo tratado con la vacuna (TS^2) presentó una tendencia hacia la disminución, pero sin alcanzar la significancia estadística convencional ($p = 0.0968$).

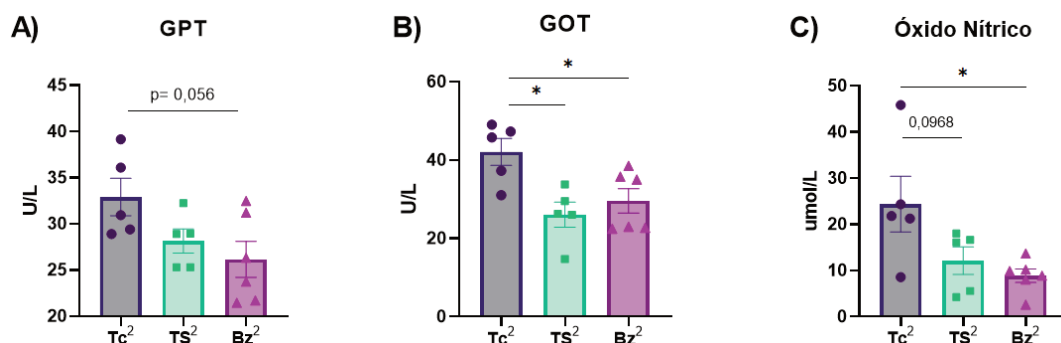


Figura 48: Marcadores séricos de daño tisular e inflamación como indicadores para la optimización del esquema de tratamientos individuales de vacuna o Bz en el modelo de infección intradérmico. Se cuantificaron los niveles de biomarcadores en suero para evaluar la integridad tisular y el estado inflamatorio sistémico. **A)** Concentración de Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT); se indican la tendencia ($p=0,056$) en Bz² frente a Tc². **B)** Concentración de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT). **C)** Concentración de Óxido Nítrico (ON), indicador del estado inflamatorio sistémico; se indica la tendencia en TS² vs Tc² ($p=0,0968$). La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

3.IV.b.3) Respuesta de anticuerpos tras el tratamiento

La respuesta humoral se evaluó mediante la cuantificación de anticuerpos específicas contra la proteína vacunal trans-sialidasa (TSNt) y contra homogenato de *T. cruzi*.

En primer lugar, se determinó la generación de anticuerpos contra la proteína TSNt para evaluar la inmunogenicidad de la formulación vacunal. Se confirmó que el grupo que recibió el esquema de inmunización (TS') presentó niveles significativamente elevados de anticuerpos específicos IgG1 (Figura 49A) e IgG2a (Figura 49B) en comparación con los grupos no vacunados. Este resultado corrobora la capacidad de la formulación para inducir una respuesta humoral robusta y dirigida contra este antígeno.

Por otro lado, se analizó la reactividad frente al homogenato del parásito, observándose que todos los grupos infectados evidenciaron la presencia de anticuerpos específicos de los isotipos IgG1 (Figura 49C) e IgG2a (Figura 49D), con una relación DO/Cutoff superior a 1 en todos los casos. No se registraron diferencias significativas en los niveles de estas inmunoglobulinas entre los distintos grupos infectados.

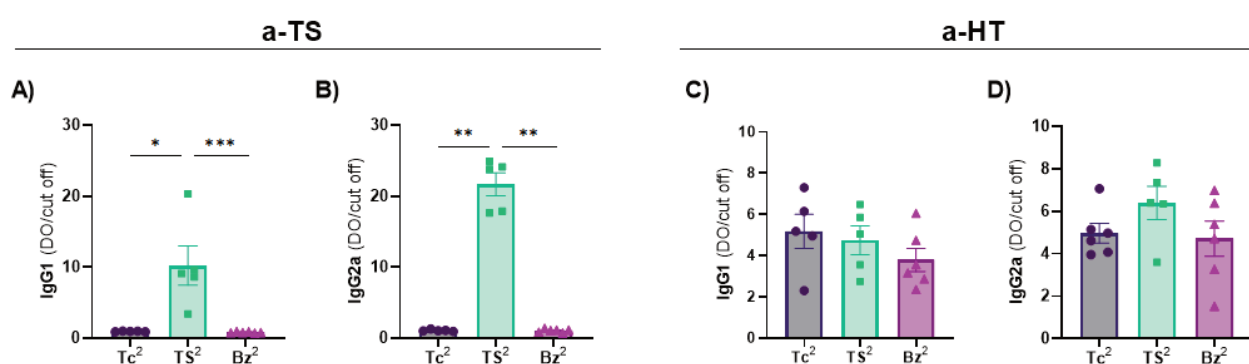


Figura 49. Evaluación de la respuesta inmune en suero de los tratamientos individuales de vacuna o Bz para la optimización del esquema en el modelo de infección intradérmico. Se estudió la respuesta de anticuerpos en la fase crónica de la infección tras los respectivos tratamientos. Las respuestas de anticuerpos anti-TS (a-TS) se evaluaron para **A)** IgG1 y **B)** IgG2a. La respuesta anti-homogenato (a-HT) también se evaluó para **C)** IgG1 y **D)** IgG2a. Los niveles de anticuerpos se indican como la DO relativa al valor de corte del ensayo ELISA. La significancia estadística se indica como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

3.IV.b.4) Análisis de la citometría de flujo

Para caracterizar el perfil de la respuesta inmune celular, se analizó el número absoluto de diferentes poblaciones de linfocitos T en el bazo. Las estrategias de *gating* utilizadas para la identificación de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ se detallan en las Figuras 50A y 50E, respectivamente.

En términos generales, se observó una tendencia al incremento en el número absoluto de células en los grupos tratados respecto al control infectado (Tc²). Al analizar la población de linfocitos CD4⁺ (Figura 50B), el grupo tratado con benznidazol (Bz²) presentó un aumento estadísticamente significativo en comparación con el grupo Tc².

Al evaluar el perfil de expresión de citocinas de estas células, se observaron cambios en ambos esquemas terapéuticos. El grupo TS² presentó un incremento significativo en el número de células CD4⁺ productoras de IFN-γ (Figura 50D). Por su parte, el grupo Bz² mostró aumentos significativos tanto en la población CD4⁺ IFN-γ como en la subpoblación CD4⁺ secretora de IL-10 (Figura 50E). Respecto a los linfocitos CD8⁺, el análisis de la capacidad citotóxica reveló un incremento significativo en el número de células CD8⁺CD107a⁺ en el grupo Bz² respecto al control Tc² (Figura 50H).

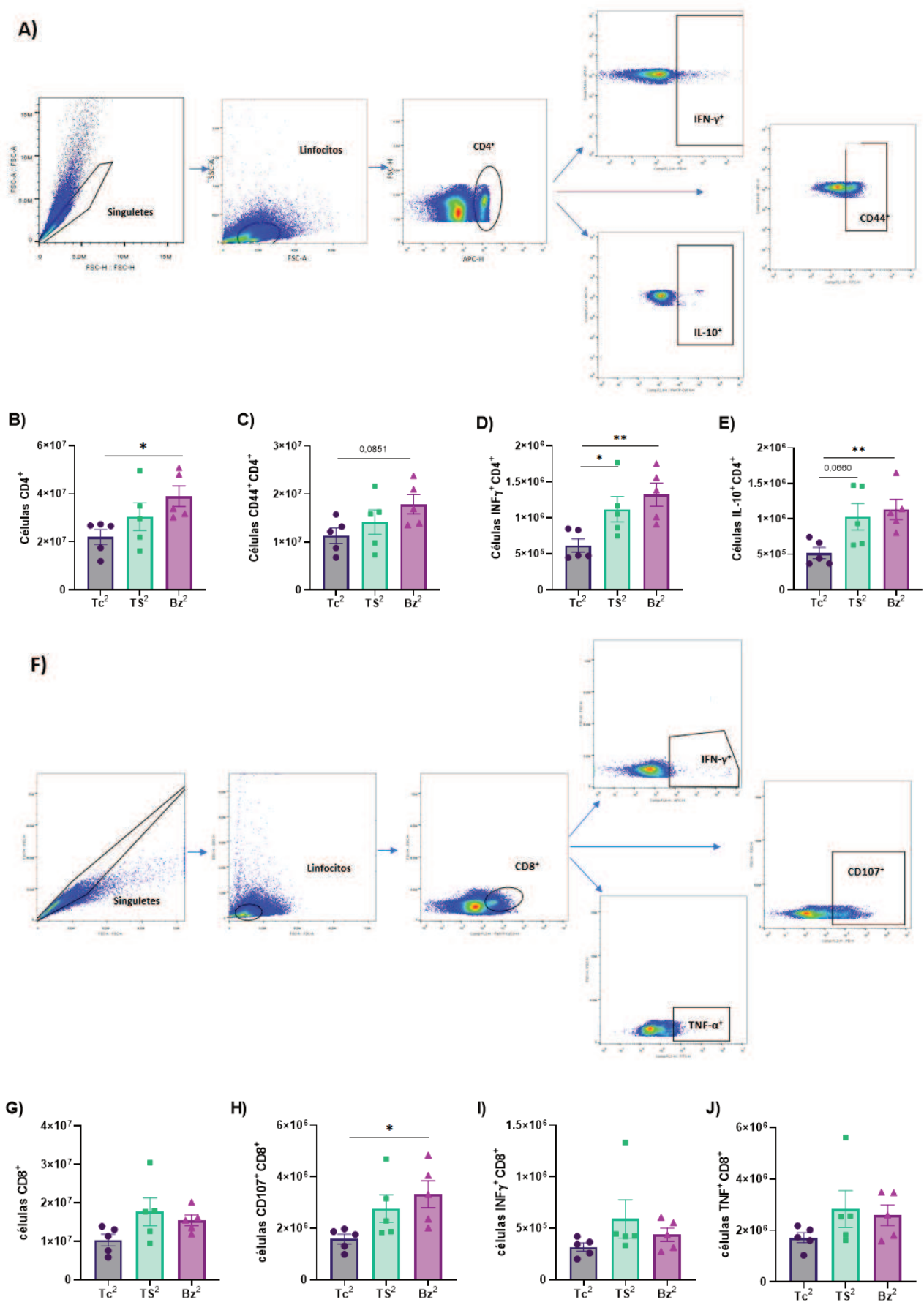


Figura 50. Evaluación de la respuesta inmune celular de tipo T en esplenocitos de los animales tratados en el esquema para optimización del modelo de infección intradérmico. Los esplenocitos fueron obtenidos al finalizar el protocolo experimental y reestimulados in vitro con homogenato de *T. cruzi* en co-cultivo con células dendríticas activadas. **A)** Estrategia de selección (*gating*) representativa para el análisis de la población CD4⁺. Frecuencia de linfocitos **B)** T helper totales (CD4⁺), **C)** activados (CD4⁺CD44⁺), y porcentaje de células productoras de **D)** IFN- γ y **E)** IL-10 dentro de la población CD4⁺. **F)** Estrategia de selección (*gating*) representativa para el análisis de la población CD8⁺. Porcentaje de linfocitos **G)** citotóxicos totales (CD8⁺), **H)** degranulantes (CD8⁺CD107⁺), y producción intracitoplasmática de **I)** IFN- γ y **J)** TNF- α por parte de los linfocitos CD8⁺. Las barras representan el porcentaje (%) de células positivas dentro de cada población específica (Gated cells), expresado como la media $\pm$ error estándar (SEM) de cada grupo experimental. El análisis de los datos se realizó mediante el software FlowJo. Los niveles de significancia estadística se indican como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.IV.4) c) Diseño Experimental III: Implementación del esquema secuencial en el modelo intradérmico.

Finalmente, se evaluó la eficacia del protocolo integrador basado en un esquema secuencial y fraccionado. Este diseño integró la inmunoterapia con dos rondas cortas de 7 días de benznidazol, con el fin de determinar si el distanciamiento de las dosis y la potenciación de la vacuna logran una depuración superior de los reservorios tisulares y una mayor protección cardíaca, reduciendo significativamente la dosis total de fármaco administrada.

3.IV. c.1) Evaluación del daño histopatológico tisular en la fase crónica

La integridad del tejido miocárdico se evaluó mediante el análisis de la extensión de los infiltrados inflamatorios (hematoxilina-eosina) y el depósito de colágeno/fibrosis (Rojo Picosirius). En la Figura 51C se presentan imágenes representativas de cada grupo experimental (aumento 40x). En términos generales, las alteraciones tisulares observadas en este modelo crónico se categorizaron como leves a moderadas. Consistente con el modelo de infección crónica, se observó que el grupo Tc³ exhibió aumentos significativos tanto de niveles de fibrosis (Figura 51A) como en el grado de infiltrados (Figura 51B) frente al control sano (NI³).

En cuanto al análisis de la fibrosis (Figura 51A), el grupo Tc³ exhibió los puntajes más elevados de depósito de colágeno. Asimismo, el grupo TS³ mostró un aumento significativo de este parámetro respecto al control NI³. Por el contrario, los esquemas mixtos TS-Bz³ y Bz-TS-Bz³ lograron reducir significativamente estos niveles en comparación con el control infectado. Si

bien los grupos tratados con las monoterapias (TS³ y Bz³) mostraron valores menores de fibrosis respecto al grupo Tc³, estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística frente a los demás grupos.

Por otra parte, la presencia de infiltrados inflamatorios mostró un comportamiento similar. El grupo Tc³ presentó un mayor grado de inflamación, con diferencias significativas respecto a los grupos Bz³, TS-Bz³ y Bz-TS-Bz³. Es importante destacar que en el grupo TS-Bz³ la totalidad de los animales presentó un tejido de apariencia normal, carente de infiltrados inflamatorios detectables.

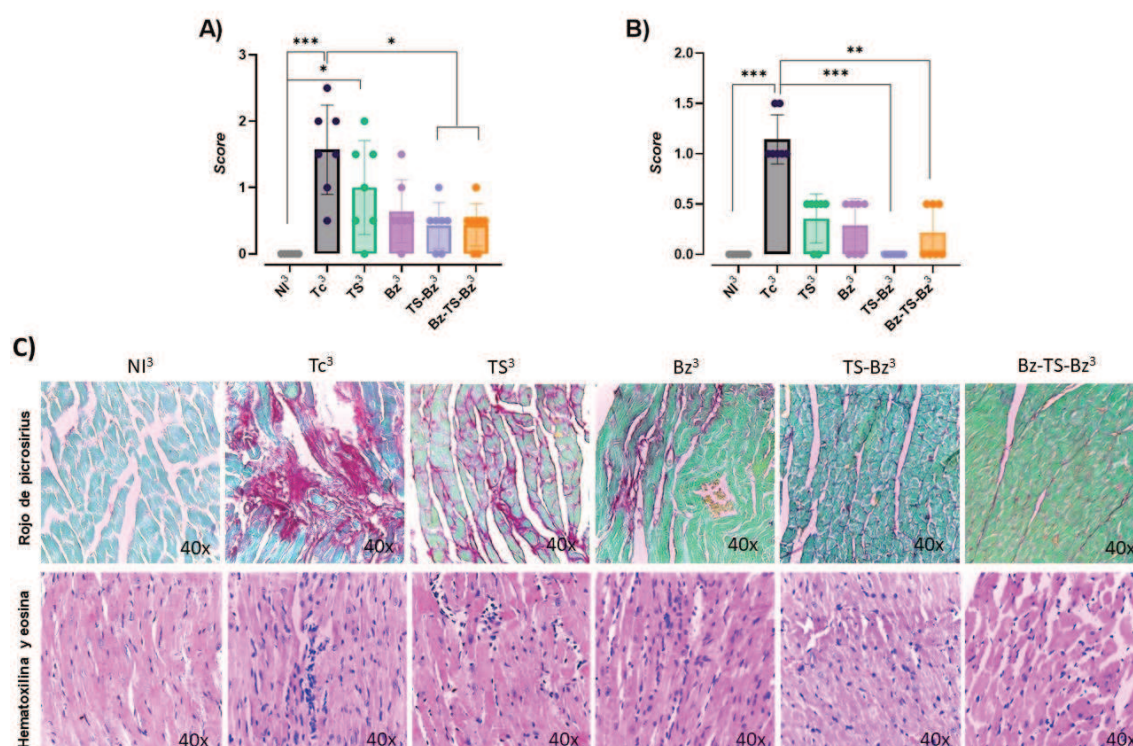


Figura 51: Análisis de la histopatología cardíaca como indicador de eficacia del tratamiento secuencial en el modelo de infección intradérmica. A) Score de fibrosis en corazón tinción de rojo de picrosirius (P). B) Score de infiltrados inflamatorios en corazón tinción hematoxilina-eosina (H&E). C) Imágenes 40x de cortes histológicos de corazón con las tinciones de P y H&E (en la tinción P: verde= citoplasma muscular, rojo= fibras de colágeno; en la tinción H&E: azul= tinción nuclear, rosado= citoplasma celular).

3.IV.c.2) Evaluación de la carga parasitaria

La persistencia de ADN de *T. cruzi* en el tejido cardíaco se determinó mediante qPCR a los 190 dpi. En concordancia con los experimentos previos, se registraron niveles de carga parasitaria bajos en todas las condiciones analizadas, con valores siempre inferiores a los 0,5 equivalentes de parásito por 250 ng de ADN tisular (Figura 52).

Al evaluar el impacto de las diferentes intervenciones, se observó que todos los esquemas terapéuticos aplicados lograron reducir la carga parasitaria en comparación con el grupo control infectado (Tc^3). No obstante, esta disminución alcanzó niveles de significancia estadística únicamente en el grupo tratado con la monoterapia de benznidazol (grupo Bz^3) y en el grupo bajo el esquema secuencial $Bz-TS-Bz^3$ ($p < 0.05$). Es importante resaltar que, en este último grupo, dos animales negativizaron la carga parasitaria en el tejido miocárdico.

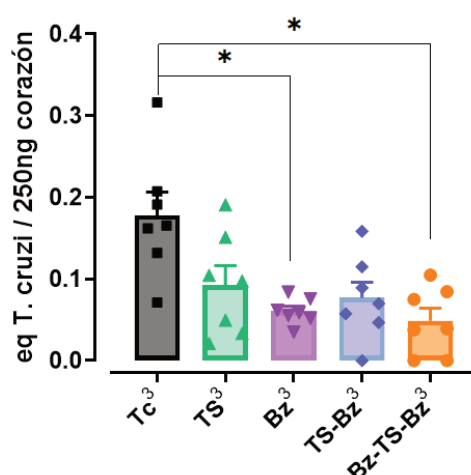


Figura 52: Análisis de la carga parasitaria cardíaca para evaluar la eficacia del tratamiento secuencial en el modelo de infección intradérmico. La carga parasitaria en el tejido se determinó mediante qPCR a los 190 días post infección. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

3.IV.c.3) Mediciones de ECG y análisis de arritmias

A los 190 dpi, se analizó la actividad eléctrica cardíaca mediante ECG. Debido a artefactos en el registro, un animal del grupo $TS-Bz^3$ fue excluido del análisis de morfología de ondas, aunque pudo ser incluido en la determinación de la frecuencia cardíaca.

El análisis de la duración de la onda P (Figura 53A) reveló un incremento significativo en el grupo Tc^3 respecto al control NI^3 . El grupo TS^3 mostró una tendencia similar al grupo infectado ($p = 0.0625$), mientras que el grupo de tratamiento secuencial ($Bz-TS-Bz^3$) no solo no presentó diferencias con el grupo NI^3 , sino que exhibió la menor dispersión de datos entre los grupos evaluados. Por otro lado, no se detectaron variaciones significativas en la duración del complejo QRS entre ninguna de las condiciones experimentales (Figura 53B). En cuanto al intervalo QT corregido (QTc) (Figura 53C), se observó un incremento significativo en los grupos Tc^3 y TS^3 en comparación con el grupo NI^3 , sugiriendo una alteración en la repolarización ventricular en estos animales.

Finalmente, se evaluó la incidencia de arritmias (Figura 53D). El grupo Tc^3 presentó la mayor

proporción de animales afectados (superior al 50%), mientras que el esquema secuencial mostró la menor incidencia. No obstante, se observó que la mitad de los animales del grupo control (NI^3) también presentaron alteraciones del ritmo. Este hallazgo en el grupo sano sugiere que los resultados de este parámetro deben ser interpretados con cautela, ya que podrían estar influenciados por el efecto de la anestesia.

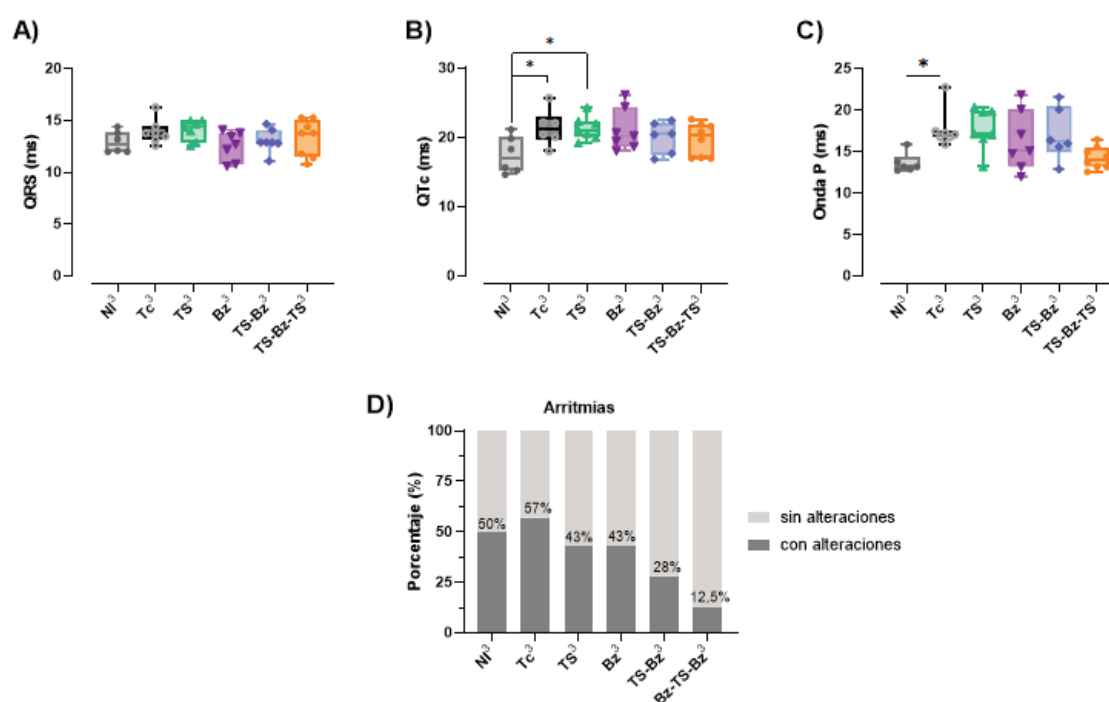


Figura 53: Análisis de las alteraciones electrocardiográficas como indicador de eficacia del tratamiento secuencial en el modelo de infección intradérmico. Se evaluó la funcionalidad eléctrica del corazón analizando los parámetros de conducción y el ritmo cardíaco. **A)** Duración del complejo QRS. **B)** Intervalo QT corregido (QTc). **C)** Duración de la onda P. Los parámetros se expresan en milisegundos (ms). **D)** Incidencia de arritmias detectadas en los grupos experimentales. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$.

3.IV.c.4) Respuesta de anticuerpos tras el tratamiento

La capacidad de los diferentes protocolos para inducir una respuesta dirigida específicamente contra el antígeno vacunal se determinó mediante la cuantificación de anticuerpos anti-TSNT. En términos generales, los niveles de IgG total (Figura 54A) reflejaron un comportamiento promedio de los isotipos evaluados, mostrando valores por encima del umbral de positividad ($DO/Cutoff > 1$) en todos los grupos que recibieron la formulación vacunal (TS^3 , $TS-Bz^3$ y $Bz-TS-Bz^3$). A pesar de este patrón común, la magnitud de la respuesta fue diferente entre los grupos. En todos los grupos vacunados predominó el isotipo IgG2a (Figura 54C) sobre el IgG1 (Figura

54B), aunque esta diferencia fue mucho más acentuada en el esquema secuencial Bz-TS-Bz³. En este grupo, la respuesta se inclinó marcadamente hacia la IgG2a, mientras que los niveles de IgG1 se mantuvieron cerca del límite de corte, sin diferencias significativas respecto a los controles negativos. Por el contrario, el grupo TS-Bz³ presentó la reactividad más baja entre los inmunizados, solo presentó una diferencia significativa en IgG1 respecto a los grupos Bz³ y TS³. Estos hallazgos sugieren que, aunque todos los esquemas inducen un perfil de tipo Th1, la secuencia Bz-TS-Bz³ es la que logra la polarización más robusta.

De manera complementaria, se evaluó la respuesta humoral frente al homogenato del parásito. Todos los grupos infectados presentaron niveles de anticuerpos por encima del umbral de positividad (DO/Cutoff > 1). En términos generales, la respuesta se caracterizó por la predominancia de IgG total (Figura 54D) e IgG2a (Figura 54F), cuyos niveles superaron a los registrados para el isotipo IgG1 (Figura 54E). A pesar de estas diferencias en magnitud, el patrón de comportamiento intergrupar se mantuvo para los tres marcadores evaluados.

Las mayores reactividades y las diferencias más marcadas respecto al grupo control NI³ se registraron en los grupos Tc³ y TS³. Por el contrario, los esquemas que incluyeron el uso de benznidazol tendieron a mostrar niveles de anticuerpos más bajos. Específicamente, el esquema secuencial Bz-TS-Bz³ presentó niveles significativamente menores de IgG total (Figura 54D) en comparación con los grupos de mayor reactividad, además de una disminución significativa de IgG2a (Figura 54F) respecto al grupo Tc³. Un comportamiento análogo se observó en el grupo tratado con la monoterapia de benznidazol (Bz³), el cual también evidenció una reducción significativa en los niveles de IgG2a (Figura 54F) al compararse con el control infectado.

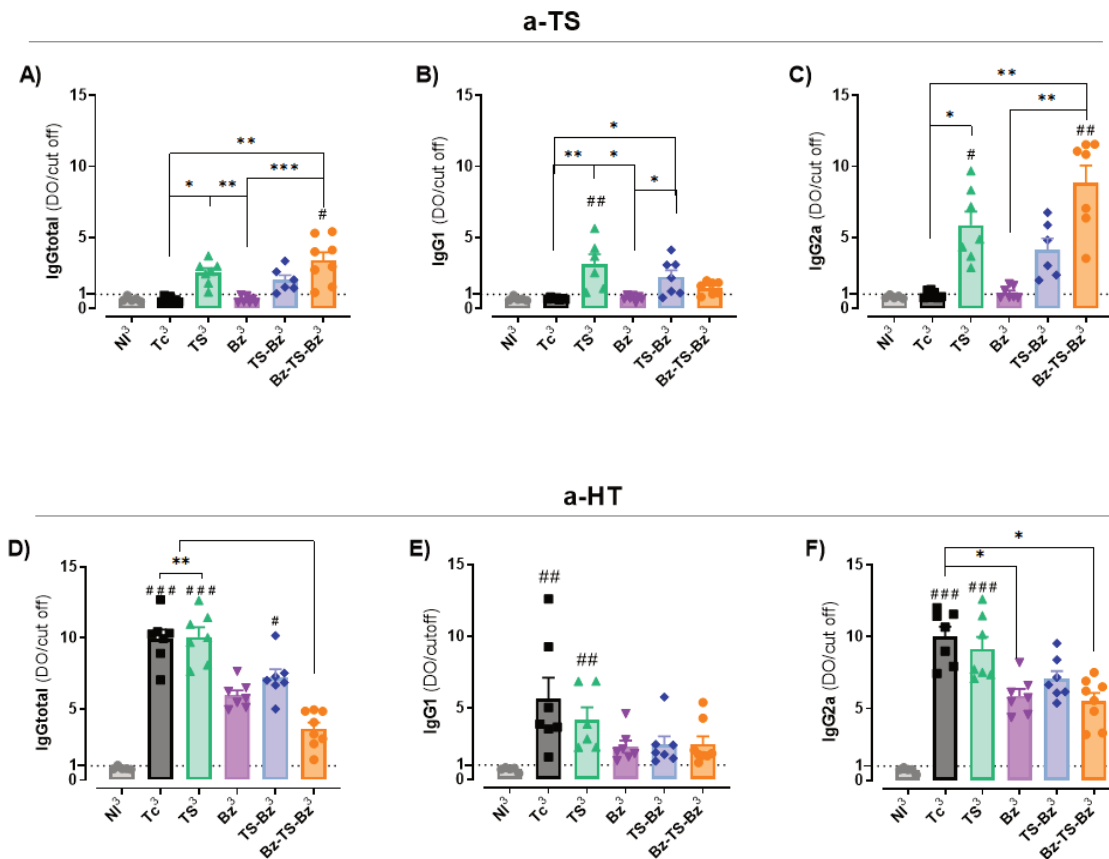


Figura 54: Evaluación de la respuesta inmune en suero del tratamiento secuencial en el modelo de infección intradérmica. Se estudió la respuesta de anticuerpos en la fase crónica de la infección tras los respectivos tratamientos. Las respuestas de anticuerpos anti-TS (a-TS) se evaluaron para, IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C). La respuesta anti-homogenato (a-HT) también se evaluó para IgG total (D) IgG1 (E) e IgG2a (F). Los niveles de anticuerpos se indican como la DO relativa al valor de corte del ensayo ELISA. La significancia estadística entre los grupos infectados se indica como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las diferencias significativas de cada grupo respecto al grupo de ratones no infectados (NI³) se indican como: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$

3. IV.c.5) Análisis de la respuesta celular por citometría de flujo

Para caracterizar la respuesta celular antígeno-específica, los esplenocitos fueron reestimulados *in vitro* con homogenato del parásito en presencia de células presentadoras de antígeno (DC). Tras 15 horas de este estímulo, se procedió a caracterizar las subpoblaciones celulares mediante citometría de flujo.

En cuanto a la población de linfocitos CD4⁺ (Figura 55B), se observó un aumento significativo en el porcentaje de estas células en los grupos TS³ y TS-Bz³ al compararlos con el grupo control Tc³. Al analizar el estado de activación mediante la expresión del marcador CD44 (Figura 55C), el grupo Bz-TS-Bz³ mostró un incremento significativo respecto al grupo TS³, así como una

tendencia superior al grupo NI³ ($p = 0.0793$).

En relación al perfil de citocinas efectoras, las células CD4⁺ productoras de IFN- γ (Figura 55D) se vieron incrementadas en el grupo TS³ respecto a los grupos NI³ y Bz³. Por su parte, el grupo secuencial evidenció una leve tendencia al aumento en comparación con el control NI³ ($p = 0.0825$).

Finalmente, se analizó la respuesta reguladora a través de las células CD4⁺ productoras de IL-10 (Figura 55E). En este parámetro, el grupo secuencial se destacó notablemente, mostrando un incremento en comparación con todos los grupos experimentales, el cual fue estadísticamente significativo frente a Tc³, TS³ y Bz³.

De manera complementaria, se analizó el comportamiento de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ bajo las mismas condiciones de estimulación. A diferencia de lo observado en la población CD4⁺, el porcentaje total de células CD8⁺ (Figura 55G) no presentó variaciones significativas entre los diferentes grupos experimentales.

Sin embargo, se detectaron diferencias relevantes al evaluar la capacidad citotóxica y el perfil funcional de estas células. En cuanto a la expresión del marcador de degranulación CD107a (Figura 55H), el grupo tratado con la monoterapia de benznidazol (Bz) mostró un incremento significativo en relación con los grupos NI³, Tc³ y TS³.

Por otra parte, al analizar la producción de citocinas proinflamatorias, las células CD8⁺ productoras de TNF- α (Figura 55I) evidenciaron un aumento en su porcentaje dentro del grupo Bz-TS-Bz³, alcanzando la significancia estadística frente a los controles NI³ y Tc³. Finalmente, no se registraron diferencias significativas entre los grupos para la producción de IFN- γ (Figura 55J) en esta subpoblación celular.

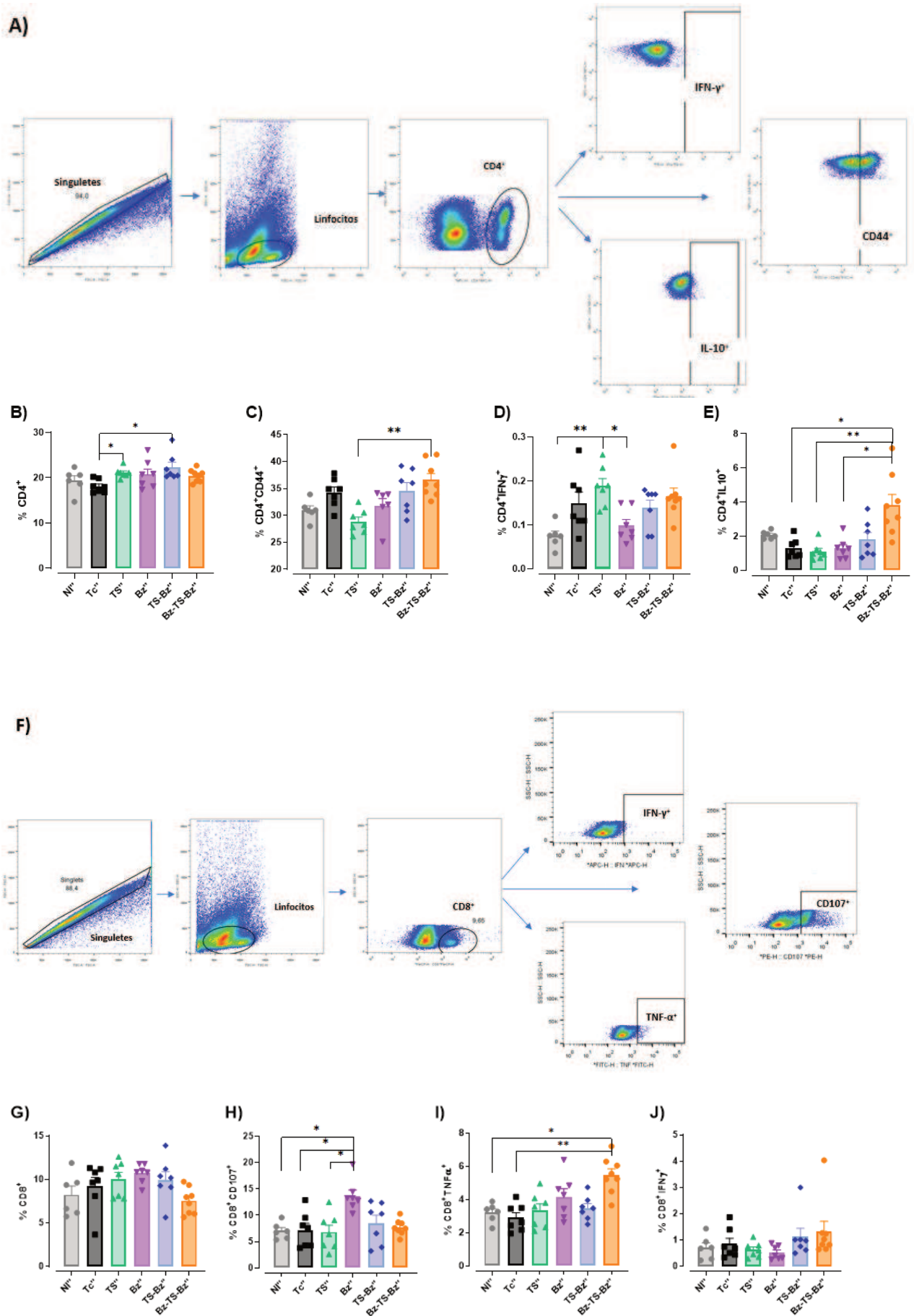


Figura 55: Evaluación de la respuesta inmune celular de tipo T en esplenocitos de los animales tratados en el esquema secuencial del modelo de infección intradérmico. Los esplenocitos fueron obtenidos al finalizar el protocolo experimental y reestimulados in vitro con homogenato de *T. cruzi* en co-cultivo con células dendríticas activadas. **A)** Estrategia de selección (*gating*) representativa para el análisis de la población CD4⁺. Frecuencia de linfocitos **B)** T helper totales (CD4⁺), **C)** activados (CD4⁺CD44⁺), y porcentaje de células productoras de **D)** IFN- γ y **E)** IL-10 dentro de la población CD4⁺. **F)** Estrategia de selección (*gating*) representativa para el análisis de la población CD8⁺. Porcentaje de linfocitos **G)** citotóxicos totales (CD8⁺), **H)** degranulantes (CD8⁺CD107⁺), y producción intracitoplasmática de **I)** TNF- α y **J)** IFN- γ por parte de los linfocitos CD8⁺. Las barras representan el porcentaje (%) de células positivas dentro de cada población específica (Gated cells), expresado como la media $\pm$ error estándar (SEM) de cada grupo experimental ($n = X$ ratones por grupo). El análisis de los datos se realizó mediante el software FlowJo. Los niveles de significancia estadística se indican como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.V) Discusión

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que la integración de la inmunoterapia con la vacuna TSNT-ISPA y el tratamiento con benznidazol constituye una estrategia quimio-inmunoterapéutica superior a las monoterapias para el abordaje de la fase crónica de la infección por *T. cruzi*.

A través de un proceso de optimización del protocolo, se validó inicialmente la complementariedad de ambos componentes en un esquema mixto de referencia (Diseño I), logrando la preservación del tejido miocárdico y una reducción de los biomarcadores de injuria. No obstante, el hallazgo de que protocolos acortados de benznidazol logra modular positivamente el perfil celular (Diseño II) permitió evolucionar hacia la implementación de un protocolo secuencial (Diseño III). Este último esquema, basado en el distanciamiento de las dosis, resultó ser el más eficaz no solo para reducir la carga parasitaria, sino para promover una respuesta inmune balanceada entre perfiles efectores y reguladores. En conjunto, estos hallazgos demuestran la eficacia de estas terapias mixtas, sugiriendo que la integración temporal de la vacunación y el fármaco maximiza la protección miocárdica incluso con tratamientos cortos de este último.

3.V.a) Diseño I

Los resultados del Diseño I permiten establecer una línea de base sólida sobre la eficacia del tratamiento mixto frente a las monoterapias en el modelo de infección crónica por *T. cruzi*. El hallazgo más relevante es que, si bien todas las intervenciones (monoterapias y tratamiento mixto) lograron mitigar el daño sistémico y el estrés oxidativo (normalizando los niveles de transaminasas, CK-MB y ON), solo el tratamiento mixto (TS+Bz¹) fue capaz de preservar de manera integral la arquitectura miocárdica y normalizar los niveles de TGF- β . Estos datos validan la robustez del modelo experimental utilizado, el cual muestra una correlación directa con los antecedentes del grupo (181). Al igual que en dicho trabajo de referencia y los descriptos en el Capítulo 1, la infección de ratones BALB/c con la cepa Tulahuen cl2 logró establecer a los 198 dpi una patología crónica caracterizada por una carga parasitaria miocárdica extremadamente baja.

Específicamente en este diseño, la reducción de la carga mediada por los tratamientos no alcanzó la significancia estadística frente al grupo control. No obstante, a pesar de esta carga

mínima y homogénea, el grupo control (Tc¹) exhibió un daño histopatológico y funcional, caracterizados por fibrosis y aumento de arritmias. Tal como se reportó en Prochetto et al. (2022), donde el grupo infectado sin tratamiento presentó los niveles más altos de alteraciones electrocardiográficas e injuria cardíaca crónica.

Este hallazgo refuerza la hipótesis de que la severidad de la cardiopatía chagásica crónica no depende estrictamente de una gran cantidad de parásitos presentes, sino de la persistencia de una respuesta inmunopatológica desencadenada por la presencia residual del parásito en nichos tisulares específicos (40,41,182). Por lo tanto, el hecho de que el daño persista aun cuando la carga es apenas detectable valida el modelo como una representación fiel de la cronicidad humana, donde las alteraciones electrocardiográficas y la inflamación no siempre guardan una correlación directa con la carga parasitaria (142).

Al analizar las intervenciones, se observó que la monoterapia con benznidazol (Bz¹) resultó insuficiente por sí sola para revertir el daño histopatológico. Aunque este fármaco posee una potente actividad tripanocida y logró mitigar las alteraciones electrocardiográficas, los niveles de lesión tisular y la expresión de TGF- β (citocina críticamente asociada al proceso profibrótico y al daño tisular crónico (200,231,232)) se mantuvieron elevados y en valores similares al grupo control Tc¹. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Francisco et al. (231), quienes demostraron que, si el tratamiento comienza en la etapa crónica, no logra evitar la fibrosis cardíaca aun en modelos que alcanzan la eliminación del parásito.

Es importante destacar que la eficacia del benznidazol es altamente dependiente de la combinación entre la cepa del ratón y el linaje del parásito (233). Por ejemplo, mientras que ratones BALB/c infectados con la cepa CL Brener han sido curados con dosis de 100 mg/kg por 20 días (234), otros modelos como el C57BL/6 infectado con la misma cepa y tratado por 15 días no logran la cura (233). En otros estudios, la cepa Tulahuen cl2 se ha reportado como sensible al benznidazol (81,235), a diferencia de cepas como Sylvio X10/4 o Colombia, que presentan una gran resistencia natural (236).

Elegir un modelo y un esquema de tratamiento que no logre la eliminación total del parásito, como ocurrió en este Diseño I, representa una aproximación más cercana a la realidad clínica humana. En pacientes crónicos, el tratamiento con benznidazol es limitado debido a sus efectos adversos y, frecuentemente, no proporciona la cura parasitológica independientemente de las dosis o duraciones del tratamiento administrado (57).

Con respecto a la efectividad de la vacuna administrada como monoterapia (TS¹) tampoco logró revertir las lesiones en el tejido; por el contrario, este grupo presentó, de forma persistente, los niveles más elevados de daño histopatológico. No obstante, es relevante destacar que ambos

grupos tratados con monoterapias (TS¹ y Bz¹) mostraron una disminución significativa en las transaminasas séricas y en los niveles de ON, alcanzando valores similares a los del grupo no infectado. Este descenso en los biomarcadores de injuria sistémica y de estrés oxidativo podría interpretarse como un signo de buen pronóstico (173–175,237,238)

, sugiriendo que las monoterapias logran mitigar el estado inflamatorio general.

La normalización de la CK-MB sugiere que las intervenciones mitigaron la destrucción activa de las células cardíacas, lo que sería compatible con un cese del daño celular agudo observado en el grupo Tc¹ (173). La caída del ON es consistente con una posible mitigación del estado inflamatorio y del estrés oxidativo sistémico. Si bien el ON es un agente microbicida esencial, su normalización en esta etapa podría interpretarse como un signo de estabilidad metabólica frente a la persistencia parasitaria (155,172).

Esta diferencia entre la mejoría en los biomarcadores séricos y la persistencia del daño tisular sugiere que, para recuperar la estructura del corazón, no basta con detener el daño sistémico. Es posible que, en estos esquemas, la recuperación de la arquitectura tisular sea un proceso más tardío o de menor magnitud en comparación con la respuesta observada en el tratamiento mixto.

En contraste, el grupo de tratamiento mixto (TS+Bz¹) fue el único que logró una preservación significativa de la arquitectura miocárdica, sin presentar diferencias con el grupo sano (NI¹). La capacidad exclusiva de este grupo para normalizar los niveles de TGF- β , sugiere que la vacunación con TSnt-ISPA aporta el componente de inmunomodulación necesario para regular la respuesta inflamatoria exacerbada. Esto sugiere que la combinación aporta un componente de inmunomodulación en el miocardio que las monoterapias no alcanzan por sí solas. Este sinergismo permitiría atenuar la respuesta inmunopatológica local, facilitando la recuperación estructural del tejido incluso ante la persistencia residual del parásito.

Al evaluar la respuesta de anticuerpos a los 198 dpi, se observó que los grupos que recibieron la formulación vacunal (TS¹ y TS+Bz¹) presentaron niveles significativamente elevados de IgG1 e IgG2a específicos contra el antígeno TSnt, lo que respalda una inmunización exitosa y prolongada en el tiempo. Por otra parte, los anticuerpos contra el homogenato total del parásito (HT) resultaron positivos para todos los grupos infectados, confirmando el establecimiento de la respuesta inmune frente a la infección crónica. En ambos casos, el isotipo predominante fue IgG2a sobre IgG1 para los dos antígenos evaluados, lo que sugiere una respuesta celular efectora compatible con el fenotipo Th1.

Un hallazgo llamativo, reproducido también en dos experimentos independientes (datos no mostrados), es la disminución de los títulos de anticuerpos anti-HT en el tratamiento mixto en

comparación con los demás grupos infectados. Esta diferencia se visualiza con mayor claridad en el isotipo IgG2a, donde se observó una tendencia a la significancia estadística frente al grupo control (Tc^1 vs. $TS+Bz^1$, $p=0.0771$).

Esta misma tendencia de reducción de los niveles de α -HT en el esquema mixto fue reportada en la tesis doctoral de Prochetto (2021) para el modelo BALB/c - Sylvio X10/4 a los 188 dpi, utilizando los mismos grupos experimentales. Este desplazamiento sugiere que la combinación quimio-inmunoterapéutica permite una respuesta inmune más focalizada, disminuyendo la reactividad contra la suma de antígenos del parásito, lo cual se podría asociar a un estado inflamatorio menos exacerbado.

Al contrastar los resultados del Diseño I con el trabajo previo de Prochetto et al. (81), se observan coincidencias importantes pero también limitaciones que justifican la búsqueda de un esquema optimizado. En ambos estudios, utilizando el modelo BALB/c - Tulahuen cl2, se demostró que el tratamiento combinado tiene un efecto positivo en el curso de la enfermedad. Sin embargo, existen diferencias notables en la respuesta funcional.

En el estudio de Prochetto et al., el tratamiento mixto fue el único capaz de restaurar completamente parámetros como el intervalo QTc y el complejo QRS, logrando valores similares al grupo no infectado. En cambio, en el Diseño I de esta tesis, la mayoría de estos valores no mostraron diferencias significativas entre los grupos infectados y el control sano, con la excepción de la onda P, que se encontró aumentada únicamente en el grupo Tc^1 . El ensanchamiento de la onda P es un signo clásico de remodelamiento auricular o retraso en la conducción intraauricular (150,151). Es muy probable que esta alteración en el grupo Tc^1 esté estrechamente relacionada con la presencia de infiltrados inflamatorios y el aumento de la fibrosis en el tejido cardíaco, procesos que entorpecen la propagación del impulso eléctrico (239,240). Asimismo, si bien el tratamiento mixto redujo la incidencia de arritmias al 40% (frente al 75% del grupo Tc^1), este valor no representó una mejora sustancial frente a las monoterapias en este diseño particular. En el antecedente del grupo (81), por el contrario, solo el tratamiento combinado logró que los ratones no presentaran alteraciones electrocardiográficas, comportándose como el grupo sano.

Estas discrepancias sugieren que el esquema de administración consecutiva (vacuna y luego 30 días de Bz) no es un protocolo infalible para la recuperación funcional completa en todos los escenarios. Esta observación es crucial, ya que indica que la simple suma de los tratamientos tradicionales no alcanza para resolver de forma óptima la complejidad de la fase crónica. Esta limitación, compartida entre ambos estudios, justifica la necesidad de un protocolo optimizado.

3.V.b) Diseño II

El Diseño II funcionó como una prueba de concepto fundamental para determinar la capacidad de respuesta biológica ante una intervención mínima con benznidazol. Los resultados demostraron que un esquema acortado de solo 7 días de benznidazol posee un efecto terapéutico medible, logrando una reducción significativa de la carga parasitaria en el tejido cardíaco en comparación con el grupo control no tratado. Asimismo, esta intervención breve logró mitigar el estado inflamatorio y de injuria sistémica, evidenciado por la disminución de los niveles de GOT y ON. A nivel inmunológico, el tratamiento farmacológico corto actuó como un potente modulador, incrementando el número absoluto de linfocitos CD4⁺ y potenciando la capacidad citotóxica de las células CD8⁺.

La observación de una reducción significativa en la carga parasitaria cardíaca tras solo siete días de tratamiento con benznidazol (100 mg/kg/día) permite validar la hipótesis de este diseño exploratorio. Mientras que en la literatura clásica se sostiene que la ineficacia terapéutica en fase crónica responde, en parte, a una biodistribución tisular inadecuada del fármaco (212), los resultados de este ensayo sugieren que una ventana de exposición de siete días es suficiente para alcanzar concentraciones terapéuticas efectivas en el miocardio. Este hallazgo es consistente con la propuesta de Bustamante y Tarleton (230), quienes plantean que el control de la infección no depende de una exposición continua al parasitocida, sino de pulsos que logren interrumpir la replicación de las formas activas de *T. cruzi*.

La disminución de la actividad de la enzima GOT en el grupo Bz² funciona como una evidencia bioquímica de la eficacia de este esquema acortado. Debido a su localización citoplasmática y mitocondrial, la presencia sérica de esta transaminasa funciona como un biomarcador de lisis celular, particularmente útil para evaluar la injuria en tejidos con alta demanda energética como el corazón y el hígado (241). Por lo tanto, el descenso de este marcador refleja una preservación de la integridad tisular frente a la agresión parasitaria. Estos resultados concuerdan con los de Novaes et al. (242), quienes demostraron que la administración de benznidazol por 15 días reduce las transaminasas GOT y GPT al mitigar la injuria y el remodelado patológico inducido por el parásito en ratones C57BL/6.

Este efecto protector se complementa con la reducción de los niveles de óxido nítrico en el grupo Bz². La disminución de este mediador sugiere que esta intervención farmacológica breve fue suficiente para atenuar el componente inflamatorio y el estrés oxidativo sistémico, factores que (como se discutió previamente) contribuyen a la progresión del daño microvascular y tisular en

la fase crónica (174,175).

La presencia de anticuerpos específicos de los isotipos IgG1 e IgG2a contra el homogenato de *T. cruzi* (anti-HT) en todos los grupos desafiados confirmó el establecimiento exitoso de la infección. En este caso, no se observó una predominancia marcada hacia un isotipo en particular. Esta diferencia con los demás diseños puede deberse a que la toma de muestra de este diseño fue a los 100 dpi, mientras que en los demás fue más cerca de los 200 dpi. La ausencia de un perfil definido sugiere que el sesgo hacia IgG2a contra el parásito, observado en los otros diseños, termina de definirse en etapas más tardías de la etapa crónica (cerca de los 200 dpi).

Por otro lado, la cuantificación de anticuerpos contra la proteína TSNT permitió verificar la inmunogenicidad de la formulación empleada. En el grupo vacunado (TS²), si bien ambos isotipos estuvieron presentes, se registró una mayor concentración de IgG2a en comparación con IgG1, similar a lo visto en el diseño I. Esta inclinación hacia el isotipo IgG2a es un indicador temprano de que la vacuna TSNT-ISPA posee la capacidad de direccionar la respuesta hacia un perfil de tipo Th1. Esta validación asegura que el sistema inmune se active frente a la inmunoterapia y comience a establecer un perfil efector, aunque —como se analiza a continuación— los beneficios biológicos más marcados de este direccionamiento se observan con mayor claridad en el compartimento celular y en la reducción del daño tisular.

El análisis de las subpoblaciones linfocitarias en el bazo reveló una dinámica diferencial entre los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ tras el tratamiento farmacológico corto. En el grupo Bz², se observó un incremento significativo en el número absoluto de linfocitos CD4⁺ en comparación con el grupo control infectado (Tc²). Este hallazgo guarda coherencia con modelos experimentales previos donde se ha correlacionado la reducción de la carga parasitaria mediante el tratamiento farmacológico con una estabilización y mejora de las poblaciones de células T (220). Esto sugiere que el benznidazol, al reducir la persistencia de los antígenos del parásito, aminora el agotamiento del sistema inmune, permitiendo sostener niveles de linfocitos T cooperadores más elevados que en la infección crónica no tratada, donde la presencia constante de *T. cruzi* deteriora la homeostasis linfocitaria (243). De este modo, la intervención mitiga la contracción de la población CD4⁺ que se observa típicamente durante la persistencia del parásito.

En cuanto a los linfocitos CD8⁺, si bien no se registró una recuperación numérica significativa en el total de la población, el hallazgo más distintivo fue la recuperación de su aptitud funcional. En la fase crónica de la infección, la persistencia del parásito suele conducir a un estado de agotamiento clonal (218); sin embargo, en el grupo Bz² se observó una potenciación de la capacidad citotóxica evidenciada por el incremento del marcador de desgranulación CD107a. El

hecho de que una ronda mínima de benznidazol logre incrementar este potencial refuerza la idea de que el fármaco actúa como un facilitador, restaurando la competencia de las células T para reconocer y eliminar células infectadas. Este esquema acortado funciona, por lo tanto, como un estímulo de revitalización inmunológica que prioriza la calidad efectora sobre la magnitud cuantitativa en el compartimento citotóxico.

Finalmente, el análisis del perfil de citocinas sugiere el establecimiento de un equilibrio homeostático en el grupo tratado. Por un lado, el aumento de células CD4⁺ IFN- γ indica el direccionamiento hacia un perfil de tipo Th1, esencial para el control de la infección. No obstante, la aparición concomitante de una población significativa de células CD4⁺ IL-10⁺ sugiere que el sistema inmune no solo retoma su capacidad efectora, sino que también activa mecanismos reguladores necesarios para limitar el daño inmunopatológico una vez que la carga parasitaria ha descendido. Este balance entre respuesta efectora (IFN- γ y CD107a) y regulación (IL-10) se ha descrito como una característica distintiva de intervenciones terapéuticas exitosas (243), que prepararía un microambiente favorable para la posterior aplicación de la inmunoterapia.

Este escenario valida que el fármaco no solo actúa como un agente tripanocida, sino que genera un entorno inmunológico más reactivo. Es fundamental destacar que la inmunización por sí sola (TS²) demostró ser inmunogénica al incrementar los niveles de células CD4⁺ IFN- γ ⁺, y mostró una fuerte tendencia a la reducción de la carga parasitaria ($p=0.0776$). No obstante, la ausencia de una eficacia terapéutica sólida con la vacuna sola refuerza la idea de que la inmunoterapia requiere de un entorno con baja carga parasitaria para maximizar su efecto (80,217). Así, el esquema secuencial (benznidazol seguido de la inmunización) se presenta como la estrategia lógica para superar las limitaciones observadas.

Estos hallazgos fundamentan la transición hacia el Diseño III, donde se evaluó si la reducción inicial de la carga parasitaria potencia la eficacia final de la vacuna.

3.V.c) Diseño III

Mientras que el Diseño I confirmó que la combinación de antígeno TSNT + ISPA con benznidazol favorece la protección del tejido miocárdico, el Diseño II demostró que el fármaco, incluso en esquemas cortos, actúa como un modulador del entorno inmunológico, aumentando la disponibilidad de células T activas y citotóxicas. Dicha observación indicó que, al inicio del tratamiento, el benznidazol estimula una mejor respuesta inmune y reduce la carga parasitaria. Esto sugiere la ventaja de comenzar el esquema con el fármaco para potenciar la efectividad de

la vacuna y, posteriormente, continuar con el protocolo previamente ensayado. Tales evidencias sentaron las bases para la propuesta de integración final presentada en el Diseño III, la cual exploró el impacto de la administración fraccionada del benznidazol en combinación con la inmunoterapia.

La implementación del esquema terapéutico secuencial (Bz-TS-Bz³) representó la estrategia más avanzada evaluada en este capítulo, logrando una complementariedad efectiva entre la quimioterapia subóptima y la inmunoterapia. En conjunto, los resultados demuestran que este protocolo no solo es capaz de reducir significativamente la carga parasitaria en el miocardio (alcanzando incluso la negativización en algunos ejemplares), sino que también ofrece una protección superior frente al daño tisular y las alteraciones de la conducción eléctrica cardíaca. Este beneficio funcional y estructural se relacionó con una respuesta inmune distintiva, caracterizada por una robusta polarización hacia un perfil Th1 (IgG2a) y una respuesta celular marcada por el incremento de linfocitos CD4⁺ activados y productores de IL-10, junto con células CD8⁺ productoras de TNF- α . Estos hallazgos sugieren una dinámica particular entre los componentes del tratamiento que será analizada a continuación.

Al evaluar la persistencia parasitaria en el tejido miocárdico, se observó que tanto el esquema de monoterapia con benznidazol (Bz³) como el esquema secuencial (Bz-TS-Bz³) lograron una reducción significativa de la carga en comparación con el grupo control (Tc³). No obstante, resulta notable que en el grupo Bz-TS-Bz³, algunos ejemplares alcanzaron niveles de indetectabilidad por qPCR, un fenómeno que no se observó de manera tan marcada en las intervenciones de los diseños previos. Esto es particularmente evidente al compararlo con el Diseño I, donde a pesar de utilizar un esquema de benznidazol más prolongado (30 días), no se registraron diferencias significativas en la carga parasitaria entre los grupos, manteniéndose niveles bajos pero persistentes de ADN de *T. cruzi*.

Estas observaciones podrían explicarse por la existencia de amastigotes en estado de quiescencia o dormancia (213), formas no replicativas que presentan una actividad metabólica reducida que las vuelve intrínsecamente resistentes al benznidazol, dado que el fármaco depende de la activación por nitrorreductasas del propio parásito.

En este contexto, se postula que el distanciamiento entre la administración de dos rondas cortas de fármaco, separadas por un intervalo de tiempo, podría haber permitido que los parásitos dormantes retomaran su actividad replicativa, volviéndose vulnerables a la segunda ronda de fármaco o a la respuesta inmune potenciada por la vacuna. En el caso del esquema secuencial (Bz-TS-Bz³), este efecto se vería potenciado por la persistencia en el tiempo de una respuesta

inmune protectora, lo que podría explicar que algunos ejemplares alcanzaran la indetectabilidad, un logro no registrado en ensayos previos del grupo. Sin embargo, sería necesario ampliar el número de ejemplares evaluados para confirmar esta tendencia.

En estrecha relación con el control de la carga parasitaria, los esquemas combinados demostraron una capacidad superior para preservar la integridad del tejido miocárdico. Al evaluar los infiltrados inflamatorios, resulta sumamente alentador que en el grupo bajo el protocolo de vacunación seguido de una ronda de fármaco (TS-Bz³), la totalidad de los animales presentara un tejido de apariencia normal, carente de focos inflamatorios detectables. Esta observación sugiere que la inmunización, al preceder al tratamiento farmacológico, podría estar modulando la respuesta inflamatoria local de manera más efectiva, favoreciendo una resolución del proceso inflamatorio una vez que el fármaco reduce la presión antigénica.

Por otro lado, el análisis de la fibrosis —que representa el daño estructural irreversible en la fase crónica— reveló que solo los esquemas que combinaron ambos componentes (TS-Bz³ y Bz-TS-Bz³) lograron reducir significativamente los niveles de colágeno en comparación con el control infectado. Es importante destacar que este efecto protector no se alcanzó de manera estadísticamente significativa con las monoterapias en esta instancia. Estos resultados coinciden con lo reportado recientemente por Dzul-Huchim y Jones (223,224), quienes observaron que los esquemas combinados protegen la función cardíaca incluso utilizando dosis bajas de fármacos, superando la eficacia de las intervenciones individuales.

Esta reducción de la fibrosis es un hallazgo clave, ya que el tejido fibrótico actúa como un obstáculo para la propagación del impulso eléctrico (167). Por lo tanto, la capacidad de los esquemas combinados para prevenir el remodelado del miocardio sienta las bases biológicas para la estabilidad observada en los parámetros de conducción eléctrica que se analizarán a continuación.

Al contrastar estos resultados con las etapas experimentales previas, se observan matices de interés en el comportamiento de la monoterapia farmacológica. Mientras que en el Diseño I y en lo reportado por Prochetto et al. (81) el tratamiento con benznidazol no logró reducir significativamente el daño tisular, en el presente estudio el grupo Bz³ (bajo el esquema de dos rondas cortas) sí evidenció una disminución significativa de los infiltrados inflamatorios respecto al control infectado. Este hallazgo sugiere que el fraccionamiento de la dosis podría favorecer un mejor control del componente inflamatorio frente a los esquemas continuos prolongados evaluados anteriormente. Sin embargo, en cuanto al remodelado fibrótico, los resultados fueron consistentes con los antecedentes: el benznidazol por sí solo no logró reducir significativamente

el depósito de colágeno.

Por su parte, el grupo tratado solo con la vacuna (TS³) mostró en este diseño una tendencia más alineada con los antecedentes de Prochetto et al. (81), donde la inmunización por sí sola fue capaz de reducir significativamente tanto los infiltrados como la fibrosis. Esto marca una diferencia respecto al Diseño I, en el cual la vacuna no solo no alcanzó la significancia estadística, sino que registró valores de lesión numéricamente superiores al grupo control (Tc¹). De este modo, el Diseño III recupera la observación de que la inmunoterapia posee una capacidad protectora intrínseca sobre el tejido, aunque en ambas instancias experimentales de esta tesis, los mejores resultados se obtuvieron al integrar la vacuna con el soporte farmacológico.

En este sentido, los esquemas combinados presentan resultados destacables. Mientras que en el Diseño I el tratamiento mixto (TS+Bz¹) logró una preservación de la arquitectura miocárdica global, en el Diseño III se observó que tanto el esquema con vacuna previa (TS-Bz³) como el esquema secuencial (Bz-TS-Bz³) mostraron niveles de fibrosis significativamente menores al control infectado, alcanzando ambos grupos el mismo score de protección para este parámetro. Además, se destaca que el grupo TS-Bz³ logró una resolución total de los infiltrados inflamatorios en la totalidad de los animales analizados. En conjunto, estos datos refuerzan la idea de que la convergencia de ambas estrategias favorece una respuesta más eficaz en la protección del órgano que la aplicación de las intervenciones por separado.

La preservación de la arquitectura tisular se tradujo en una mayor estabilidad de la conducción eléctrica, especialmente en el grupo Bz-TS-Bz³. En cuanto a la despolarización auricular, se observó que el grupo control (Tc³) presentó un incremento significativo en la duración de la onda P, una alteración que resultó consistente con lo observado previamente en el Diseño I. En ambas etapas experimentales, la totalidad de los tratamientos evaluados logró revertir este incremento. Resulta destacable que, en este estudio, el grupo Bz-TS-Bz³ evidenció la menor variabilidad en este parámetro, sugiriendo una estabilización más homogénea de la conducción auricular bajo el esquema secuencial.

Por otro lado, el análisis del intervalo QTc reveló que tanto el grupo infectado (Tc³) como el tratado únicamente con la vacuna (TS³) presentaron un aumento significativo en la duración de la repolarización ventricular respecto al control sano. En contraste, los esquemas que incluyeron benznidazol mantuvieron valores normales de QTc.

Desde una perspectiva fisiopatológica, estas alteraciones en el trazado eléctrico reflejan el daño estructural y electrofisiológico característico de la miocardiopatía chagásica crónica (168). El incremento en la duración de la onda P se asocia con un retraso en la conducción intra e

interauricular, consecuencia del remodelado fibrótico y el proceso inflamatorio que altera la propagación del impulso en las aurículas (244). Por su parte, la prolongación del intervalo QTc resulta un indicador crítico, ya que señala una alteración en la repolarización ventricular (157). En la infección por *T. cruzi*, este retraso suele vincularse a la remodelación de los canales iónicos y al daño en las uniones de hendidura (gap junctions), lo que genera un sustrato propicio para fenómenos de reentrada (167).

La normalización de estos parámetros en los grupos tratados con el esquema secuencial sugiere que la reducción de la carga parasitaria y la modulación del ambiente inflamatorio logran preservar la homogeneidad eléctrica del miocardio. Es fundamental señalar que, al tratarse del QTc (corregido por frecuencia), este hallazgo proporciona una medida robusta de la estabilidad eléctrica ventricular, minimizando las distorsiones que pudieran derivarse de variaciones en el ritmo cardíaco inducidas por la anestesia.

Sin embargo, el análisis de la incidencia de arritmias debe interpretarse con mayor cautela. El hallazgo de alteraciones del ritmo en el 50% de los animales del grupo control no infectado (NI³) sugiere que la anestesia empleada pudo haber interferido con la estabilidad del ritmo cardíaco, actuando como una variable de confusión. Si bien el esquema secuencial presentó la menor incidencia de eventos entre los grupos infectados, esta observación debe ser validada en estudios futuros utilizando protocolos de anestesia con menor impacto cardiovascular (169,170). No obstante, la consistencia entre la mejora en la conducción eléctrica (onda P y QTc) y la reducción del daño histopatológico refuerza la idea de que el tratamiento secuencial protege efectivamente la funcionalidad cardíaca en la fase crónica.

Al evaluar la respuesta de anticuerpos específicos contra la vacuna, se observó que el esquema Bz-TS-Bz³ mantuvo una marcada polarización hacia el isotipo IgG2a, acompañada de niveles mínimos de IgG1. Resulta notable que este grupo presentó niveles de IgG2a que igualaron e incluso superaron a los registrados en el grupo tratado únicamente con la vacuna (TS³), sin observarse diferencias estadísticas entre ambos. Dichos hallazgos subrayan que la eficacia de la inmunización no se ve comprometida por la administración del benznidazol, ya sea que este se aplique de forma previa o intercalada.

Este predominio de IgG2a es un indicador claro de la inducción de un perfil de tipo Th1, el cual se asocia con mecanismos efectores eficientes para el control de la infección. En cuanto a la respuesta específica contra el parásito (anti-HT), se observó una predominancia del isotipo IgG2a sobre IgG1 en todos los grupos infectados, lo cual es indicativo de la instauración de un perfil de respuesta de tipo Th1, característico de la infección por *T. cruzi*, comportamiento

también observado en el diseño I.

Los grupos con más de una intervención (Bz³, TS-Bz³ y Bz-TS-Bz³) lograron reducir los niveles de anticuerpos IgG total e IgG2a específicos contra el parásito, aunque esta disminución fue significativa solo en los grupos Bz³ y Bz-TS-Bz³, correlacionándose con la disminución de carga parasitaria en estos grupos. En el diseño I se comportó similar para IgG2a el grupo TS+Bz¹. Esto nos puede hacer pensar que es más efectivo administrar más de una intervención en el tiempo.

La persistencia de los niveles de anticuerpos anti-HT en el grupo tratado únicamente con la vacuna (TS³) resulta consistente con las observaciones del Capítulo 2, donde la inmunización por vía sistémica tampoco logró disminuir la respuesta humoral contra el parásito en relación al grupo control a los 135 dpi. Este comportamiento refuerza la idea de que, en el modelo de infección sistémica crónica, la vacuna por sí sola no es suficiente para reducir la presión antigénica del parásito a niveles que impacten en la producción de IgG específica.

Por otro lado, este hallazgo contrasta con lo observado en los experimentos de infección por vía oral (también detallados en el Capítulo 2), donde el uso de la vacuna por vía nasal con el adyuvante c-di-AMP sí logró reducir significativamente los niveles de anticuerpos anti-HT. Esta diferencia sugiere que tanto la vía de entrada del parásito como la formulación de la vacuna (específicamente el cambio de adyuvante y vía de administración) son determinantes en la capacidad de la inmunoterapia para controlar la carga parasitaria y la respuesta humoral asociada.

No obstante, más allá de atribuir la disminución de los niveles de anticuerpos anti-HT exclusivamente a una reducción de la carga parasitaria, es relevante considerar que, tal como sugerimos previamente (180), la disminución de estos anticuerpos se correlaciona con mejoras en parámetros de daño cardíaco. Esto plantea un interés genuino en profundizar el estudio de las especificidades de los anticuerpos que disminuyen tras el tratamiento, dado que podrían estar directamente involucradas en los mecanismos de daño tisular. De este modo, el efecto beneficioso de las intervenciones terapéuticas podría deberse no solo a la reducción de la presión antigénica, sino también a un redireccionamiento cualitativo de la respuesta humoral hacia un perfil más favorable para el control de la patología.

En este contexto, los resultados del Diseño III cobran mayor relevancia, ya que demuestran que, ante un escenario de infección sistémica donde la vacuna sola no logra reducir los niveles de anti-HT, la integración con el benznidazol (Bz-TS-Bz³) sí consigue una caída significativa de estos anticuerpos. Esto confirma que el soporte farmacológico actúa sinérgicamente con la vacuna para alcanzar un control de la carga parasitaria que la inmunoterapia, bajo estas condiciones

específicas, no logra por sí misma.

Considerando que la eficacia de la inmunoterapia depende críticamente de la formulación y la vía de administración, resultaría de gran interés evaluar en este modelo de infección intradérmica el desempeño de la vacuna nasal adyuvada con c-di-AMP. Dado que dicha plataforma demostró una capacidad superior para reducir la respuesta humoral, la carga parasitaria y, fundamentalmente, el daño histopatológico en el modelo de infección oral (Capítulo 2), es posible que su implementación potencie los efectos observados en el presente estudio, ya sea como monoterapia o integrándose en un esquema secuencial con benznidazol. De este modo, la incorporación de la vacunación mucosal podría representar una alternativa prometedora para reforzar el impacto terapéutico de los protocolos mixtos en la fase crónica de la infección.

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo en este tercer diseño experimental revelan una modulación compleja y diferencial del sistema inmune durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi* por parte de las terapias aplicadas.

El incremento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ observado en los grupos que recibieron la formulación vacunal (TS³ y TS-Bz³) confirma la elevada capacidad inmunogénica de la Transialidasa-ISPA, incluso bajo las condiciones de una infección crónica establecida. Particularmente, el hecho de que el grupo TS³ presente los niveles más altos de IFN- γ , sumado al aumento de CD4⁺ productores de esta citocina en el grupo TS² (Diseño II), sugiere que la vacuna actúa por sí sola como un potente inductor de una respuesta de tipo Th1. Este perfil es esencial para el control de la replicación remanente del parásito a través de la activación de mecanismos microbicidas en macrófagos (49,67,243). Esta respuesta de tipo Th1, con producción de IFN- γ tras la estimulación ex vivo observada coincide con lo reportado para la formulación profiláctica con TS y ISCOMATRIX (104). Asimismo, es consistente con los resultados obtenidos en la etapa crónica mediante la vacuna terapéutica de ARNm (Cruzaina, Tc24 y TS) combinada con Bz (226). En este mismo contexto de cronicidad tardía, la formulación con TS-ISPA parece ser más eficiente en mantener un perfil Th1 activo que la combinación de TSA-1/Tc24 con el adyuvante E6020-SE y Bz (223).

Estos hallazgos podrían estar vinculados a las propiedades inmunofisiológicas descritas para el ISPA. Se ha postulado que su estructura como partícula tipo ISCOM favorece la formación de complejos inmunoestimuladores que, optimizarían la presentación antigénica por parte de las células presentadoras de antígenos (108). Bajo esta premisa, la utilización de DC en el protocolo de reestimulación in vitro se planteó como una estrategia metodológica para potenciar de dicha

respuesta, aunque los mecanismos precisos de esta interacción en nuestro modelo requieran de estudios específicos adicionales.

El grupo de tratamiento secuencial (Bz-TS-Bz³) fue el único que presentó un marcado incremento de células CD4⁺ productoras de IL-10, lo cual constituye uno de los hallazgos más relevantes de este estudio. Mientras que la infección crónica por *T. cruzi* suele conducir a un estado de inflamación persistente y dañina para el tejido (40,41), la inducción de esta citocina reguladora sugiere un mecanismo de inmunomodulación clave. Esta respuesta, sumada a la tendencia de mayor activación celular (expresada por el marcador CD44), indica que el tratamiento secuencial promueve un equilibrio que favorece la recuperación del sistema inmune. En este contexto, la IL-10 actuaría como un factor crítico para limitar el daño colateral en el tejido cardíaco y mejorar el pronóstico clínico, ya que este balance es el que diferencia a los pacientes indeterminados (con niveles altos de IL-10) de los pacientes cardíacos, en quienes predomina un perfil proinflamatorio vinculado a la fibrosis (198,199).

En cuanto a la subpoblación de linfocitos T CD8⁺, la estabilidad en su porcentaje total sugiere que las terapias aplicadas no expanden cuantitativamente esta población, sino que alteran cualitativamente su estado funcional. El aumento del marcador de degranulación CD107a en los grupos que recibieron benznidazol (tanto Bz² en el diseño II como en el grupo Bz³) indica una alta actividad citotóxica que no se observó en el resto de los grupos, los cuales mantuvieron niveles similares a los controles no infectados. Por un lado, podría asociarse con la reversión del agotamiento celular. Por otro lado, un incremento de la citotoxicidad en etapas crónicas podría ser perjudicial al promover el daño colateral en el miocardio. De acuerdo con Mateus et al. (245), la persistencia de una respuesta citotóxica (basada en la expresión de granzima B y perforina) en la fase crónica tardía se vincula con la progresión de las lesiones tisulares y la disfunción orgánica. Bajo esta segunda perspectiva, el tratamiento secuencial presentaría una ventaja frente a la monoterapia, ya que evita inducir una respuesta citotóxica exacerbada mientras promueve recuperación en la producción de citocinas (expresada por el aumento de TNF- α intracelular).

En este sentido, el grupo secuencial fue el único que logró una mayor proporción de células CD8⁺ productoras de TNF- α . Si bien niveles sistémicos elevados de esta citocina se han asociado tradicionalmente con la progresión de la miocardiopatía (243), su detección intracelular en linfocitos T CD8⁺ sugiere una restauración de la funcionalidad. Según el modelo de agotamiento jerárquico (246,247), la pérdida de TNF- α ocurre de manera temprana durante la disfunción celular, por lo que su presencia indica una recuperación de la capacidad efectora. Este hallazgo sugiere que el tratamiento secuencial logra evitar el fenotipo de agotamiento (*exhaustion*)

característico de las infecciones crónicas (243), manteniendo a las células en un estado funcional no exhausto. Lo observado es consistente con lo reportado por Dzul-Huchim et al. (223), quienes demostraron que la inmunoterapia combinada restaura la capacidad citotóxica de las células CD8⁺, revirtiendo su disfunción en infecciones persistentes y logrando, en última instancia, restaurar la funcionalidad de este compartimento celular.

En síntesis, los datos sugieren una especialización de las respuestas según el tratamiento: la monoterapia con benznidazol prioriza una respuesta citotóxica (CD107a), mientras que la vacuna TS³ potencia el brazo colaborador Th1 (IFN- γ). No obstante, solo el esquema secuencial logra integrar ambos perfiles, manteniendo la capacidad efectora (TNF- α en CD8⁺) bajo un estricto control regulador (IL-10 en CD4⁺). Este perfil de activación controlado representa el objetivo ideal de una intervención terapéutica para la enfermedad de Chagas, ya que permitiría contener los focos parasitarios persistentes mientras se minimiza la progresión hacia la miocardiopatía chagásica crónica. Estudios futuros enfocados en el perfil de citoquinas local, siguiendo la metodología del Capítulo 2, permitirán terminar de corroborar esta estrecha relación entre la robustez inmunológica sistémica y la resolución de la patología en el miocardio.

Conclusiones

En la evaluación de diferentes modelos de infección crónica en ratones BALB/c y C57BL/6 se determinó que el binomio BALB/c - Tulahuen cl2 fue el que presentó el mejor desempeño, ya que, a diferencia de otros modelos probados, permite una supervivencia de la mayoría de los individuos con un desarrollo progresivo de la patología. Este binomio constituye un modelo experimental adecuado para el estudio de la fase crónica al replicar diversas alteraciones observadas en la infección humana, incluyendo disturbios histológicos, electrocardiográficos y modificaciones en biomarcadores séricos. Aun considerando la heterogeneidad biológica inherente a esta etapa de la infección, el modelo resulta reproducible y permite un análisis integral para la validación de estrategias terapéuticas. La vía de inoculación actúa como un factor determinante en la evolución clínica y el compromiso orgánico, donde la vía intradérmica asegura una infectividad total con virulencia moderada, mientras que la vía oral, a pesar de su menor infectividad inicial, induce lesiones histopatológicas miocárdicas y alteraciones funcionales más severas y persistentes en el tiempo.

La inmunoterapia basada en la proteína Trans-sialidasa administrada por vía nasal (TSNt+c-di-AMP) o subcutánea (TSNt+ISPA) demuestra una capacidad cardioprotectora significativa, logrando reducir la persistencia del parásito en el tejido cardíaco y atenuar los procesos de inflamación y fibrosis miocárdica. Si bien esta intervención no revirtió completamente el ensanchamiento de los intervalos QRS y QTc una vez consolidados, genera una mejora funcional medible al normalizar la conducción auricular y reducir la incidencia de eventos arritmogénicos. Estos efectos se asocian a una reorientación de la respuesta humoral que favorece la producción de anticuerpos específicos (anti-TS). Se identificaron beneficios diferenciales según la vía de aplicación: la vacuna nasal se destacó por la reducción del estrés oxidativo (Óxido Nítrico), mientras que la vacuna subcutánea resultó más efectiva en la disminución de marcadores de daño miocárdico séricos (CK-MB y GOT). En el modelo oral, se observó además una disminución de anticuerpos autorreactivos cardíacos junto con el incremento de IL-17 en el miocardio y una tendencia al aumento de Foxp3.

La combinación de la vacuna con benznidazol superó la eficacia de ambas monoterapias. El esquema combinado de 30 días (Diseño I) resultó ser el único capaz de preservar la arquitectura del miocardio y normalizar mediadores críticos del daño tisular como el TGF- β . Si bien los tratamientos evaluados en el Diseño I redujeron los niveles de biomarcadores séricos de daño tisular, únicamente el esquema combinado de 30 días de benznidazol permitió alcanzar valores

sin diferencias significativas respecto de los animales no infectados. Sin embargo, este esquema no logró una reducción significativa de la carga parasitaria y mostró una respuesta variable entre los distintos ensayos (Prochetto 2022, capítulos 2 y 3), lo que planteó la necesidad de buscar alternativas que potenciaran la complementariedad entre el fármaco y la vacuna. Un ensayo preliminar (Diseño II) permitió comprobar la factibilidad de una nueva estrategia, lo que condujo a un protocolo secuencial optimizado (Diseño III). Este esquema, basado en ciclos cortos de benznidazol intercalados con la inmunización, se posicionó como la estrategia más efectiva para el control de la carga parasitaria y la estabilidad eléctrica cardíaca, logrando niveles de carga parasitaria indetectables en algunos individuos. Asimismo, se observó una mejora en la respuesta humoral específica, evidenciada por un incremento de anticuerpos IgG totales e IgG2a, compatibles con una respuesta de tipo Th1 y una disminución de los anticuerpos contra el homogenato.

El éxito de los protocolos terapéuticos, especialmente el secuencial, se fundamenta en una potente sinergia inmunológica donde el benznidazol actúa como un facilitador que incrementa la población de linfocitos CD4⁺ y potencia la capacidad citotóxica basal de los CD8⁺, mientras que la incorporación de la vacuna es la que termina de definir un perfil inmunológico protector. Esta combinación logra un incremento distintivo de células productoras de TNF- α e IFN- γ junto con un aumento de los mecanismos reguladores mediados por IL-10, estableciendo un equilibrio efector-regulador que resulta determinante para contener la infección remanente mientras se minimiza el daño inmunopatológico sobre el tejido cardíaco.

En conjunto, estos hallazgos constituyen un aporte original al tratamiento de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. Si bien existen estudios recientes sobre enfoques combinados, estos emplean formulaciones y esquemas diferentes; en particular, el protocolo secuencial propuesto y evaluado en esta tesis no ha sido descrito previamente, posicionándose como una estrategia novedosa y prometedora para el control de la patología.

Bibliografía

1. Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors*. 2014;7: 317. doi:10.1186/1756-3305-7-317.
2. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1909;1: 159–218. doi:https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008.
3. *Enfermedad de Chagas (trypanosomiasis 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 28th February 2026].
4. Ferreira M da S, Maldonado RA, Farani PSG. Chagas Disease in the 21st Century: Global Spread, Ecological Shifts, and Research Frontiers. *Biology*. 2025;14(11): 1631. doi:10.3390/biology14111631.
5. Martín-Escolano J, Medina-Carmona E, Martín-Escolano R. Chagas Disease: Current View of an Ancient and Global Chemotherapy Challenge. *ACS infectious diseases*. 2020;6(11): 2830–2843. doi:10.1021/acsinfecdis.0c00353.
6. Vianna Martins A, Patrícia Gomes A, de Mendonça EG, Rangel Fietto JL, Alberto Santana L, de Almeida Oliveira MG, et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*. 2012;16(1): 45–58. doi:10.1016/S0123-9392(12)70057-7.
7. De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 2002;8(4): 269–285. doi:10.2174/1381612023396276.
8. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*. 2001;31(5–6): 472–481. doi:10.1016/s0020-7519(01)00153-9.
9. Toso M A, Vial U F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile*. 2011;139(2): 258–266. doi:10.4067/S0034-98872011000200017.
10. Martín-Escolano J, Marín C, Rosales MJ, Tsaousis AD, Medina-Carmona E, Martín-Escolano R. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS infectious diseases*. 2022;8(6): 1107–1115. doi:10.1021/acsinfecdis.2c00123.
11. 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.
12. Dinatale B, Bulfoni Balbi C, González FB, Perez AR, Pacini MF. Desarrollos preclínicos de vacunas profilácticas contra la Enfermedad de Chagas basadas en Transialidasa. 2021; doi:10.35305/fcm.v1i.17.
13. Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 2010;115(1–2): 35–43. doi:10.1016/j.actatropica.2009.08.018.

14. 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. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104(7): 1051–1054. doi:10.1590/s0074-02762009000700021.
15. Freitas JM, Andrade LO, Pires SF, Lima R, Chiari E, Santos RR, et al. The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. *PloS One*. 2009;4(4): e5113. doi:10.1371/journal.pone.0005113.
16. Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. Recent, Independent and Anthropogenic Origins of *Trypanosoma cruzi* Hybrids. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(10): e1363. doi:10.1371/journal.pntd.0001363.
17. Velásquez-Ortiz N, Herrera G, Hernández C, Muñoz M, Ramírez JD. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Scientific Data*. 2022;9(1): 360. doi:10.1038/s41597-022-01452-w.
18. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2012;12(2): 240–253. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009.
19. Zingales B, Bartholomeu DC. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2022;117: e210193. doi:10.1590/0074-02760210193.
20. Zingales B, Macedo AM. Fifteen Years after the Definition of *Trypanosoma cruzi* DTUs: What Have We Learned? *Life*. 2023;13(12): 2339. doi:10.3390/life13122339.
21. Cucunubá ZM, Gutiérrez-Romero SA, Ramírez JD, Velásquez-Ortiz N, Ceccarelli S, Parra-Henao G, et al. The epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Lancet Regional Health. Americas*. 2024;37: 100881. doi:10.1016/j.lana.2024.100881.
22. Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology Today*. 2000;16(9): 381–387. doi:10.1016/s0169-4758(00)01724-5.
23. Muñoz-Saravia SG, Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Failure Reviews*. 2012;17(1): 45–64. doi:10.1007/s10741-010-9211-5.
24. de Fuentes-Vicente JA, Gutiérrez-Cabrera AE, Flores-Villegas AL, Lowenberger C, Benelli G, Salazar-Schettino PM, et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Acta Tropica*. 2018;183: 23–31. doi:10.1016/j.actatropica.2018.04.008.
25. Rengifo-Correa L, Rodríguez-Moreno Á, Becker I, Falcón-Lezama JA, Tapia-Conyer R, Sánchez-Montes S, et al. Risk of a vector-borne endemic zoonosis for wildlife: Hosts, large-scale geography, and diversity of vector-host interactions for *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 2024;251: 107117. doi:10.1016/j.actatropica.2024.107117.
26. Abras A, Ballart C, Fernández-Arévalo A, Pinazo MJ, Gascón J, Muñoz C, et al. Worldwide

- Control and Management of Chagas Disease in a New Era of Globalization: a Close Look at Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2022;35(2): e0015221. doi:10.1128/cmr.00152-21.
27. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record (Wkly Epidemiol Rec)*. 2015;90(6): 33–43.
 28. WHO Expert Committee. Control of Chagas disease. *World Health Organization Technical Report Series*. 2002;905: i–vi, 1–109, back cover.
 29. Santana KH, Oliveira LGR, Barros de Castro D, Pereira M. Epidemiology of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Americas: systematic review and meta-analysis. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. 2020;25(7): 752–763. doi:10.1111/tmi.13398.
 30. Buekens P, Cafferata ML, Alger J, Althabe F, Belizán JM, Bustamante N, et al. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: An Observational Prospective Study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018;98(2): 478–485. doi:10.4269/ajtmh.17-0516.
 31. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723): 1388–1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
 32. López-García A, Gilabert JA. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: A systematic review. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. 2023;28(9): 689–698. doi:10.1111/tmi.13915.
 33. Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. *The Journal of Parasitology*. 2009;95(2): 360–364. doi:10.1645/GE-1740.1.
 34. Robertson LJ, Havelaar AH, Keddy KH, Devleeschauwer B, Sripa B, Torgerson PR. The importance of estimating the burden of disease from foodborne transmission of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2024;18(2): e0011898. doi:10.1371/journal.pntd.0011898.
 35. Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Medicina Clínica*. 2017;148(3): 125–131. doi:10.1016/j.medcli.2016.10.038.
 36. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas' disease as a foodborne illness. *Journal of Food Protection*. 2009;72(2): 441–446. doi:10.4315/0362-028x-72.2.441.
 37. Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the blood supply in Latin America. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(1): 12–29. doi:10.1128/CMR.18.1.12-29.2005.
 38. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1: 75–85. doi:10.1590/s0074-02762007005000093.
 39. Shikanai Yasuda MA. Emerging and reemerging forms of *Trypanosoma cruzi* transmission. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2022;117: e210033. doi:10.1590/0074-

02760210033.

40. Montalvo-Ocototxtle IG, Rojas-Velasco G, Rodríguez-Morales O, Arce-Fonseca M, Baeza-Herrera LA, Arzate-Ramírez A, et al. Chagas Heart Disease: Beyond a Single Complication, from Asymptomatic Disease to Heart Failure. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(24): 7262. doi:10.3390/jcm11247262.
41. Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, Garg NJ, Engman DM. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual Review of Pathology*. 2019;14: 421–447. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043711.
42. De Bona E, Lidani KCF, Bavia L, Omidian Z, Gremski LH, Sandri TL, et al. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Frontiers in Immunology*. 2018;9: 1842. doi:10.3389/fimmu.2018.01842.
43. Bern C. Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2015;373(5): 456–466. doi:10.1056/NEJMra1410150.
44. Jabari S, de Oliveira EC, Brehmer A, da Silveira ABM. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. *Histochemistry and Cell Biology*. 2014;142(3): 235–244. doi:10.1007/s00418-014-1250-x.
45. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006;39(1): 41–54. doi:10.1080/08916930500485002.
46. Jiménez MAV, Nascimento JHM, Monnerat G, Maciel L, Paiva CN, Pedrosa RC, et al. Autoantibodies with beta-adrenergic activity from chronic chagasic patients induce cardiac arrhythmias and early afterdepolarization in a drug-induced LQT2 rabbit hearts. *International Journal of Cardiology*. 2017;240: 354–359. doi:10.1016/j.ijcard.2017.02.066.
47. Nussinovitch U, Shoenfeld Y. Anti-troponin autoantibodies and the cardiovascular system. *Heart*. 2010;96(19): 1518–1524. doi:10.1136/hrt.2010.195255.
48. Chaves AT, Menezes CAS, Costa HS, Nunes MCP, Rocha MOC. Myocardial fibrosis in chagas disease and molecules related to fibrosis. *Parasite Immunology*. 2019;41(10): e12663. doi:10.1111/pim.12663.
49. Jones KM, Poveda C, Versteeg L, Bottazzi ME, Hotez PJ. Preclinical advances and the immunophysiology of a new therapeutic Chagas disease vaccine. *Expert Review of Vaccines*. 2022;21(9): 1185–1203. doi:10.1080/14760584.2022.2093721.
50. Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends in Parasitology*. 2003;19(10): 447–451. doi:10.1016/j.pt.2003.08.008.
51. Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(1): 115–123. doi:10.1128/AAC.05135-11.
52. Albareda MC, Laucella SA. Modulation of Trypanosoma cruzi-specific T-cell responses after chemotherapy for chronic Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(3): 414–421. doi:10.1590/0074-02760140386.

53. Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G, Alvarez MG, Cooley G, Viotti R, et al. Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(11): 1675–1684. doi:10.1086/648072.
54. Campos MCO, Leon LL, Taylor MC, Kelly JM. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2014;193(1): 17–19. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.01.002.
55. Pramanik PK, Alam MN, Roy Chowdhury D, Chakraborti T. Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019;18: 1–11. doi:10.1016/j.jgar.2019.01.023.
56. Echeverria LE, Morillo CA. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 2019;33(1): 119–134. doi:10.1016/j.idc.2018.10.015.
57. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(14): 1295–1306. doi:10.1056/NEJMoa1507574.
58. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2009;7(2): 157–163. doi:10.1586/14787210.7.2.157.
59. Woo S, Park PG, An T, Fatima M, Moon YE, Lee SY, et al. Mini-review on the therapeutic vaccines targeting chronic infectious diseases: Evaluation system of therapeutic vaccines targeting HPV and EBV-related cancers. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2025;21(1): 2457187. doi:10.1080/21645515.2025.2457187.
60. Kosinska AD, Bauer T, Protzer U. Therapeutic vaccination for chronic hepatitis B. *Current Opinion in Virology*. 2017;23: 75–81. doi:10.1016/j.coviro.2017.03.011.
61. Kosinska AD, Zhang E, Johrden L, Liu J, Seiz PL, Zhang X, et al. Combination of DNA prime-adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model. *PLoS pathogens*. 2013;9(6): e1003391. doi:10.1371/journal.ppat.1003391.
62. Tian Y, Hu D, Li Y, Yang L. Development of therapeutic vaccines for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine*. 2022;3(1): 40. doi:10.1186/s43556-022-00098-9.
63. Boukhebza H, Bellon N, Limacher JM, Inchauspé G. Therapeutic vaccination to treat chronic infectious diseases: current clinical developments using MVA-based vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2012;8(12): 1746–1757. doi:10.4161/hv.21689.
64. Panagioti E, Klenerman P, Lee LN, van der Burg SH, Arens R. Features of Effective T Cell-Inducing Vaccines against Chronic Viral Infections. *Frontiers in Immunology*. 2018;9: 276. doi:10.3389/fimmu.2018.00276.
65. Cargill T, Barnes E. Therapeutic vaccination for treatment of chronic hepatitis B. *Clinical and Experimental Immunology*. 2021;205(2): 106–118. doi:10.1111/cei.13614.
66. Gong X, Chi H, Xia Z, Yang G, Tian G. Advances in HPV-associated tumor management: Therapeutic strategies and emerging insights. *Journal of Medical Virology*. 2023;95(7):

e28950. doi:10.1002/jmv.28950.

67. Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B, Heffernan MJ, Jones K, Valenzuela JG, et al. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Review of Vaccines*. 2012;11(9): 1043–1055. doi:10.1586/erv.12.85.
68. Dumonteil E, Herrera C, Buekens P. A therapeutic preconceptional vaccine against Chagas disease: A novel indication that could reduce congenital transmission and accelerate vaccine development. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019;13(1): e0006985. doi:10.1371/journal.pntd.0006985.
69. Frade AF, Guérin H, Nunes JPS, Silva LFSE, Roda VM de P, Madeira RP, et al. Cardiac and Digestive Forms of Chagas Disease: An Update on Pathogenesis, Genetics, and Therapeutic Targets. *Mediators of Inflammation*. 2025;2025: 8862004. doi:10.1155/mi/8862004.
70. Bivona AE, Alberti AS, Cerny N, Trinitario SN, Malchiodi EL. Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-mediated control. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(5): 165658. doi:10.1016/j.bbdis.2019.165658.
71. Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*. 2011;7(11): 1184–1191. doi:10.4161/hv.7.11.17016.
72. Teixeira SM, Burle-Caldas G de A, Castro JT, Gazzinelli RT. The time has come for a vaccine against Chagas disease. *The Lancet Regional Health – Americas*. 2025;45. doi:10.1016/j.lana.2025.101059.
73. 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. *The Lancet Microbe*. 2024;5(10): 100972. doi:10.1016/j.lanmic.2024.100972.
74. Pereira IR, Vilar-Pereira G, Marques V, Silva AA da, Caetano B, Moreira OC, et al. A Human Type 5 Adenovirus-Based *Trypanosoma cruzi* Therapeutic Vaccine Re-programs Immune Response and Reverses Chronic Cardiomyopathy. *PLOS Pathogens*. 2015;11(1): e1004594. doi:10.1371/journal.ppat.1004594.
75. Barry MA, Versteeg L, Wang Q, Pollet J, Zhan B, Gusovsky F, et al. A therapeutic vaccine prototype induces protective immunity and reduces cardiac fibrosis in a mouse model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(5): e0007413. doi:10.1371/journal.pntd.0007413.
76. Mancino C, Pollet J, Zinger A, Jones KM, Villar MJ, Leao AC, et al. Harnessing RNA Technology to Advance Therapeutic Vaccine Antigens against Chagas Disease. *ACS applied materials & interfaces*. 2024;16(13): 15832–15846. doi:10.1021/acsami.3c18830.
77. *Randomized field trial of a therapeutic vaccine against Trypanosoma cruzi natural infection in dogs and correlates for efficacy | npj Vaccines*. <https://www.nature.com/articles/s41541-025-01338-z> [Accessed 21st January 2026].
78. Dumonteil E, Escobedo-Ortegon J, Reyes-Rodriguez N, Arjona-Torres A, Ramirez-Sierra MJ. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infection with DNA Vaccines in Mice. *Infection*

and Immunity. 2004;72(1): 46–53. doi:10.1128/IAI.72.1.46-53.2004.

79. Limon-Flores AY, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona JL, Ek-Macias L, Sánchez-Burgos G, Ramirez-Sierra MJ, et al. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: Role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine*. 2010;28(46): 7414–7419. doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.104.
80. Zapata-Estrella H, Hummel-Newell C, Sanchez-Burgos G, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra MJ, Arjona-Torres A, et al. Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunology Letters*. 2006;103(2): 186–191. doi:10.1016/j.imlet.2005.11.015.
81. 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 Tropica*. 2022;229: 106334. doi:10.1016/j.actatropica.2022.106334.
82. Cerny N, Bivona AE, Sanchez Alberti A, Trinitario SN, Morales C, Cardoso Landaburu A, et al. Cruzipain and Its Physiological Inhibitor, Chagasin, as a DNA-Based Therapeutic Vaccine Against *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.565142.
83. Gupta S, Smith C, Auclair S, Delgadillo ADJ, Garg NJ. Therapeutic Efficacy of a Subunit Vaccine in Controlling Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease Is Enhanced by Glutathione Peroxidase Over-Expression. *PLOS ONE*. 2015;10(6): e0130562. doi:10.1371/journal.pone.0130562.
84. Pereira IR, Vilar-Pereira G, Marques V, da Silva AA, Caetano B, Moreira OC, et al. A Human Type 5 Adenovirus-Based *Trypanosoma cruzi* Therapeutic Vaccine Re-programs Immune Response and Reverses Chronic Cardiomyopathy. *PLoS Pathogens*. 2015;11(1): e1004594. doi:10.1371/journal.ppat.1004594.
85. Cerny N, Sánchez Alberti A, Bivona AE, De Marzi MC, Frank FM, Cazorla SI, et al. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new immunotherapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015;12(2): 438–450. doi:10.1080/21645515.2015.1078044.
86. Cerny N, Bivona AE, Sanchez Alberti A, Trinitario SN, Morales C, Cardoso Landaburu A, et al. Cruzipain and Its Physiological Inhibitor, Chagasin, as a DNA-Based Therapeutic Vaccine Against *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Immunology*. 2020;11: 565142. doi:10.3389/fimmu.2020.565142.
87. Dumonteil E, Herrera C, Marx PA. Safety and preservation of cardiac function following therapeutic vaccination against *Trypanosoma cruzi* in rhesus macaques. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. 2023;56(2): 400–407. doi:10.1016/j.jmii.2022.09.003.
88. Calderón-Quintal JA, Teh-Poot CF, Pisté LMP, Martinez-Vega PP, Dzul-Huchim V, Torres-Acosta F, et al. Randomized field trial of a therapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* natural infection in dogs and correlates for efficacy. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*. 2025; 2025.05.12.653529. doi:10.1101/2025.05.12.653529.
89. 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.
90. de la Cruz JJ, Villanueva-Lizama L, Dzul-Huchim V, Ramírez-Sierra MJ, Martínez-Vega P, Rosado-Vallado M, et al. Production of recombinant TSA-1 and evaluation of its potential for the immuno-therapeutic control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2019;15(1): 210–219. doi:10.1080/21645515.2018.1520581.
 91. Dumonteil E, Herrera C, Tu W, Goff K, Fahlberg M, Haupt E, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant vaccine against *Trypanosoma cruzi* in Rhesus macaques. *Vaccine*. 2020;38(29): 4584–4591. doi:10.1016/j.vaccine.2020.05.010.
 92. Garg N, Tarleton RL. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*. 2002;70(10): 5547–5555. doi:10.1128/IAI.70.10.5547-5555.2002.
 93. Sepulveda P, Hontebeyrie M, Liegeard P, Mascilli A, Norris KA. DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*. 2000;68(9): 4986–4991. doi:10.1128/IAI.68.9.4986-4991.2000.
 94. De Pablos LM, Osuna A. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. *Infection and Immunity*. 2012;80(7): 2258–2264. doi:10.1128/IAI.06225-11.
 95. Pollevick GD, Affranchino JL, Frasch AC, Sánchez DO. The complete sequence of a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1991;47(2): 247–250. doi:10.1016/0166-6851(91)90185-9.
 96. Nardy AFFR, Freire-de-Lima CG, Pérez AR, Morrot A. Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7: 348. doi:10.3389/fmicb.2016.00348.
 97. 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. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11: 768450. doi:10.3389/fcimb.2021.768450.
 98. Campetella O, Buscaglia CA, Mucci J, Leguizamón MS. Parasite-host glycan interactions during *Trypanosoma cruzi* infection: trans-Sialidase rides the show. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(5): 165692. doi:10.1016/j.bbdis.2020.165692.
 99. 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): 3628–3637. doi:10.1016/j.vaccine.2019.05.015.
 100. Buscaglia CA, Alfonso J, Campetella O, Frasch ACC. Tandem Amino Acid Repeats From *Trypanosoma cruzi* Shed Antigens Increase the Half-Life of Proteins in Blood. *Blood*. 1999;93(6): 2025–2032. doi:10.1182/blood.V93.6.2025.406k19_2025_2032.
 101. 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): 555–565. doi:10.2217/imt-2017-0009.
102. 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): 1444–1460. doi:10.1002/prot.26537.
 103. Pacini MF, Balbi CB, Dinatale B, González FB, Prochetto E, De Hernández MA, et al. Intranasal trans-sialidase-based vaccine against *Trypanosoma cruzi* triggers a mixed cytokine profile in the nasopharynx-associated lymphoid tissue and confers local and systemic immunogenicity. *Acta Tropica*. 2023;241: 106889. doi:10.1016/j.actatropica.2023.106889.
 104. 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): 1274–1283. doi:10.1016/j.vaccine.2015.01.044.
 105. Bontempi I, Leal K, Prochetto E, Díaz G, Cabrera G, Bortolotti A, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG is a promising platform to develop vaccines against *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical and Experimental Immunology*. 2020;201(3): 306–316. doi:10.1111/cei.13469.
 106. 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): 2311–2323. doi:10.1016/j.vaccine.2022.02.071.
 107. Morein B, Lövgren K, Höglund S, Sundquist B. The ISCOM: an immunostimulating complex. *Immunology Today*. 1987;8(11): 333–338. doi:10.1016/0167-5699(87)90008-9.
 108. Bertona D, Pujato N, Bontempi I, Gonzalez V, Cabrera G, Gugliotta L, et al. Development and assessment of a new cage-like particle adjuvant. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017;69(10): 1293–1303. doi:10.1111/jphp.12768.
 109. Bidart J, Kornuta C, Gammella M, Gnazzo V, Soria I, Langellotti C, et al. A New Cage-Like Particle Adjuvant Enhances Protection of Foot-and-Mouth Disease Vaccine. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7: 396. doi:10.3389/fvets.2020.00396.
 110. 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): 58003–58020. doi:10.18632/oncotarget.18217.
 111. Borgna E, Prochetto E, Gamba JC, Marcipar I, Cabrera G. Role of myeloid-derived suppressor cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2023;375: 117–163. doi:10.1016/bs.ircmb.2022.09.002.
 112. 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*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11: 671104. doi:10.3389/fcimb.2021.671104.
 113. Dubensky TW, Kanne DB, Leong ML. Rationale, progress and development of vaccines

- utilizing STING-activating cyclic dinucleotide adjuvants. *Therapeutic Advances in Vaccines*. 2013;1(4): 131–143. doi:10.1177/2051013613501988.
114. Ebensen T, Libanova R, Schulze K, Yevsa T, Morr M, Guzmán CA. Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant. *Vaccine*. 2011;29(32): 5210–5220. doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.026.
 115. 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.
 116. Quintana I, Espariz M, Villar SR, González FB, Pacini MF, Cabrera G, et al. Genetic Engineering of *Lactococcus lactis* Co-producing Antigen and the Mucosal Adjuvant 3' 5'-cyclic di Adenosine Monophosphate (c-di-AMP) as a Design Strategy to Develop a Mucosal Vaccine Prototype. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9: 2100. doi:10.3389/fmicb.2018.02100.
 117. 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*. *Frontiers in Immunology*. 2025;16: 1526573. doi:10.3389/fimmu.2025.1526573.
 118. Wang Y, De Labastida Rivera F, Edwards CL, Frame TC, Engel JA, Bukali L, et al. STING activation promotes autologous type I interferon-dependent development of type 1 regulatory T cells during malaria. *The Journal of Clinical Investigation*. 2023;133(19): e169417. doi:10.1172/JCI169417.
 119. Rhee JH, Lee SE, Kim SY. Mucosal vaccine adjuvants update. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 2012;1(1): 50–63. doi:10.7774/cevr.2012.1.1.50.
 120. Gogoi H, Mansouri S, Jin L. The Age of Cyclic Dinucleotide Vaccine Adjuvants. *Vaccines*. 2020;8(3): 453. doi:10.3390/vaccines8030453.
 121. Schnyder JL, Garcia Garrido HM, De Pijper CA, Daams JG, Stijns C, Goorhuis A, et al. Comparison of equivalent fractional vaccine doses delivered by intradermal and intramuscular or subcutaneous routes: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2021;41: 102007. doi:10.1016/j.tmaid.2021.102007.
 122. Rai CI, Kuo TH, Chen YC. Novel Administration Routes, Delivery Vectors, and Application of Vaccines Based on Biotechnologies: A Review. *Vaccines*. 2024;12(9): 1002. doi:10.3390/vaccines12091002.
 123. Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Frontiers in Immunology*. 2013;4: 185. doi:10.3389/fimmu.2013.00185.
 124. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature Reviews. Immunology*. 2012;12(8): 592–605. doi:10.1038/nri3251.
 125. Riese P, Sakthivel P, Trittel S, Guzmán CA. Intranasal formulations: promising strategy to deliver vaccines. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014;11(10): 1619–1634. doi:10.1517/17425247.2014.931936.

126. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10115): 82–94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
127. Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CRF, Claser C, Machado AMV, Gazzinelli RT, et al. Protective Immunity Against *Trypanosoma cruzi* Infection in a Highly Susceptible Mouse Strain After Vaccination with Genes Encoding the Amastigote Surface Protein-2 and Trans-Sialidase. *Human Gene Therapy*. 2004;15(9): 878–886. doi:10.1089/hum.2004.15.878.
128. Gupta S, Garg NJ. Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in mice. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(8): e797. doi:10.1371/journal.pntd.0000797.
129. Paláu MT, Mejía AJ, Vergara U, Zúñiga CA. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98: 543–548. doi:https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000400022.
130. Khan AA, Taylor MC, Fortes Francisco A, Jayawardhana S, Atherton RL, Olmo F, et al. Animal models for exploring Chagas disease pathogenesis and supporting drug discovery. *Clinical Microbiology Reviews*. 2024;37(4): e0015523. doi:10.1128/cmr.00155-23.
131. Sarkar S, Heise MT. Mouse Models as Resources for Studying Infectious Diseases. *Clinical Therapeutics*. 2019;41(10): 1912–1922. doi:10.1016/j.clinthera.2019.08.010.
132. Talvani A, Teixeira MM. Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease—A Word of Caution. *Microorganisms*. 2023;11(6): 1613. doi:10.3390/microorganisms11061613.
133. Gironès N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends in Parasitology*. 2003;19(1): 19–22. doi:10.1016/s1471-4922(02)00006-5.
134. Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015;9: 4807–4823. doi:10.2147/DDDT.S90208.
135. Trischmann T, Tanowitz H, Wittner M, Bloom B. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Experimental Parasitology*. 1978;45(2): 160–168. doi:10.1016/0014-4894(78)90055-3.
136. Santi-Rocca J, Fernandez-Cortes F, Chillón-Marinas C, González-Rubio ML, Martin D, Gironès N, et al. A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Scientific Reports*. 2017;7(1): 8893. doi:10.1038/s41598-017-08086-8.
137. Silvestrini MMA, Alessio GD, Frias BED, Sales Júnior PA, Araújo MSS, Silvestrini CMA, et al. New insights into *Trypanosoma cruzi* genetic diversity, and its influence on parasite biology and clinical outcomes. *Frontiers in Immunology*. 2024;15: 1342431. doi:10.3389/fimmu.2024.1342431.
138. Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS, Zaverucha do Valle T, Lagrange PH. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histology and Histopathology*. 2002;17(3): 837–844. doi:10.14670/HH-17.837.

139. 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. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9: 553. doi:10.3389/fmicb.2018.00553.
140. Marinho CRF, Bucci DZ, Dagli MLZ, Bastos KRB, Grisotto MG, Sardinha LR, et al. Pathology Affects Different Organs in Two Mouse Strains Chronically Infected by a Trypanosoma cruzi Clone: a Model for Genetic Studies of Chagas' Disease. *Infection and Immunity*. 2004;72(4): 2350–2357. doi:10.1128/IAI.72.4.2350-2357.2004.
141. Marinho CRF, Nuñez-Apaza LN, Bortoluci KR, Bombeiro AL, Bucci DZ, Grisotto MG, et al. Infection by the Sylvio X10/4 clone of Trypanosoma cruzi: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes and Infection*. 2009;11(13): 1037–1045. doi:10.1016/j.micinf.2009.07.011.
142. Eickhoff CS, Lawrence CT, Sagartz JE, Bryant LA, Labovitz AJ, Gala SS, et al. ECG Detection of Murine Chagasic Cardiomyopathy. *Journal of Parasitology*. 2010;96(4): 758–764. doi:10.1645/GE-2396.1.
143. Waldeck B, Schaub GA. 'Natural infections' with Trypanosoma cruzi via the skin of mice: size of mouthparts of vectors and numbers of invading parasites. *Parasitology Research*. 2022;121(7): 2033–2041. doi:10.1007/s00436-022-07516-5.
144. Dias GBM, Gruendling AP, Araújo SM, Gomes ML, Toledo MJ de O. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of Trypanosoma cruzi I and II. *Experimental Parasitology*. 2013;135(3): 511–517. doi:10.1016/j.exppara.2013.08.013.
145. Pacini MF, Bulfoni Balbi C, Dinatale B, Farré C, Cacik P, Gonzalez FB, et al. Intranasal Trans-Sialidase Vaccine Mitigates Acute and Chronic Pathology in a Preclinical Oral Chagas Disease Model. *Vaccines*. 2024;12(10): 1171. doi:10.3390/vaccines12101171.
146. de Hernández MA, 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.
147. Campos JDS, Hoppe LY, Duque TLA, de Castro SL, Oliveira GM. Use of Noninvasive Parameters to Evaluate Swiss Webster Mice During Trypanosoma cruzi Experimental Acute Infection. *The Journal of Parasitology*. 2016;102(2): 280–285. doi:10.1645/15-884.
148. Silva DR da, Castro SL de, Alves MC da S, Batista W da S, Oliveira GM de. Acute experimental Trypanosoma cruzi infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(2): 211–216. doi:10.1590/s0074-02762012000200010.
149. Francisco AF, Sousa GR, Vaughan M, Langston H, Khan A, Jayawardhana S, et al. Cardiac Abnormalities in a Predictive Mouse Model of Chagas Disease. *Pathogens*. 2023;12(11): 1364. doi:10.3390/pathogens12111364.
150. Guyton AC, Hall JE. *Guyton y Hall. Repaso de fisiología médica..* 14th edn Elsevier; 2021.
151. Haro P, Hevia-Montiel N, Perez-Gonzalez J. ECG Marker Evaluation for the Machine-Learning-Based Classification of Acute and Chronic Phases of Trypanosoma cruzi Infection

- in a Murine Model. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2023;8(3): 157. doi:10.3390/tropicalmed8030157.
152. Andrade LO, Andrews NW. The Trypanosoma cruzi–host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(10): 819–823. doi:10.1038/nrmicro1249.
 153. Lewis MD, Francisco AF, Taylor MC, Jayawardhana S, Kelly JM. Host and parasite genetics shape a link between Trypanosoma cruzi infection dynamics and chronic cardiomyopathy. *Cellular Microbiology*. 2016;18(10): 1429–1443. doi:10.1111/cmi.12584.
 154. Hall P, Cash J. What is the Real Function of the Liver ‘Function’ Tests? *The Ulster Medical Journal*. 2012;81(1): 30–36.
 155. Huang X, Bai S, Luo Y. Advances in research on biomarkers associated with acute myocardial infarction: A review. *Medicine*. 2024;103(15): e37793. doi:10.1097/MD.00000000000037793.
 156. Blättner S, Das S, Paprotka K, Eilers U, Krischke M, Kretschmer D, et al. Staphylococcus aureus Exploits a Non-ribosomal Cyclic Dipeptide to Modulate Survival within Epithelial Cells and Phagocytes. *PLoS pathogens*. 2016;12(9): e1005857. doi:10.1371/journal.ppat.1005857.
 157. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *The American Journal of Physiology*. 1998;274(3): H747–751. doi:10.1152/ajpheart.1998.274.3.H747.
 158. de Hernández MA, 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.
 159. 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. *Clinical and Experimental Immunology*. 2002;128(3): 421–428. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01874.x.
 160. Andersson J, Orn A, Sunnemark D. Chronic murine Chagas’ disease: the impact of host and parasite genotypes. *Immunology Letters*. 2003;86(2): 207–212. doi:10.1016/s0165-2478(03)00019-1.
 161. Barbosa CG, Gómez-Hernández C, Rezende-Oliveira K, Da Silva MV, Rodrigues JPF, Tiburcio MGS, et al. Oral infection of mice and host cell invasion by Trypanosoma cruzi strains from Mexico. *Parasitology Research*. 2019;118(5): 1493–1500. doi:10.1007/s00436-019-06254-5.
 162. Chen L, Watanabe T, Watanabe H, Sendo F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas’ disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *European Journal of Immunology*. 2001;31(1): 265–275. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1<265::AID-IMMU265>3.0.CO;2-L.

163. 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. *Frontiers in Immunology*. 2024;15: 1484290. doi:10.3389/fimmu.2024.1484290.
164. Caradonna K, PereiraPerrin M. Preferential Brain Homing following Intranasal Administration of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 2009;77(4): 1349–1356. doi:10.1128/iai.01434-08.
165. Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Medicina Clinica*. 2017;148(3): 125–131. doi:10.1016/j.medcli.2016.10.038.
166. Rojas LZ, Glisic M, Pletsch-Borba L, Echeverría LE, Bramer WM, Bano A, et al. Electrocardiographic abnormalities in Chagas disease in the general population: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018;12(6): e0006567. doi:10.1371/journal.pntd.0006567.
167. Roman-Campos D, Marin-Neto JA, Santos-Miranda A, Kong N, D'Avila A, Rassi A. Arrhythmogenic Manifestations of Chagas Disease: Perspectives From the Bench to Bedside. *Circulation Research*. 2024;134(10): 1379–1397. doi:10.1161/CIRCRESAHA.124.324507.
168. Mishra A, Ete T, Fanai V, Malviya A. A review on cardiac manifestation of parasitic infection. *Tropical Parasitology*. 2023;13(1): 8–15. doi:10.4103/tp.tp_45_21.
169. Chaves AA, Dech SJ, Nakayama T, Hamlin RL, Bauer JA, Carnes CA. Age and anesthetic effects on murine electrocardiography. *Life Sciences*. 2003;72(21): 2401–2412. doi:10.1016/s0024-3205(03)00137-1.
170. Calvet C, Seebeck P. What to consider for ECG in mice-with special emphasis on telemetry. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*. 2023;34(2): 166–179. doi:10.1007/s00335-023-09977-0.
171. Nguyen DM, Poveda C, Pollet J, Gusovsky F, Bottazzi ME, Hotez PJ, et al. The impact of vaccine-linked chemotherapy on liver health in a mouse model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2023;17(11): e0011519. doi:10.1371/journal.pntd.0011519.
172. Pinazo MJ, Thomas MC, Bustamante J, Almeida IC de, Lopez MC, Gascon J. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110: 422–432. doi:https://doi.org/10.1590/0074-02760140435.
173. Sherbuk JE, Okamoto EE, Marks MA, Fortuny E, Clark EH, Galdos-Cardenas G, et al. Biomarkers and Mortality in Severe Chagas Cardiomyopathy. *Global Heart*. 2015;10(3): 173–180. doi:10.1016/j.gheart.2015.07.003.
174. Requena-Méndez A, López MC, Angheben A, Izquierdo L, Ribeiro I, Pinazo MJ, et al. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2013;11(9): 957–976. doi:10.1586/14787210.2013.824718.
175. Pereira IR, Vilar-Pereira G, Silva AA da, Lannes-Vieira J. Severity of chronic experimental

- Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109: 289–298. doi:10.1590/0074-0276140033.
176. Giddings OK, Eickhoff CS, Sullivan NL, Hoft DF. Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG Adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infection and Immunity*. 2010;78(3): 1333–1338. doi:10.1128/IAI.00278-09.
 177. 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. *Journal of Immunology*. 2007;179(10): 6889–6900. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6889.
 178. Duan X, Yonemitsu Y, Chou B, Yoshida K, Tanaka S, Hasegawa M, et al. Efficient protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection after nasal vaccination with recombinant Sendai virus vector expressing amastigote surface protein-2. *Vaccine*. 2009;27(44): 6154–6159. doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.026.
 179. Corrigan RM, Campeotto I, Jeganathan T, Roelofs KG, Lee VT, Gründling A. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(22): 9084–9089. doi:10.1073/pnas.1300595110.
 180. Cacik P, Pacini MF, Bulfoni Balbi C, Dinatale B, Diaz G, Cha U, et al. Nasal vaccination against *Trypanosoma cruzi*: a dual approach for prevention and treatment of chronic Chagas cardiomyopathy. *Frontiers in Immunology*. 2025;16: 1662036. doi:10.3389/fimmu.2025.1662036.
 181. Prochetto E. Obtención y evaluación preclínica de dos fracciones de la proteína transialidasa de *T. cruzi* para ser usadas como subunidades en el desarrollo de vacunas contra el parásito. 2015; <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/handle/11185/1283>
 182. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2003;129(1): 53–59. doi:10.1016/s0166-6851(03)00093-8.
 183. Rossi MA, Ramos SG, Bestetti RB. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 2003;8: e94-109. doi:10.2741/948.
 184. Rossi MA. Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis. *Sao Paulo Medical Journal = Revista Paulista De Medicina*. 1995;113(2): 750–756. doi:10.1590/s1516-31801995000200004.
 185. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007;115(9): 1109–1123. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296.
 186. De Alba-Alvarado M, Bucio-Torres MI, Zenteno E, Sampedro-Carrillo E, Hernández-Lopez M, Reynoso-Ducoing O, et al. Response to Infection by *Trypanosoma cruzi* in a Murine Model. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7: 568745. doi:10.3389/fvets.2020.568745.

187. Rodríguez-Morales O, Roldán FJ, Vargas-Barrón J, Parra-Benítez E, Medina-García M de L, Vergara-Bello E, et al. Echocardiographic Findings in Canine Model of Chagas Disease Immunized with DNA *Trypanosoma cruzi* Genes. *Animals: an open access journal from MDPI*. 2020;10(4): 648. doi:10.3390/ani10040648.
188. Rodríguez-Morales O, Pérez-Leyva MM, Ballinas-Verdugo MA, Carrillo-Sánchez SC, Rosales-Encina JL, Alexandre-Aguilar R, et al. Plasmid DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* genes induces cardiac and clinical protection against Chagas disease in the canine model. *Veterinary Research*. 2012;43(1): 79. doi:10.1186/1297-9716-43-79.
189. Arce-Fonseca M, Carbajal-Hernández AC, Lozano-Camacho M, Carrillo-Sánchez S del C, Roldán FJ, Aranda-Fraustro A, et al. DNA Vaccine Treatment in Dogs Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology Research*. 2020;2020: 9794575. doi:10.1155/2020/9794575.
190. Quijano-Hernandez IA, Bolio-González ME, Rodríguez-Buenfil JC, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E. Therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1149: 343–346. doi:10.1196/annals.1428.098.
191. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International Journal for Parasitology*. 2001;31(5–6): 550–554. doi:10.1016/s0020-7519(01)00158-8.
192. Cevey ÁC, Mirkin GA, Penas FN, Goren NB. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*. 2016;6(1): 12–22. doi:10.1016/j.ijpddr.2015.12.001.
193. Caldas S, Caldas IS, Diniz L de F, Lima WG de, Oliveira R de P, Cecílio AB, et al. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Tropica*. 2012;123(3): 170–177. doi:10.1016/j.actatropica.2012.05.002.
194. Wesley M, Moraes A, Rosa A de C, Lott Carvalho J, Shiroma T, Vital T, et al. Correlation of Parasite Burden, kDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10: 1856. doi:10.3389/fmicb.2019.01856.
195. Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104: 236–245. doi:https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900030.
196. Cerny N, Sánchez Alberti A, Bivona AE, De Marzi MC, Frank FM, Cazorla SI, et al. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new immunotherapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(2): 438–450. doi:10.1080/21645515.2015.1078044.
197. Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Berbert LR, Revelli S, Beloscar J, Savino W, et al. Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. *Journal of Neuroimmunology*. 2011;235(1–2): 84–90. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.03.010.

198. Cristovão-Silva AC, Brelaz-de-Castro MCA, Hernandes MZ, Pereira VRA. Chagas disease: Immunology of the disease at a glance. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2021;62: 15–22. doi:10.1016/j.cytogfr.2021.10.001.
199. Koh CC, Neves EGA, de Souza-Silva TG, Carvalho AC, Pinto CHR, Galdino AS, et al. Cytokine Networks as Targets for Preventing and Controlling Chagas Heart Disease. *Pathogens*. 2023;12(2): 171. doi:10.3390/pathogens12020171.
200. Chaves AT, Menezes CAS, Costa HS, Nunes MCP, Rocha MOC. Myocardial fibrosis in chagas disease and molecules related to fibrosis. *Parasite Immunology*. 2019;41(10): e12663. doi:10.1111/pim.12663.
201. Ferreira RR, Waghbi MC, Bailly S, Feige JJ, Hasslocher-Moreno AM, Saraiva RM, et al. The Search for Biomarkers and Treatments in Chagas Disease: Insights From TGF-Beta Studies and Immunogenetics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;11: 767576. doi:10.3389/fcimb.2021.767576.
202. González FB, Villar SR, Fernández Bussy R, Martin GH, Pérol L, Manarin R, et al. Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled T. cruzi infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3(+) T cells. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015;45: 219–232. doi:10.1016/j.bbi.2014.11.016.
203. 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 neglected tropical diseases*. 2010;4(2): e604. doi:10.1371/journal.pntd.0000604.
204. Amezcua Vesely MC, Rodríguez C, Gruppi A, Acosta Rodríguez EV. Interleukin-17 mediated immunity during infections with Trypanosoma cruzi and other protozoans. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(5): 165706. doi:10.1016/j.bbdis.2020.165706.
205. 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 pathogens*. 2016;12(10): e1005902. doi:10.1371/journal.ppat.1005902.
206. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, et al. Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease. *Cellular Microbiology*. 2012;14(5): 634–643. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x.
207. Tanowitz HB, Scherer PE, Mota MM, Figueiredo LM. Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? *Trends in Parasitology*. 2017;33(4): 276–284. doi:10.1016/j.pt.2016.11.008.
208. Ferreira AVM, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, de Oliveira Andrade L, et al. Evidence for Trypanosoma cruzi in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes and Infection*. 2011;13(12–13): 1002–1005. doi:10.1016/j.micinf.2011.06.002.
209. Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*. 1996;348(9031): 891–892. doi:10.1016/S0140-6736(05)64761-7.
210. Da Mata JR, Camargos MR, Chiari E, Machado CR. Trypanosoma cruzi infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction

- to parasitism. *Brain Research Bulletin*. 2000;53(2): 153–162. doi:10.1016/s0361-9230(00)00326-9.
211. Lewis MD, Fortes Francisco A, Taylor MC, Burrell-Saward H, McLatchie AP, Miles MA, et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cellular Microbiology*. 2014;16(9): 1285–1300. doi:10.1111/cmi.12297.
 212. Perin L, Moreira da Silva R, Fonseca K da S, Cardoso JM de O, Mathias FAS, Reis LES, et al. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Benznidazole after Oral Administration in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(4): e02410-16. doi:10.1128/AAC.02410-16.
 213. 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.
 214. Barrett MP, Kyle DE, Sibley LD, Radke JB, Tarleton RL. Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. *Nature Reviews. Microbiology*. 2019;17(10): 607–620. doi:10.1038/s41579-019-0238-x.
 215. Losada Galván I, Alonso-Padilla J, Cortés-Serra N, Alonso-Vega C, Gascón J, Pinazo MJ. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2021;19(5): 547–556. doi:10.1080/14787210.2021.1834849.
 216. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(13): 5022–5027. doi:10.1073/pnas.0711014105.
 217. Ward AI, Lewis MD, Khan AA, McCann CJ, Francisco AF, Jayawardhana S, et al. In Vivo Analysis of *Trypanosoma cruzi* Persistence Foci at Single-Cell Resolution. *mBio*. 2020;11(4): e01242-20. doi:10.1128/mBio.01242-20.
 218. Puerta CJ, Cuellar A, Lasso P, Mateus J, Gonzalez JM. *Trypanosoma cruzi*-specific CD8⁺ T cells and other immunological hallmarks in chronic Chagas cardiomyopathy: Two decades of research. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12: 1075717. doi:10.3389/fcimb.2022.1075717.
 219. Romanha AJ, Alves RO, Murta SMF, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(6): 823–828. doi:10.1086/342415.
 220. Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8⁺ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nature Medicine*. 2008;14(5): 542–550. doi:10.1038/nm1744.
 221. Jones K, Versteeg L, Damania A, Keegan B, Kendricks A, Pollet J, et al. Vaccine-Linked Chemotherapy Improves Benznidazole Efficacy for Acute Chagas Disease. *Infection and Immunity*. 2018;86(4): e00876-17. doi:10.1128/IAI.00876-17.
 222. Cruz-Chan JV, Villanueva-Lizama LE, Versteeg L, Damania A, Villar MJ, González-López C,

- et al. Vaccine-linked chemotherapy induces IL-17 production and reduces cardiac pathology during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 3222. doi:10.1038/s41598-021-82930-w.
223. Dzul-Huchim VM, Ramirez-Sierra MJ, Martinez-Vega PP, Rosado-Vallado ME, Arana-Argaez VE, Ortega-Lopez J, et al. Vaccine-linked chemotherapy with a low dose of benznidazole plus a bivalent recombinant protein vaccine prevents the development of cardiac fibrosis caused by *Trypanosoma cruzi* in chronically-infected BALB/c mice. *PLoS neglected tropical diseases*. 2022;16(9): e0010258. doi:10.1371/journal.pntd.0010258.
 224. Jones KM, Mangin EN, Reynolds CL, Villanueva LE, Cruz JV, Versteeg L, et al. Vaccine-linked chemotherapy improves cardiac structure and function in a mouse model of chronic Chagas disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023;13: 1106315. doi:10.3389/fcimb.2023.1106315.
 225. Nguyen DM, Poveda C, Pollet J, Gusovsky F, Bottazzi ME, Hotez PJ, et al. The impact of vaccine-linked chemotherapy on liver health in a mouse model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2023;17(11): e0011519. doi:10.1371/journal.pntd.0011519.
 226. Delfino MA, Trinitario S, Cenizo R, Carrizo F, Borgo J, Dzvonyk P, et al. *mRNA-Tc-Vax vaccine induces T cell-dependent prophylactic and therapeutic protection against Trypanosoma cruzi*. 2025. doi:10.21203/rs.3.rs-7553347/v1.
 227. Wait LF, Dobson AP, Graham AL. Do parasite infections interfere with immunisation? A review and meta-analysis. *Vaccine*. 2020;38(35): 5582–5590. doi:10.1016/j.vaccine.2020.06.064.
 228. Romanha AJ, Alves RO, Murta SMF, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(6): 823–828. doi:10.1086/342415.
 229. Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, et al. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(10): 2549–2556. doi:10.1128/AAC.42.10.2549.
 230. Bustamante JM, Sanchez-Valdez F, Padilla AM, White B, Wang W, Tarleton RL. A modified drug regimen clears active and dormant trypanosomes in mouse models of Chagas disease. *Science Translational Medicine*. 2020;12(567): eabb7656. doi:10.1126/scitranslmed.abb7656.
 231. Francisco AF, Jayawardhana S, Taylor MC, Lewis MD, Kelly JM. Assessing the Effectiveness of Curative Benznidazole Treatment in Preventing Chronic Cardiac Pathology in Experimental Models of Chagas Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(10): e00832-18. doi:10.1128/AAC.00832-18.
 232. Hoffman KA, Reynolds C, Bottazzi ME, Hotez P, Jones K. Improved Biomarker and Imaging Analysis for Characterizing Progressive Cardiac Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Chagasic Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8(22): e013365. doi:10.1161/JAHA.119.013365.

233. Scarim CB, Ribeiro AR, Rosa JA da, Chin CM. Response to different benznidazole doses in animal models of chronic phase Chagas disease: a critical review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018;51: 133–140. doi:<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0337-2017>.
234. Francisco AF, Jayawardhana S, Lewis MD, White KL, Shackleford DM, Chen G, et al. Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. *Scientific Reports*. 2016;6: 35351. doi:[10.1038/srep35351](https://doi.org/10.1038/srep35351).
235. Neal RA, van Bueren J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988;82(5): 709–714. doi:[10.1016/0035-9203\(88\)90208-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90208-8).
236. Toledo MJ de O, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, et al. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(1): 223–230. doi:[10.1128/AAC.47.1.223-230.2003](https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.223-230.2003).
237. Penas FN, Cevey AC, Siffo S, Mirkin GA, Goren NB. Hepatic injury associated with *Trypanosoma cruzi* infection is attenuated by treatment with 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂. *Experimental Parasitology*. 2016;170: 100–108. doi:[10.1016/j.exppara.2016.09.015](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.015).
238. Santos VRCD, Antunes D, Souza D do SM de, Moreira OC, Lima IC de A, Farias-de-Oliveira DA, et al. Human acute Chagas disease: changes in factor VII, activated protein C and hepatic enzymes from patients of oral outbreaks in Pará State (Brazilian Amazon). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2020;115: e190364. doi:[10.1590/0074-02760190364](https://doi.org/10.1590/0074-02760190364).
239. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiological Reviews*. 2007;87(2): 425–456. doi:[10.1152/physrev.00014.2006](https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2006).
240. Spach MS, Boineau JP. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing and clinical electrophysiology: PACE*. 1997;20(2 Pt 2): 397–413. doi:[10.1111/j.1540-8159.1997.tb06199.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.1997.tb06199.x).
241. Ndrepepa G. Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*. 2021;6(0). doi:[10.21037/jlpm-20-93](https://doi.org/10.21037/jlpm-20-93).
242. Novaes RD, Santos EC, Cupertino MC, Bastos DSS, Oliveira JM, Carvalho TV, et al. *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. *Parasitology Research*. 2015;114(8): 2873–2881. doi:[10.1007/s00436-015-4488-x](https://doi.org/10.1007/s00436-015-4488-x).
243. Acevedo GR, Girard MC, Gómez KA. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*. 2018;9: 1929. doi:[10.3389/fimmu.2018.01929](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929).
244. Ferreira RR, de Souza EM, Vilar-Pereira G, Degraive WMS, Abreu R da S, Meuser-Batista

- M, et al. In Chagas disease, transforming growth factor beta neutralization reduces *Trypanosoma cruzi* infection and improves cardiac performance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12. doi:10.3389/fcimb.2022.1017040.
245. Mateus J, Guerrero P, Lasso P, Cuervo C, González JM, Puerta CJ, et al. An Animal Model of Acute and Chronic Chagas Disease With the Reticulotropic Y Strain of *Trypanosoma cruzi* That Depicts the Multifunctionality and Dysfunctionality of T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2019;10: 918. doi:10.3389/fimmu.2019.00918.
246. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunology*. 2011;12(6): 492–499. doi:10.1038/ni.2035.
247. Gálvez RI, Jacobs T. Exhausted PD-1⁺ TOX⁺ CD8⁺ T Cells Arise Only in Long-Term Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Frontiers in Immunology*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.866179.

Anexo: Información complementaria

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

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

Medio LB líquido:

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

Medio LB agar

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

Transformación de bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) con la construcción pET-28a(+) TSNT:

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

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS PAGE):

<i>Solución</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Concentración</i>
GEL DE APILAMIENTO	Tris-HCl (pH 6,8)	130 Mm
	SDS	0,05 % (p/v)
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	4,8 % (p/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
	Persulfato de amonio	0,05 % (p/v)
GEL DE CONCENTRACIÓN	Tris-HCl (pH= 8,8)	375 mM
	SDS	0,1 % (p/v)
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	15 % (p/v)
	Glicerol	10 % (v/v)
	TEMED	10 % (v/v)

	Persulfato de amonio	0,06 % (v/v)
BUFFER DE MUESTRA 5X	Tris-HCl (pH= 6,8) GlicerolSDS 2-mercaptoetanol Azul de bromofenol	312 mM 50 % (v/v) 10 % (p/v) 12,5 % (v/v) 0,5 % (p/v)
BUFFER DE CORRIDA	Tris-HCl pH 8,3 GlicinaSDS	25 mM 192 mM 0,1 % (p/v)
SOLUCIÓN COLORANTE	Coomassie Brilliant Blue R- 250 (Genbiotech) Etanol Ácido acético	0,5 % (p/v) 45 % (v/v) 10 % (v/v)
SOLUCIÓN DECOLORANTE I	Etanol Ácido Acético	50 % (v/v) 10 % (v/v)
SOLUCIÓN DECOLORANTE II	Etanol Ácido Acético	10 % (v/v) 7 % (v/v)

Método colorimétrico del BCA para la cuantificación de proteínas:

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

Técnica de ELISA:

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

Buffer de lisis para disgregar corazones:

Reactivo	Concentración
Tris-HCl	10 mM (pH=7,6)
NaCl	0,1 M

EDTA	10 mM
SDS	0,5%
Proteinasa K	300 µg/ml