




**UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE ROSARIO**



**GMD** Facultad Cs. Médicas  
Biblioteca  
  
TDM 2400

**CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“Evaluación preclínica de la eficacia de una vacuna  
a subunidades recombinante contra *T. cruzi*  
administrada a nivel de mucosas”**

**MARIA FLORENCIA PACINI**

*TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS*

**DIRECTORA: ANA ROSA PÉREZ**

Lugar de realización:

CONICET



I D I C E R

**2023**

*"Pero su legado más valioso lo disfrutó la humanidad entera. Cuando Louis Pasteur inventó la inmunización contra la rabia, la llamó vacuna en honor a Jenner. La palabra pasó a ser sinónimo de inmunización contra un sinfín de enfermedades que poco o nada tenían que ver con la viruela"*

*"A flor de piel"*

*Javier Moro -1955*

# AGRADECIMIENTOS

*Me gustaría agradecer a las siguientes personas...*

*... En primer lugar y ante todo a mi directora, Ana Rosa, gracias por enseñarme, ayudarme, acompañarme y formarme durante todo este proceso. Gracias simplemente por confiar y por brindarme numerosas oportunidades de crecer y sobre todo por la infinita paciencia. Gracias principalmente por estar siempre presente, tanto en lo profesional como en lo personal, apoyándome en los buenos y malos momentos.*

*... A mi Chagas team incondicional, Flor, Cami y Bren por siempre estar presente tanto en lo laboral como personal. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes.*

*... A todo el equipo del IDICER, porque siempre están predispuestos a ayudar con una sonrisa y porque hacen que el trabajo sea más liviano. Agradezco haber podido realizar este proyecto acompañada de este gran grupo humano. Gracias principalmente al Dr. Oscar Bottasso, por su asesoramiento y colaboración.*

*...Al Dr. Ivan Marcipar y todo su equipo, por su gran colaboración y enseñanza en este proyecto. A pesar de la distancia siempre están predispuestos a ayudarnos.*

*... Al Dr. Christian Magni y su equipo, por enseñarme nuevos enfoques en este proyecto y por su gran colaboración.*

*...A mi familia, porque simplemente son todo. Gracias por ayudarme, aconsejarme, aguantarme y sostenerme siempre. Gracias a esas mascotas incondicionales que te salvan más de una vez, a Hily, mi perra, Tata y Loco, mis gatos, siempre acompañándome en todo momento. Gracias a mis abuelos, por su amor incondicional, este logro es parte de ellos también.*

*...A mis amigas de toda la vida, por estar siempre presente y hacer de los logros un festejo y de las caídas un aprendizaje.*

*...Simplemente gracias a todas las personas hermosas que me crucé en esta formación. Todos siempre predispuestos a enseñar y dar lo mejor. Gracias por divertirnos y reírnos en cada encuentro.*

# PUBLICACIONES

A continuación se detallan las publicaciones realizadas en el contexto de esta tesis:

- ***The high identity of the Trypanosoma cruzi Group-I of Trans-sialidases points them as promising vaccine immunogens*** Pacini M.F., Perdomini A., Bulfoni Balbi C., Dinatale B., Herrera F.E., Perez A.R. And Marcipar I. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2023. doi: 10.1002/prot.26537 (en prensa)
- ***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.*** Pacini M.F., Bulfoni Balbi C., Dinatale B., González F.B., Prochetto E., de Hernández M.A., Cribb P., Farré C., Espariz M., Blancato V.S., Magni C., Marcipar I., Pérez A.R. Acta Tropica, 2023. doi 10.1016/j.actatropica.2023.106889
- ***Nasal immunization with a L. lactis-derived trans-sialidase antigen plus c-di-AMP protects against acute oral T. cruzi infection.*** Pacini M.F., González F.B, Dinatale B, Bulfoni Balbi C, Villar S.R., Farré C, Lupi G, Espariz M, Blancato V.S., Magni C, Marcipar I, Pérez A.R. Vaccine. 2022;40(15):2311-2323. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.02.071
- ***Desarrollos preclínicos de vacunas profilácticas contra la Enfermedad de Chagas basadas en Transialidasa.*** B. Dinatale\*, C. Bulfoni Balbi\*, F.B. González, A.R. Pérez, M.F. Pacini. \*autoría compartida. Rev Fac Cs Méd UNR. Vol. 1: pp. 23 a 38. doi: 10.35305/fcm.v1i.17.. Divulgación científica.

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>2</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
1.1 Generalidades sobre la Enfermedad de Chagas	16
1.2 Agente Etiológico: Trypanosoma cruzi	18
1.3 Ciclo de Vida	19
1.4 Diversidad genética de Trypanosoma cruzi	21
1.5 Formas de transmisión	24
1.6 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas	27
1.7 Patogénesis de la Enfermedad de Chagas	30
1.8 Prevención y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas	32
1.9 Respuesta inmune frente a Trypanosoma cruzi	33
1.9.1 Inmunidad Innata	34
1.9.2 Inmunidad Adaptativa	38
1.10 Mucosas e infección por Trypanosoma cruzi	44
1.11 La familia de las Transialidasas	45
1.11.1 Rol de las Transialidasas en la invasión celular y la evasión del sistema inmune	48
1.12 Vacunas Mucosales	52
1.13 Adyuvantes	56
1.14 Vacunas profilácticas contra Trypanosoma cruzi	58
1.14.1 Uso de Transialidasa como inmunógeno en formulaciones vacunales contra Trypanosoma cruzi	60
1.14.2 Transialidasas recombinantes utilizadas en vacunas experimentales	61
1.14.3 Transialidasa en vacunas de ADN	64
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>66</b>
2.1 Objetivo general	66
2.2 Objetivos específicos	66
<b>3. CAPÍTULO 1</b>	<b>68</b>
3.1 INTRODUCCIÓN	68
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	70
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.3.1 Expresión y purificación del fragmento recombinante C-terminal del dominio catalítico de la proteína TS-GI	70
3.3.2 Adyuvante	71
3.3.3 Animales de experimentación	71
3.3.4 Diseño experimental	72
3.3.5 Protocolo de inmunización	72
3.3.6 Evaluación de la inmunogenicidad	73
3.3.6.1 Determinación de anticuerpos específicos en plasma y muestras fecales	73
3.3.6.2 Ensayo de inhibición de la invasión parasitaria	74
3.3.6.3 Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada	75
3.3.6.4 Cultivo de esplenocitos y estimulación ex vivo	75

3.3.6.5 Citometría de flujo	76
3.3.7 Evaluación de la eficacia protectora	77
3.3.7.1 Protocolo de infección y determinación de la parasitemia	77
3.3.7.2 Score clínico	78
3.3.7.3 Determinación de la carga parasitaria en músculo esquelético y cardíaco	79
3.3.7.4 Detección de ADN del kinetoplasto de Trypanosoma cruzi en sangre	80
3.3.7.5 Histopatología	81
3.3.8 Análisis estadístico	81
3.4 RESULTADOS	82
3.4.1 Inmunogenicidad de las formulaciones administradas por vía intranasal	82
3.4.2 Evaluación de la eficacia protectora en el contexto de la infección oral	86
3.5 CONCLUSIONES PARCIALES y DISCUSIÓN	90
<b>4. CAPÍTULO 2</b>	<b>96</b>
4.1 INTRODUCCIÓN	96
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	98
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	98
4.3.1 Expresión y purificación del fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la proteína TS-GI	98
4.3.2 Adyuvante	99
4.3.3 Animales de experimentación	100
4.3.4 Diseño experimental	100
4.3.5 Protocolo de inmunización e infección	100
4.3.6 Evaluación de la inmunogenicidad	101
4.3.6.1 Determinación de anticuerpos específicos en plasma, lavado nasal y muestras fecales	102
4.3.6.2 Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada	103
4.3.6.3 Cultivo de esplenocitos y estimulación ex vivo	103
4.3.6.4 Citometría de flujo	103
4.3.6.5 Cuantificación de citocinas en plasma	104
4.3.6.6 Aislamiento de NALT y determinación del perfil de citocinas por RT-qPCR	104
4.3.7 Evaluación de la eficacia protectora	105
4.3.7.1 Protocolo de infección y determinación de la parasitemia	106
4.3.7.2 Score clínico	106
4.3.7.3 Determinación de daño muscular y hepático en fase aguda y crónica	106
4.3.7.4 Histopatología	107
4.3.7.5 Electrocardiograma	107
4.3.8 Análisis estadístico	108
4.4 RESULTADOS	109
4.4.1 Inmunogenicidad de las formulaciones administradas por vía intranasal	109
4.4.2 Evaluación de la eficacia protectora en el contexto de la infección oral	114
4.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARCIALES	118
<b>5. CAPÍTULO 3</b>	<b>123</b>
5.1 INTRODUCCIÓN	123

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	124
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS	125
5.3.1 Animales y parásitos	125
5.3.2 Diseño experimental	125
5.3.3 Evaluación de la inmunogenicidad	126
5.3.3.1 Determinación de los niveles de anticuerpos específicos en plasma, lavado nasal y muestras fecales	126
5.3.3.2 Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada	127
5.3.3.3 Estimulación ex vivo y citometría de flujo	127
5.3.3.4 Aislamiento de NALT y determinación del perfil de citocinas por RT-qPCR	127
5.3.4 Evaluación ex-vivo e in-vivo de la capacidad neutralizante del plasma inmune	128
5.3.5 Análisis estadístico	129
5.4 RESULTADOS	130
5.4.1 Evaluación de la respuesta a nivel de mucosas	130
5.4.2 Evaluación de la respuesta sistémica	134
5.5 DISCUSIÓN y CONCLUSIONES PARCIALES	136
<b>6. CAPÍTULO 4</b>	<b>139</b>
6.1 INTRODUCCIÓN	139
6.2 OBJETIVO GENERAL	141
6.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	141
6.3 MATERIALES Y MÉTODOS	141
6.3.1 Flujo de trabajo metodológico	141
6.3.2 Genomas y Secuencias	142
6.3.3 Análisis de secuencia	144
6.3.4 Acoplamiento molecular y estimación de la afinidad de unión	145
6.4 RESULTADOS	146
6.4.1 Heterogeneidad y antigenicidad de las secuencias indexadas de TS-GI	146
6.4.2 Heterogeneidad y antigenicidad de las secuencias de TS-GI utilizadas en vacunas experimentales	151
6.4.3 Cobertura de las secuencias de TS-GI	157
6.4.4 Identificación de epítomos T compartidos entre HLA-I y H-2K	161
6.4.5 Diseño racional de una nueva formulación	164
6.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARCIALES	166
<b>7. CONCLUSIÓN FINAL Y PERSPECTIVAS</b>	<b>171</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>173</b>

# ABREVIATURAS

AcS	Ácido siálico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AUC	Área bajo la curva ( del inglés <i>Area Under Curve</i> )
BALT	Tejido linfoide asociado a los bronquios (del inglés <i>Bronchus-Associated Lymphoid Tissue</i> )
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BNZ	Benznidazol
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CDs	Células dendríticas
cGAS	GMP-AMP sintasa cíclica (del inglés <i>Cyclic GMP-AMP Synthase</i> )
CK	Creatina cinasa (del inglés <i>Creatine Kinase</i> )
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño tisular (del inglés <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i> )
DHT	Prueba de hipersensibilidad del tipo retardada (del inglés <i>Delayed-type Hypersensitivity Test</i> )
di-AMP-c	Monofosfato de adenosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico

DMEM	Del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DO	Densidad óptica
DTUs	Unidades discretas de tipificación (del inglés <i>Discrete Typing Unites</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECh	Enfermedad de Chagas
EGC	Electrocardiograma
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
Fc	Frecuencia cardíaca
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (del inglés <i>Food and Drug Administration</i> )
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino (del inglés <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> )
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética (del inglés <i>Glutamate Oxaloacetate Transaminase</i> )
GPI	Glicosilfosfatidilinositol (del inglés <i>Glycosylphosphatidylinositol</i> )
GPT	Transaminasa glutámico pirúvica (del inglés <i>Glutamate Pyruvate Transaminase</i> )
H2-K	Locus de Histocompatibilidad 2 -región K
HEPA	Filtros de aire de alto rendimiento (del inglés <i>High efficiency particulate air</i> )

HLA	Antígenos leucocitarios humanos (del inglés <i>Human Leukocyte Antigens</i> )
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
ISCOM	Complejo inmuno-estimulador (del inglés <i>Immune Stimulating Complexes</i> )
ISPA	Partículas inmunoestimulantes (del inglés <i>Immunostimulant Particles</i> )
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés <i>Mucosal-Associated Lymphoid Tissue</i> )
MCC	Miocarditis chagásica crónica
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>Major histocompatibility complex</i> )
NALT	Tejido linfoide asociado a la región nasal (del inglés <i>Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue</i> )
NFX	Nifurtimox
NK	Células asesinas naturales (del inglés <i>Natural Killer</i> )

NLR	Receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótido (del inglés <i>NOD-like receptors</i> )
NO	Óxido nítrico (del inglés <i>Nitric Oxide</i> )
OMS	Organización Mundial 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> )

SEM	Error estándar del promedio (del inglés <i>Standard Error of the Mean</i> )
STING	Estimulador de genes de interferón (del inglés <i>Stimulator of interferon genes</i> )
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCR	Receptor de células T (del inglés <i>T Cell Receptor</i> )
Tfh	Linfocitos T foliculares colaboradores
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformador beta (del inglés <i>Transforming growth factor beta</i> )
Th	Linfocitos T cooperadores (del inglés <i>T helper lymphocytes</i> )
Th0	Linfocitos T cooperadores vírgenes (del inglés <i>naive helper T 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> )
TNFR	Receptor de TNF (del inglés <i>Receptor Tumour Necrosis Factor</i> )
TNF- $\alpha$	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	Transialidasa

TS-GI

Transialidasa del Grupo I

# RESUMEN

La ECh es una patología endémica en América Latina, descrita en el año 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas. Desde su descubrimiento, se han evaluado distintas estrategias vacunales que han abarcado desde parásitos muertos, atenuados, homogenados, proteínas purificadas, recombinantes, hasta vacunas a ácidos nucleicos y diversos sistemas de delivery. En general, las vías de administración más utilizadas han sido las parenterales, mientras que las vías mucosales han sido evaluadas en menor medida. Independientemente del antígeno, adyuvante y vía de administración utilizada, hasta el momento, los estudios preclínicos han arrojado resultados parcialmente satisfactorios, en términos de control de la parasitemia y prevención del daño tisular crónico. En parte, esto se debe a que en un inicio el diseño de la vacuna se enfocaba principalmente en el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, los cuales, a pesar de ser muy efectivos, solo eliminaban las formas circulantes de los parásitos. Las evidencias disponibles del rol fundamental que juegan los linfocitos T en la contención de la infección, hace que las nuevas estrategias vacunales intenten estimular también esta rama de la respuesta inmune adaptativa. Por otra parte, estudios más recientes han mostrado que la inducción de una respuesta inmunogénica a nivel de mucosas es capaz de generar paralelamente una respuesta sistémica, mientras que lo contrario no siempre ocurre.

La superfamilia de proteínas Transialidasa (TS) comprende ocho subgrupos. Las del Grupo I (TS-GI) han sido utilizadas en distintas estrategias vacunales experimentales con resultados alentadores. Sin embargo, estos estudios no son siempre comparables en términos de antigenicidad, inmunogenicidad y eficacia, debido al uso de diferentes TS-GI o sus fragmentos, la administración por diferentes vías, su formulación con distintos adyuvantes y/o el uso de distintas cepas murinas.

Teniendo en cuenta que *T. cruzi* infecta fundamentalmente a través de piel o de mucosas, y que una respuesta inmunogénica a este nivel otorgaría protección local y sistémica, en la primera etapa de este trabajo se propuso evaluar la inmunogenicidad y eficacia protectora de distintas formulaciones vacunales mucosales que contenían distintos fragmentos recombinantes derivados de las TS-GI y el adyuvante mucosal di-AMP-c. En los Capítulos 1 y 2 se presentan los resultados del análisis de la inmunogenicidad y eficacia protectora de dos TS-GI recombinantes que carecen del dominio SAPA (denominadas C-terminal y N-terminal) y adyuvadas con di-AMP-c. Ambas formulaciones vacunales, administradas por vía intranasal, indujeron niveles elevados de anticuerpos específicos en plasma y mucosas y una respuesta celular mediada por linfocitos T e IFN- $\gamma$ . Incluso mostraron buena eficacia protectora tras el desafío oral con *T. cruzi*, ya que lograron controlar la parasitemia y atenuar el daño tisular agudo. En el caso de la formulación que contenía el fragmento N-terminal, también atenuó la miocarditis crónica y disminuyó la frecuencia de alteraciones electrocardiográficas. Como una estrategia tendiente a incrementar el número de epitopos T y B presentes en el inmunógeno, también se empleó una formulación que contenía los dos fragmentos recombinantes mencionados anteriormente, adyuvados por di-AMP-c (Capítulo 3). Los ensayos de inmunogenicidad, mostraron que se requieren 3 dosis para generar una respuesta sistémica de anticuerpos específicos, mientras que con 2 dosis ya puede apreciarse la secreción de IgA (ya que el esquema de 3 dosis se había realizado de modo empírico y en base a modelos pre-clínicos similares). Por otra parte, verificamos el desarrollo de una respuesta T-específica con producción de IFN- $\gamma$  en los linfocitos del NALT. También mostramos por primera vez, que la administración de TS+di-AMP-c promueve a nivel del NALT un perfil mixto de citocinas Th1/Th17/Th2.

En una segunda etapa de la tesis se analizaron distintos aspectos de la variabilidad antigénica de las TS-GI. Sorprendentemente, la antigenicidad de las TS-GI entre los linajes de parásitos y su influencia en el desarrollo de vacunas no se ha analizado en profundidad. Mediante evaluaciones *in silico* se demostró que las secuencias reportadas comparten una identidad

del 92%, y además, que las regiones antigénicas T y B se conservan en la mayoría de las secuencias de las TS-GI o bien presentan sustituciones de aminoácidos que apenas pueden alterar la antigenicidad. Teniendo en cuenta que las TS-GI muestran una alta homología de secuencia entre especies, estos resultados asimismo indican que la utilización de una TS proveniente de una especie en particular, tiene altas chances de inducir una respuesta protectora adecuada contra cepas de otras especies.

En la literatura sobre vacunas se suele utilizar el término “*Transialidasa*” para referirse a diferentes proteínas de esta amplia superfamilia, aún cuando estos antígenos pueden pertenecer a diferentes subgrupos. Esto genera un cierto grado de confusión, dado que en muchos casos estas TS-GI comparten una identidad de secuencia baja o nula. Por este motivo, se realizó un análisis *in silico* adicional de los fragmentos de TS-GI probados en las vacunas experimentales para determinar su grado de cobertura e identidad. Los resultados indicaron que la identidad de las secuencias vacunales es alta, pero la cobertura de los segmentos utilizados varía ampliamente. En consecuencia, esto señaló que los epítomos T restringidos por MHC-I y II, y los epítomos B están representados de manera diferente entre las vacunas.

También se llevaron a cabo predicciones de cobertura poblacional. Curiosamente, las predicciones con respecto a la cobertura poblacional mundial y de América del Sur estimadas en las secuencias indexadas y en las vacunas es elevada. Las predicciones incluso indican que varios epítomos T fuertes son compartidos por supertipos HLA-I humanos y haplotipos H-2K murinos, lo que sugiere que debido a su potencial inmunogénico podrían utilizarse para mejorar y facilitar el desarrollo de nuevas vacunas basadas en TS-GI. Para fortalecer tales hallazgos, se realizaron predicciones de acoplamiento molecular que comprobaron que una fuerza de unión similar de tales epítomos entre supertipos HLA-I y haplotipos H-2K. En base a estos resultados se plantean diferentes estrategias que cubrirán más o eventualmente completamente estos epítomos T y B para alcanzar un alto nivel de cobertura poblacional.

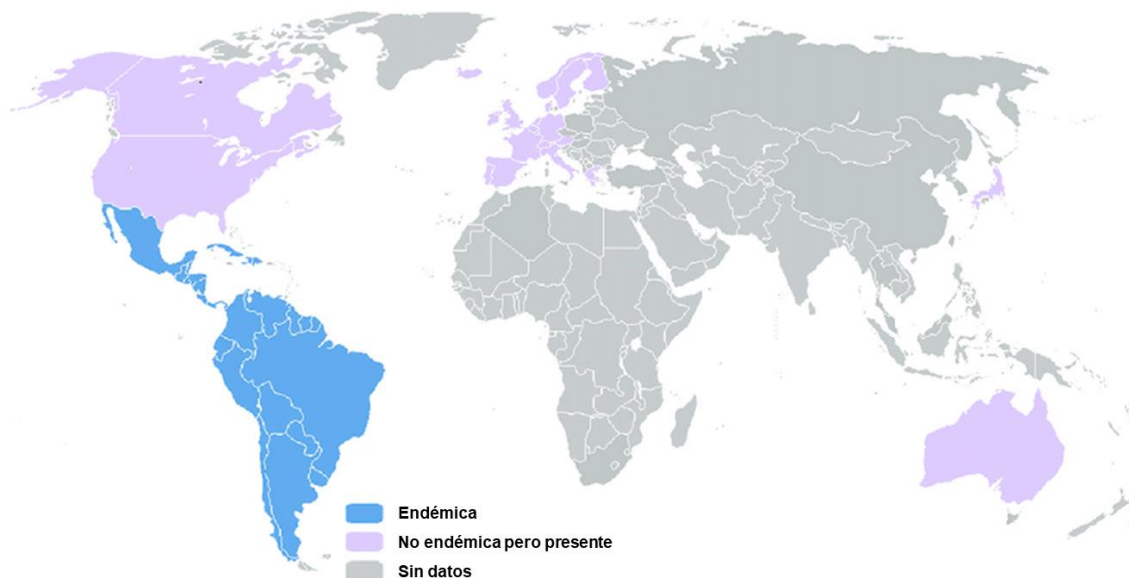
En conclusión, este trabajo de tesis proporciona nuevos datos sobre el potencial inmunogénico y antigénico de las TS-GI como candidatos vacunales.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades sobre la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas (ECh), también llamada Tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria crónica, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). En 1909 el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), fue el primero en, no sólo describir la enfermedad, sino también identificar al agente causal y su vector (Coura and Borges-Pereira, 2010).

Actualmente, la ECh constituye un grave problema de salud pública en Latinoamérica, en donde afecta aproximadamente de 6 a 7 millones de personas y causa aproximadamente 14.000 muertes por año. Por otra parte, aunque tradicionalmente era una enfermedad confinada a América Latina (Fig. 1), la ECh ha comenzado a manifestarse como un problema de salud pública en los Estados Unidos y también en varios países europeos y asiáticos debido a la creciente inmigración desde zonas endémicas (“Chagas disease” 2021).



**Figura 1: Distribución global de la Enfermedad de Chagas.** Adaptado de Sangenito LS. et al 2020 (Sangenito et al., 2020).

Según la Organización Mundial de la Salud, la ECh está clasificada como una de las más relevantes dentro de las enfermedades tropicales desatendidas. Además, es la enfermedad parasitaria más importante y la tercera enfermedad infecciosa más prevalente en América Latina, siendo considerada no sólo un importante problema de salud pública, sino también socioeconómico por diversas organizaciones internacionales y nacionales. Los motivos de la desatención son complejos, pero se evidencian antes estimaciones que indican que menos del 10% de las personas infectadas son diagnosticadas, y menos del 1% de las infectadas son tratadas, mientras que por otra parte los medicamentos disponibles no son totalmente eficaces (Martín-Escolano et al., 2020).

Si bien tanto la prevalencia como la morbilidad de la ECh disminuyeron durante la década del '80, aún representa un riesgo para aproximadamente un cuarto de la población de América Latina. En Argentina, más de 1,5 millones de personas viven con esta enfermedad, según un informe publicado por la Asociación Civil por la Igualdad y la Justicia y otras organizaciones. Asimismo, nuestro país es el que presenta mayor número de casos del continente, seguido por Brasil, con 1.156.821; y México, con 876.458 casos. Asimismo, dos de cada tres personas afectadas viven en áreas urbanas y cada año nacen 1.500 niños con la ECh. De ellos, sólo el 30% tiene acceso al diagnóstico y, por tanto, a la posibilidad de recibir el tratamiento correspondiente (Sano, 2020).

Es importante destacar que, en abril de 2022, en Argentina, se aprobó la reglamentación de la ley 26.281, en conformidad con la estrategia de manejo integrado de vectores, y desde una perspectiva transversal de derechos humanos, género e interculturalidad. Esta ley representa una declaración de interés prioritario y nacional de la política de respuesta a la ECh desde una visión estratégica de Atención Primaria de la Salud. La adopción de un enfoque transversal de derechos humanos implica que todas las políticas e instituciones que promuevan estrategias de salud vinculadas a la respuesta sociosanitaria de la ECh y/o la determinación social de los procesos de salud-enfermedad, atención-autoatención y cuidados

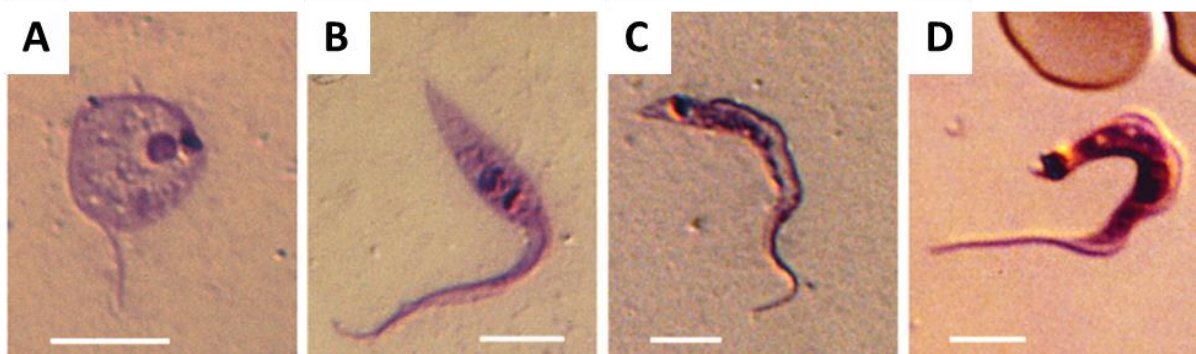
vinculados a esta infección, se asientan explícitamente en la Carta de Derechos de Chagas (“Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación”, 2020).

## 1.2 Agente Etiológico: *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo perteneciente a la familia Trypanosomatidae y al orden Kinetoplastida. Los microorganismos de este orden se caracterizan por la presencia de una estructura denominada cinetoplasto, que contiene alrededor del 20% del ADN total distribuido en maxi y minicírculos, y un flagelo que se extiende desde el extremo anterior del parásito. El flagelo, bien desarrollado en los estadios extracelulares, crece en las proximidades del cinetoplasto y emerge a través de la bolsa flagelar con una ubicación en relación al núcleo que difiere según el estadio parasitario (amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes). En condiciones naturales este parásito cumple un ciclo de vida que requiere de dos hospedadores para completarlo: los mamíferos son hospedadores definitivos y los insectos triatomínicos intermediarios (E Olaf Weber, 2019).

*T. cruzi* tiene diferentes formas evolutivas, identificadas morfológicamente por microscopía óptica como se muestra en la Fig. 2. El estadio amastigote es la forma intracelular, que se encuentra en los tejidos del huésped vertebrado. Carece de flagelo exterior y membrana ondulante -debido a esto, su movimiento es solo por rotación- y mide aproximadamente 4,0  $\mu\text{m}$  (entre 2,0 y 6,5  $\mu\text{m}$ ) de diámetro. El estadio epimastigote se encuentra solo en el tracto digestivo de los triatomínicos. Presenta un flagelo libre, el cinetoplasto en posición anterior al núcleo y una membrana ondulante poco desarrollada que mide entre 20 y 40  $\mu\text{m}$ , incluido el flagelo libre. El nucléolo es esférico, ocupando generalmente una posición central en el núcleo. Es bastante móvil, presenta una actividad replicativa intensa por división binaria longitudinal. El estadio tripomastigote no posee capacidad replicativa y corresponde a la forma infectiva extracelular en los mamíferos (conocido también como tripomastigote sanguíneo). En los hospederos invertebrados recibe el nombre de tripomastigote metacíclico, y es la forma infectiva que el vector presenta en las heces. Morfológicamente, los

tripomastigotes metacíclicos se asemejan a las formas delgadas de los tripomastigotes sanguíneos, y miden aproximadamente 17  $\mu\text{m}$ . El tripomastigote sanguíneo se observa en la sangre y otros fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo y la linfa, de los hospedadores vertebrados. Ambas formas presentan un núcleo grande y central y un cinetoplasto de alta densidad de ADN en posición terminal posterior. El flagelo es más corto que el que muestran los epimastigotes, y emerge del corpúsculo basal cerca del cinetoplasto, y la membrana ondulante suele ser estrecha (Vianna Martins et al., 2012).



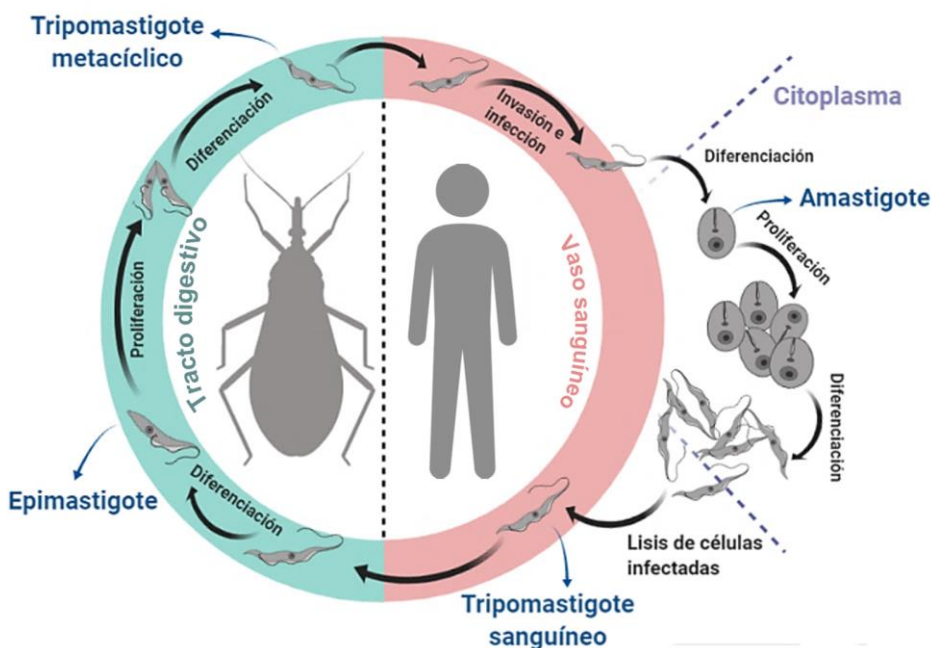
**Figura 2. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. Diferentes estadios o formas en los que puede observarse al parásito: (A) Amastigote; (B) Epimastigote; (C) Tripomastigote sanguíneo; (D) Tripomastigote metacíclico. Adaptado de Schaub et al. 2011 (Schaub et al., 2011).**

### 1.3 Ciclo de Vida

*T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo, en donde alterna entre un insecto vector hematófago perteneciente a la subfamilia Triatominae (Hemiptera y Reduviidae) y un hospedador mamífero. Este parásito puede infectar no solo a los seres humanos, sino a más de 150 especies de mamíferos, incluyendo animales domésticos (perros, gatos y cobayos, por ejemplo) y mamíferos salvajes (roedores, marsupiales y armadillos, entre otros). Por otra parte, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son las tres especies de vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre. Históricamente, *Triatoma infestans* se considera uno de los vectores más importantes en América del Sur. *R. prolixus*

se localiza típicamente en el norte de América del Sur y América Central, mientras que *T. dimidiata* ocupa un área similar, extendiéndose hacia México (Rassi et al., 2010).

La Fig. 3 detalla el ciclo de vida de *T. cruzi*. Este comienza cuando el insecto pica a un vertebrado infectado e ingiere sangre conteniendo tripomastigotes circulantes o sanguíneos. Una vez dentro del tubo digestivo del insecto, los parásitos se diferencian en epimastigotes y se multiplican por división binaria. Los epimastigotes migran por el tracto digestivo y, en el recto, se adhieren a la cutícula y se diferencian hacia la forma tripomastigote metacíclico. Estos se liberan con las heces cuando el insecto ingiere sangre. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan al mamífero a través de las mucosas o bien a través de heridas en la piel. Una vez que un tripomastigote penetra en una célula, se diferencia en amastigote, que es capaz de proliferar por división binaria y, posteriormente, diferenciarse en tripomastigote sanguíneo. Esta forma se libera por ruptura celular y puede infectar células cercanas, migrar a través del torrente sanguíneo para invadir tejidos distantes o ser ingerida nuevamente por un vector, cerrando así el ciclo de vida (CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2009) (Fig. 3).



**Figura 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** En el esquema se ilustra el ciclo de vida de *T. cruzi*, que incluye su estadio en el insecto triatomino y en los mamíferos (seres humanos). A lo largo del mismo se detallan las diferentes formas biológicas de este patógeno: epimastigote, tripomastigote metacíclico (triatomino), amastigote y tripomastigote sanguíneo (mamífero). Adaptado de Acevedo et al. 2018 (Acevedo et al., 2018).

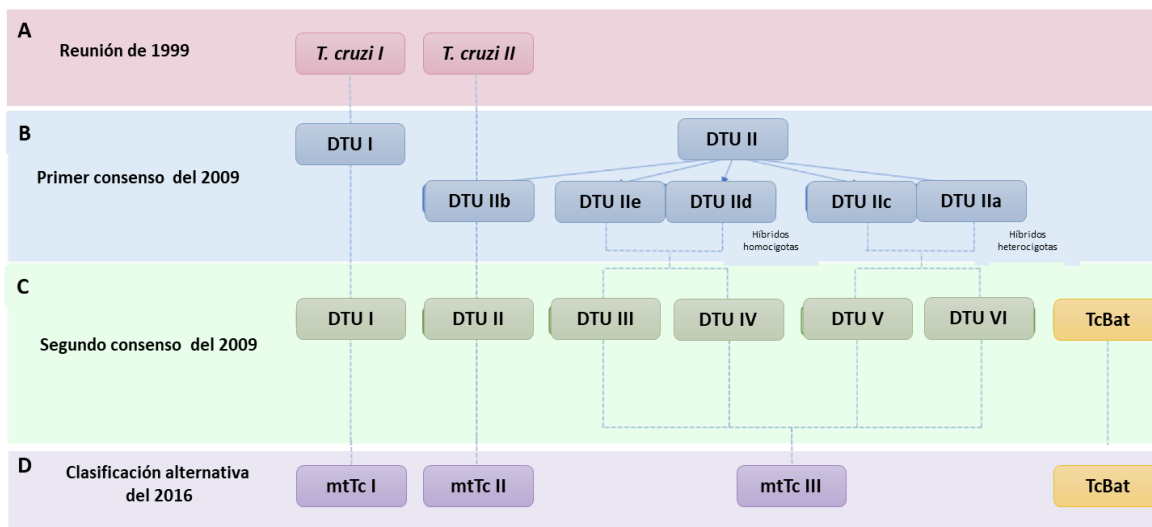
Asimismo, se puede distinguir entre un ciclo de vida doméstico y otro salvaje. El ciclo de vida doméstico de *T. cruzi* ocurre entre el hombre y/o los animales domésticos (como perros, gatos, roedores) y los insectos con hábitos domiciliarios (como *Triatoma infestans*). Este ciclo se desarrolla en áreas endémicas en el contexto de viviendas precarias. En estas casas los vectores se pueden encontrar en huecos, irregularidades en las paredes y techos según el material utilizado (paja, madera) o se ubican detrás de cuadros y muebles. Los perros son reservorios ideales para el mantenimiento del ciclo ya que, en general, presentan alta parasitemia y cohabitan con el hombre y los insectos dentro de los domicilios (Enriquez et al., 2014; Ramírez et al., 2013b). El peridomicilio, el espacio próximo a la casa que utiliza el hombre para realizar sus actividades, puede funcionar como puente entre el ciclo doméstico y el salvaje.

El ciclo primario de *T. cruzi* es precisamente el salvaje, siendo la infección humana muy reciente en una escala evolutiva. En este ciclo los hospederos definitivos son animales salvajes como marsupiales, roedores, zorros, murciélagos o monos, entre otros. Los vectores están adaptados para vivir en nidos de pájaros, madrigueras de comadrejas y roedores, cuevas de murciélagos, huecos de árboles, etc (Gurgel-Gonçalves et al., 2012).

#### 1.4 Diversidad genética de *Trypanosoma cruzi*

Hay muchas cepas genéticamente diferentes de *T. cruzi* (Brenière et al., 2016; Zingales et al., 2009). A lo largo de varias décadas, se han propuesto distintos métodos para clasificar a las distintas cepas de *T. cruzi*, de acuerdo con sus diferencias biológicas y/o genómicas. En 1999, se estableció una clasificación en donde se las cepas se dividieron en dos subgrupos principales denominados *T. cruzi I* y *T. cruzi II* (Fig. 4A). Esta clasificación se propuso considerando características biológicas, bioquímicas y enfoques moleculares como los estudios de mini-exón y la secuencia de ADN ribosomal 24S. Diez años más tarde, se revelaron seis unidades discretas de tipificación (conocidas por su sigla en inglés como

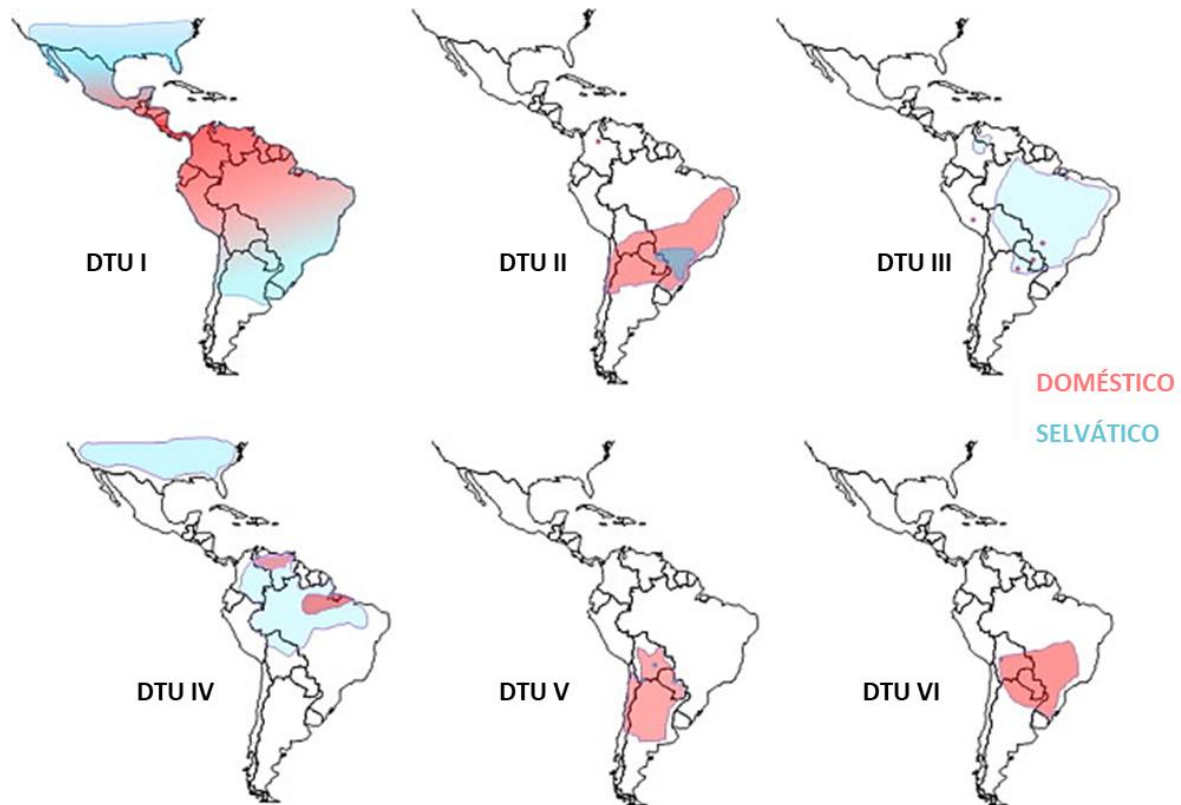
“DTUs”) (Zingales et al., 2009), que a su vez se clasificaron en dos subdivisiones principales denominadas DTU I y DTU II. Las DTUs se definen como “conjuntos de poblaciones que están genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra población y que son identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes” (Tibayrenc, 1998). Además, según la información filogenética de la electroforesis enzimática multilocus y los marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar, la DTU II se subdividió en cinco DTUs adicionales (IIa-e) (Brisse et al., 2000a, 2000b), mientras que las DTU I y DTU IIb (Fig. 4B) corresponden, respectivamente, a los grupos de *T. cruzi I* y *T. cruzi II* recomendados por el comité original en 1999. Esta nueva clasificación consideró que las DTU I y DTU IIb eran las cepas ancestrales, las DTU IIc y DTU IIe eran los productos de un mínimo de dos eventos de hibridación (de Freitas et al., 2006; Tomazi et al., 2009; Westenberger et al., 2005) y las DTU IIa y DTU IIc como híbridos ancestrales. Sin embargo, una segunda revisión ese mismo año (2009) propuso una clasificación final basada en seis DTUs (Zingales et al., 2009). De esta forma, las cepas ancestrales fueron denominadas DTU I y II, las cepas con al menos un evento de recombinación entre las DTU I y II (híbridos homocigóticos) corresponden a las DTU III-IV, y los híbridos heterocigóticos de las DTU IIc y IIa corresponden a los DTU-V y VI (Fig. 4C). Una nueva cepa detectada en murciélagos también se incluyó en la clasificación como TcBat (Marcili et al., 2009) y en base a estudios posteriores basados en diversos marcadores moleculares, se la consideró como la séptima DTU (Lima et al., 2015). Finalmente, en 2016, Barnabé y col (Barnabé et al., 2016) cuestionaron la validez de esta clasificación y propusieron una nueva agregación considerando la expresión de tres genes, dos mitocondriales y uno nuclear. Esta nueva clasificación estableció tres grupos, los ancestrales mtTcI y mtTcII, y los que agrupaban todas las cepas híbridas, mtTcIII, e incluyeron el TcBat como una cepa independiente, aunque filogenéticamente relacionado con el mtTcI (Fig. 4D).



**Figura 4. Diferentes clasificaciones de *Trypanosoma cruzi* desde 1999. A) Clasificación de la reunión de 1999, B) Primer consenso del 2009, C) Segundo consenso del 2009, D) Clasificación alternativa propuesta en 2016. Adaptado de Herreros-Cabello et al 2020.(Herreros-Cabello et al., 2020).**

Las distintas DTUs de *T. cruzi* se encuentran ampliamente distribuidas en el continente americano en diversos ecotopos (ciclos de transmisión doméstico, peridoméstico y selvático). Como se puede observar en la Fig. 5, DTU I predomina desde el sur de América del Norte hasta el norte de Argentina y Chile, y está generalmente asociada a un ciclo de transmisión selvática. Sin embargo, DTU I suele provocar la enfermedad en humanos debido a un ciclo de transmisión doméstico. Por el contrario, las DTU II, DTU V y DTU VI se presentan principalmente en el cono sur. DTU III y DTU IV generalmente se caracterizan por sus ciclos de transmisión selvática en áreas con ecosistemas de bosques tropicales (Brenière et al., 2016; Carrasco et al., 2012; Ramírez et al., 2013a). Esto es particularmente relevante dado que existen claras diferencias clínicas entre los pacientes que presentan la ECh en estas regiones geográficas. Las cepas parecen diferir en términos de patogenicidad y respuesta al tratamiento. Tanto DTU I como DTU VI están asociadas con lesiones cardíacas en infecciones humanas, pero al parecer solo DTU II, DTU V y DTU IV están asociadas con lesiones del tracto digestivo (Prata, 2001), a pesar de un informe de lesiones del tracto digestivo en Colombia causadas por DTU I (Prata, 2001). La DTU I se considera menos

patogénica (Burgos et al., 2007), ya que causaría más casos crónicos sin patología aparente en comparación con los casos causados por DTU II, DTU V y DTU VI en Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay (Luquetti et al., 2015).



**Figura 5: Distribución geográfica aproximada de las DTU de *T. cruzi* en los ciclos de transmisión doméstico y selvático. Adaptado de Zingales et al 2012 (Zingales et al., 2009).**

### 1.5 Formas de transmisión

El principal mecanismo de transmisión de la ECh en áreas endémicas está mediado por vectores triatominos, ya que el 85% de los casos reportados se producen por esta vía. En Argentina, actualmente, se considera que existen 16 especies de triatominos, donde *Triatoma infestans* es el único triatomo domiciliado, por lo tanto, el único con importancia epidemiológica (Rassi et al., 2010).

La transmisión materno-fetal, congénita o vertical, es otra vía natural de infección. El riesgo de transmisión congénita varía según la cepa infectiva de *T. cruzi*, el grado de parasitemia de la madre y la existencia o no de daño placentario (Kemmerling et al., 2019). En nuestro país la tasa de transmisión de *T. cruzi* por esta vía es de un 6% y se estima que nacen alrededor de 9.000 bebés infectados con este parásito por año en Latinoamérica (Carlier and Truyens, 2015).

Otro tipo de transmisión que ha cobrado relevancia en los últimos años es la infección causada por vía oral. Esta se produce principalmente por el consumo de bebidas a base de frutas, agua o vegetales u otros alimentos contaminados con heces de triatominos o secreciones de mamíferos infectados. En países como Brasil, Colombia, Venezuela, Perú y Bolivia, e incluso Argentina, se ha reportado la transmisión por esta vía debido al consumo de carne de animales infectados mal cocidos, o por la ingestión de sangre proveniente de algunos mamíferos reservorios del parásito (Coura, 2006; Rueda et al., 2014). Esta vía de infección suele causar brotes en áreas desprovistas de vectores domiciliarios. La infección oral suele tener una presentación clínica aguda más grave que la vectorial y una mayor tasa de mortalidad que esta última durante el período agudo (Filigheddu et al., 2017; Pereira et al., 2009).

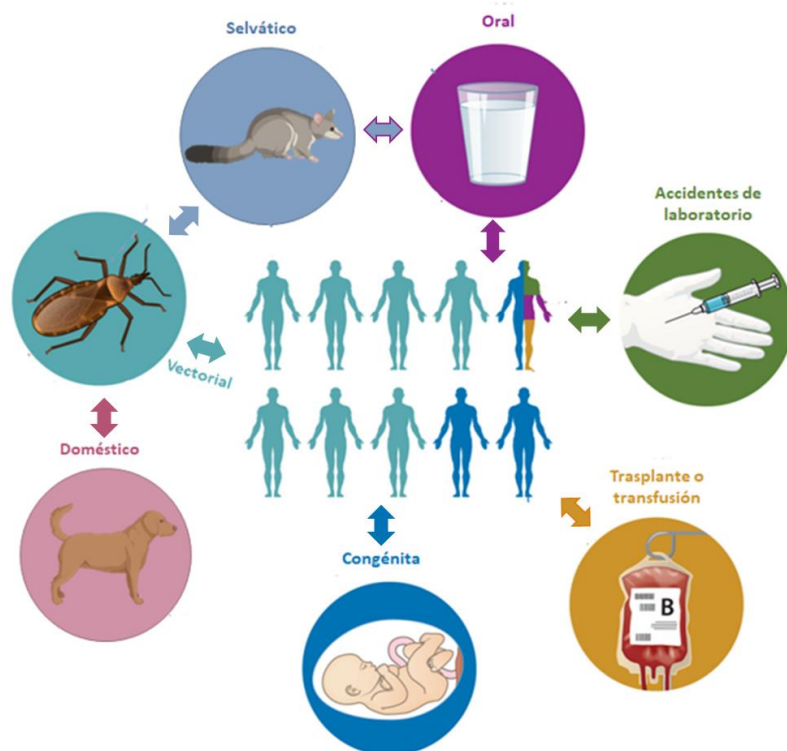
Así mismo, la transmisión de esta enfermedad por vía sexual es aún materia de debate. La transmisión sexual ha sido reportada en experimentos *in vivo* con ratones y se ha informado la presencia de ADN del parásito en el espermatozoides de individuos infectados (Araujo et al., 2017), sin embargo no existe evidencia concluyente en seres humanos.

Debido al constante movimiento migratorio de personas desde países endémicos a países no endémicos, la ECh causada por transfusión de sangre y trasplante de órganos infectados representan también importantes mecanismos de transmisión (Velasco et al., 2020). Actualmente, la transmisión por transfusión ha disminuido drásticamente, ya que en todos los países latinoamericanos, así como también en algunos estados de Estados Unidos y en

varios países europeos, se realiza el tamizaje en bancos de sangre para detectar la presencia de *T. cruzi* en los donantes (Ries et al., 2016). En cuanto a los casos producidos por trasplante, se han reportado tras el trasplante órganos tales como corazón, páncreas, riñón, hígado o médula ósea y se han notificado casos en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela, así como también en Estados Unidos y España (Guhl, 2009; Pierrotti et al., 2018).

Por último, la transmisión por accidentes de laboratorio puede ocurrir por mala o nula implementación de medidas de bioseguridad al realizar procedimientos en laboratorios clínicos y experimentales. Se ha reportado infección conjuntival causada por aerosoles producidos por la manipulación de muestras contaminadas, manejo de animales infectados y/o punción accidental con agujas infectadas. El riesgo medio de transmisión por exposición ocupacional es inferior al 1% (Bonney et al., 2019)

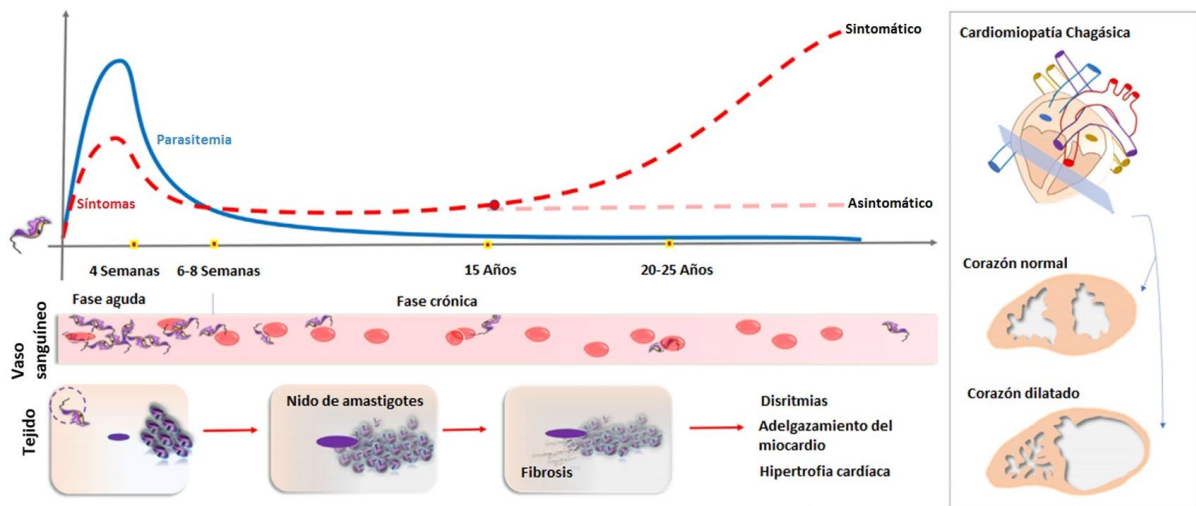
Las diversas formas de trasmisión del parásito se esquematizan en la Fig. 6.



**Figura 6: Formas de transmisión de la enfermedad de Chagas.** Adaptado de Bonney et al 2019 (Bonney et al., 2019).

## 1.6 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas

La ECh es una afección hemática y tisular, que afecta al ser humano de diversas maneras, particularmente al corazón y a órganos del sistema digestivo. Durante el curso clínico de la enfermedad se pueden distinguir dos fases: aguda y crónica, ambas con sintomatologías variadas y de distinta gravedad (Fig.7).



**Figura 7: Curso clínico de la Enfermedad de Chagas.** Adaptado de De Bona et al 2018 (De Bona et al., 2018).

La fase aguda comienza luego de la primoinfección y se caracteriza por la presencia del parásito en sangre. Esta fase suele durar en seres humanos alrededor de 3 meses, periodo en el cual la parasitemia puede ser detectable por métodos directos.

La fase aguda de la enfermedad vectorial se caracteriza por ser -en la mayoría de los casos- asintomática. Sólo del 5 al 10% de los individuos infectados desarrollan síntomas, generalmente inespecíficos como fiebre, astenia y cefalea y suele cursar con hepato y esplenomegalia. Los signos patognomónicos más frecuentes son el signo de Romaña, caracterizado por edema periorbital y palpebral unilateral y el chagoma cutáneo indurado, los que suelen ir acompañados de adenomegalia regional. Según algunos reportes, estos signos suelen ser más frecuentes en pacientes sintomáticos (Salazar-Schettino et al., 2016).

En varios brotes de ECh oral (Colombia, Brasil y Venezuela) (de Noya and González, 2015) se observó que la sintomatología predominante en fase aguda es similar a la vectorial, pero con un mayor grado de afección cardíaca. Las manifestaciones cardiológicas frecuentes resultan en dolor torácico, palpitations y disnea, que son motivos de hospitalización. La cardiomegalia y la insuficiencia cardíaca pueden ocurrir como resultado de una arritmia severa o una obstrucción cardíaca debido a un derrame pericárdico que lleva al paciente a un desenlace fatal (de Noya and González, 2015). Se considera que la gravedad de los síntomas y la mortalidad dependen del tiempo entre el inicio de los síntomas, el diagnóstico confirmado y la administración del tratamiento. El curso más rápido y severo que suele observarse tras este tipo de infección, probablemente se deba a un mayor tamaño del inóculo al que se enfrenta el sistema inmunológico del paciente y también a una mayor eficacia de los parásitos para penetrar la mucosa gástrica y acceder a la circulación sistémica (de Noya and González, 2015).

La fase crónica de la enfermedad comienza cuando las parasitemias se hacen prácticamente indetectables por métodos directos. Esta fase se subclasifica en dos fases: una comúnmente conocida como indeterminada, y en una fase sintomática.

La fase indeterminada se caracteriza por ser clínicamente asintomática y presentar un electrocardiograma (ECG) y radiografía de corazón y vísceras normal. En esta etapa, el método de elección para el diagnóstico es serológico, y la confirmación requiere al menos de dos pruebas positivas con principios diferentes (Carod-Artal and Gascon, 2010). Sin embargo, dado que actualmente se disponen de métodos de diagnóstico más sensibles que décadas atrás (por ejemplo, ecocardiografía, resonancia magnética y esófago manometría), es posible diagnosticar en estos pacientes asintomáticos sutiles anomalías cardíacas o digestivas, lo cual obliga a re-clasificarlos. Por esta razón, hoy se tiende a nombrar a la fase indeterminada como “fase crónica sin patología demostrada”.

Los individuos infectados pueden permanecer asintomáticos o sin patología demostrada toda su vida. Sin embargo, luego de un período variable de 10 a 30 años, entre un 30 a 40% de los individuos infectados desarrollan una afectación cardíaca que recibe el nombre de miocarditis chagásica crónica (MCC), en menor medida, megavisceras (megaesófago y megacolon) (Carod-Artal and Gascon, 2010).

La MCC es la manifestación más grave y frecuente de la ECh crónica, lo que podría deberse al particular tropismo que el *T. cruzi* suele mostrar por los miocardiocitos (Fernandes and Andrews, 2012). La mayoría de los individuos con ECh crónica, presentan corazones que suelen estar aumentados de tamaño (“*core bovis*”). Incluso, se presenta un adelgazamiento inusual de la pared ventricular, que se abulta en forma de aneurisma, en donde la evaluación microscópica de estas áreas muestra una atrofia dramática, con la pérdida de fibras miocárdicas y reemplazo por tejido cicatricial fibroso denso, como también grasa entre el endocardio y el epicardio (Bonney et al., 2019). Este tipo de manifestación, conduce a anomalías del sistema de conducción, bradiarritmias y taquiarritmias, aneurismas apicales, insuficiencia cardíaca, tromboembolismo y muerte súbita. Las anomalías en el ECG más comunes son bloqueo de rama derecha, el bloqueo fascicular anterior izquierdo, los latidos ventriculares prematuros, los cambios ST-T, las Q anormales y el bajo voltaje de QRS. La combinación de bloqueo de rama derecha y bloqueo fascicular anterior izquierdo es muy típica en la MCC (Marin Neto et al., 1999; Rassi et al., 2010, 2000).

La fibrosis del tejido cardíaco se produce por un aumento gradual y significativo en el volumen de colágeno y el tejido cicatricial resultante afecta la función cardíaca (Salazar-Schettino et al., 2016). Los fibroblastos son los responsables de este proceso, como un mecanismo de respuesta al daño agudo o crónico. La remodelación por fibrosis conduce a cambios en el tamaño, la forma y la función cardíaca, y se asocia clínicamente con un mal pronóstico en pacientes con insuficiencia cardíaca (De Alba-Alvarado et al., 2020; Fan et al., 2012). La fibrosis del tejido cardíaco se acompaña de infiltrados inflamatorios celulares caracterizados por la presencia de macrófagos, polimorfonucleares, y eventualmente linfocitos durante la

fase aguda, y de infiltrados predominantemente linfocitarios en la fase crónica (Marino et al., 2003; Talvani et al., 2000).

## 1.7 Patogénesis de la Enfermedad de Chagas

Es importante destacar que el resultado de esta parasitosis está determinado por una interacción muy compleja entre la cepa de *T. cruzi* y la susceptibilidad genética del individuo, es decir que la combinación parásito-hospedero puede condicionar tanto la virulencia del parásito como la susceptibilidad del hospedero mamífero (Storino, 1994). Por otra parte, la respuesta inmunitaria (ya sea innata o adaptativa), puede contribuir al daño cardíaco y aumentar el riesgo de insuficiencia cardíaca mediante la inducción de inflamación sostenida, fibrosis y lesión por estrés oxidativo, lo que conduce a la interrupción de las miofibrillas, la necrosis de los miocitos, la disfunción microvascular, la disfunción autonómica, como así también a la hipertrofia y fibrosis cardíaca (Fig. 8).

Se han postulado varias teorías patogénicas para explicar el desarrollo de la MCC, tales como la agresión miocárdica causada por la persistencia parasitaria, el daño miocárdico causado por el propio sistema inmune, trastornos microvasculares y trastornos del sistema nervioso autónomo, sin ser entre ellos mutuamente excluyentes. Décadas atrás, prevaleció la teoría autoinmune, sin embargo, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular y la demostración que el parásito podría persistir durante años en el tejido del hospedero, la teoría de la persistencia ganó más aceptación (Bonney et al., 2019; Gironès and Fresno, 2003; Marin-Neto et al., 2007; Teixeira et al., 2011).

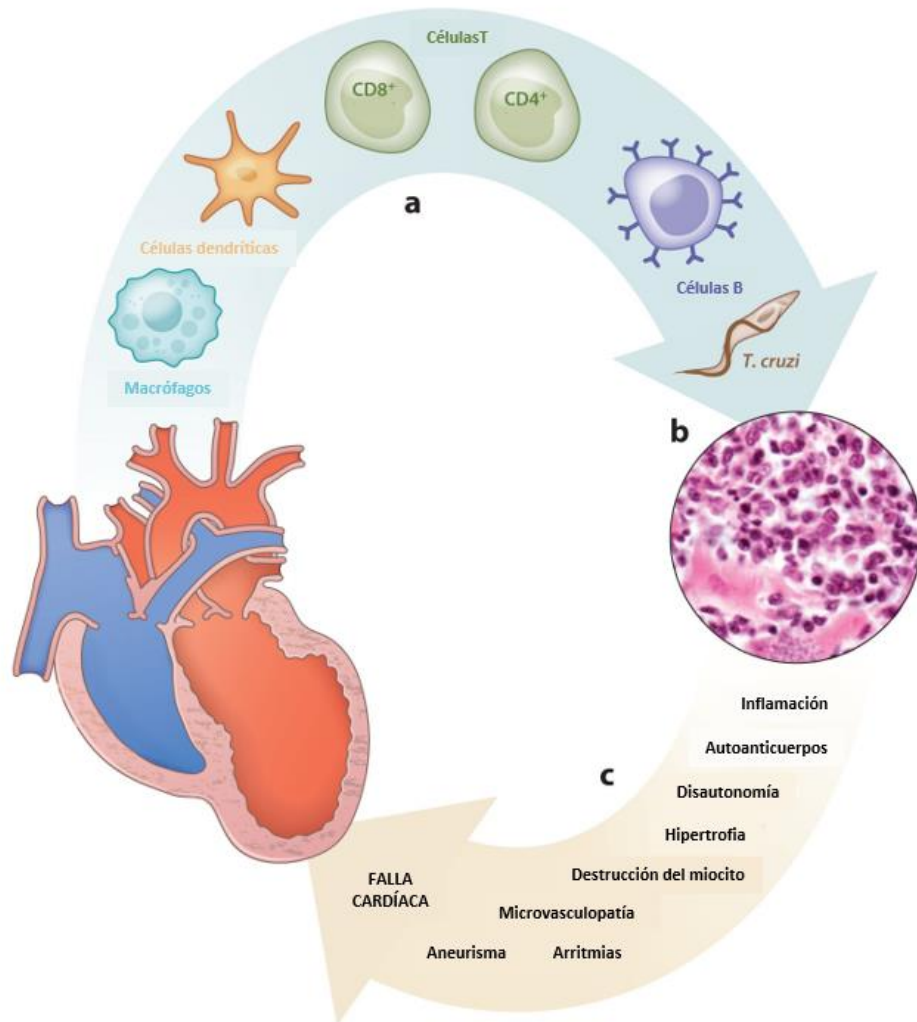
Los procesos o eventos de daño autoinmune pueden originarse a través de mecanismos tales como la lisis de miocardiocitos donde se exponen antígenos con mimetismo molecular entre el parásito y el hospedero, la liberación y presentación de autoantígenos, la activación de células T sin señalización de citocinas coestimuladoras, y finalmente por citotoxicidad celular

dependiente de auto-anticuerpos (De Bona et al., 2018). En relación a la existencia de mimetismo molecular, se ha demostrado por ejemplo, que se generan linfocitos T CD4+ y CD8+ reconocen simultáneamente la miosina cardíaca y la proteína B13 del parásito (Cunha-Neto et al., 1996). También se han detectado auto-anticuerpos que afectarían la funcionalidad cardíaca, como los dirigidos contra los receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos o M2 muscarínicos (Wallukat et al., 2022).

Por otra parte, la presencia y replicación por fisión binaria de amastigotes intracelulares que han permanecido en forma latente en el miocardio o en otros tejidos, en caso de diferenciarse a tripomastigotes, pueden provocar la consiguiente lisis celular, con liberación de componentes celulares, inflamación y finalmente la destrucción del tejido cardíaco (Zhang and Tarleton, 1999).

Asimismo, en la lesión miocárdica suelen aparecer anomalías microvasculares provocadas, al menos en parte, por el aumento de endotelina debido a la inflamación. Paralelamente, los tripomastigotes sanguíneos producen neuraminidasa. Ambos factores aumentan la adhesividad de las plaquetas y la formación de trombos, lo que conllevaría al desarrollo de isquemia miocárdica y microinfartos, que a su vez provocan necrosis tisular (Teixeira et al., 2006).

Por último, e independientemente del mecanismo fisiopatológico, las evidencias indicarían que la persistencia de inflamación crónica y/o desregulación de la respuesta inmunitaria durante la fase crónica, se asocian a la severidad de la patología cardíaca (Cardoni et al., 1999; Pérez et al., 2011).



**Figura 8: Patogénesis de la Miocardiopatía chagásica.** A) Las células inflamatorias y los parásitos pueden infiltrar e invadir el miocardio. Esto lleva al desarrollo de: B) Miocarditis, caracterizada por la presencia de infiltrados linfomonocitarios, edema, destrucción de miocitos y fibrosis C) Mecanismos postulados que pueden conducir a la disfunción cardíaca que progresa a insuficiencia cardíaca durante la infección por *T. cruzi*. Adaptado de Bonney et al 2019 (Bonney et al., 2019).

## 1.8 Prevención y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas

Debido a que no se dispone de una vacuna que prevenga la ECh, el foco de la prevención primaria se ha basado tanto en el control vectorial como en el control de la transmisión por mecanismos no vectoriales. En este sentido, se ha logrado una disminución sustancial de los casos de ECh mediante la aplicación continua de insecticidas con acción residual en el peridomicilio de las viviendas de áreas endémicas, con el control de embarazadas y la

detección obligatoria de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los donantes de sangre. Aunque estas medidas han logrado un avance en la interrupción de la transmisión de la ECh, aún se requiere de estrategias más eficaces para disminuir aún más el número de nuevos casos y mejorar las tasas de detección de la misma, que en algunos países, según la Organización Panamericana de la Salud, ronda en torno al 10% y en algunos casos sólo alcanza el 1% (Coura and Dias, 2009; Rassi et al., 2009).

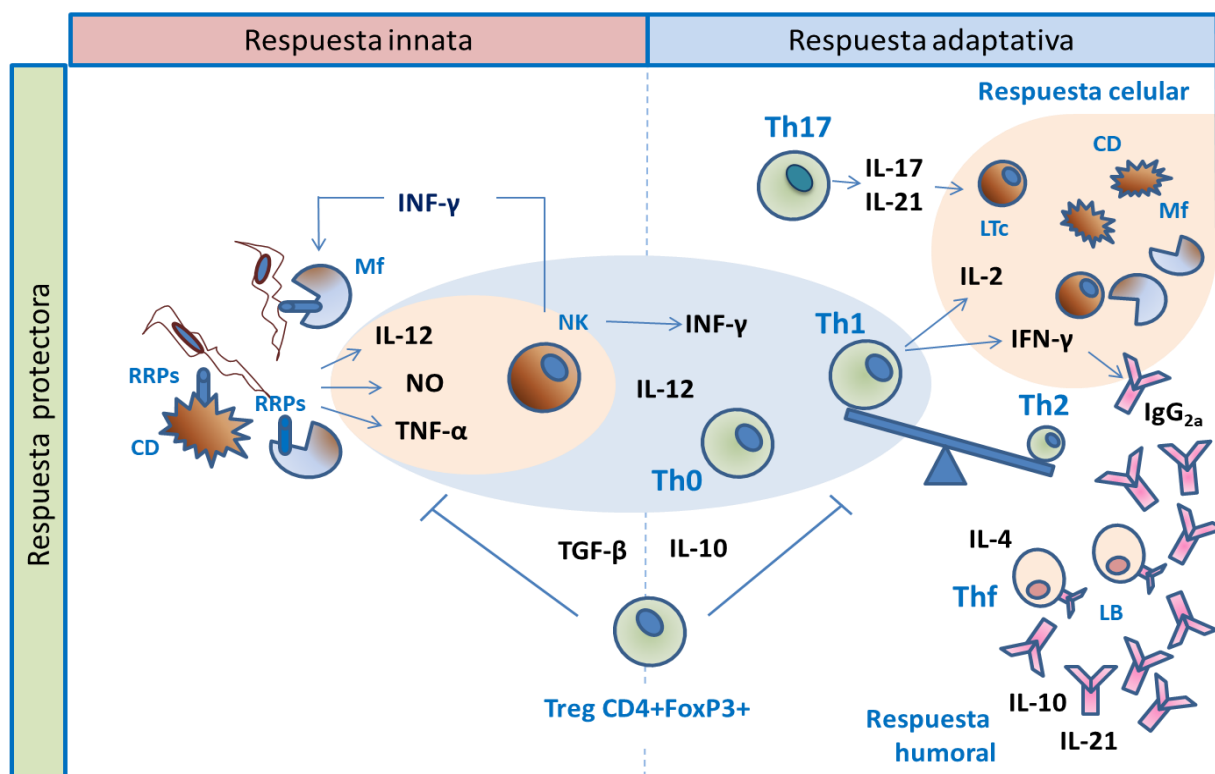
Actualmente, existen solo dos medicamentos recomendados para el tratamiento de la ECh: benznidazol (BNZ) y nifurtimox (NFX). El BNZ actúa sobre la cadena respiratoria del parásito, mientras que el NFX actúa mediante la generación de radicales libres y metabolitos reactivos. Cada droga se administra en distintas concentraciones, dependiendo si es para adultos o niños, y generalmente durante 60-90 días (Wilkinson et al., 2008). En los adultos, tanto BNZ como NFX presentan una alta tasa de efectos adversos. El BNZ suele ser el fármaco de elección para el tratamiento de la ECh aguda, dado que el tiempo de dosificación es más corto que el del NFX y los efectos colaterales son menores (de Andrade, 1996; Pinazo et al., 2010). En cuanto a la efectividad de estas drogas, el tratamiento con BNZ tiene una alta eficacia en niños con infección aguda, los que presentan una tasa de cura cercana al 100% (de Andrade, 1996). En pacientes adultos con infección aguda la efectividad baja al 70% o más (Rassi et al., 2000). Un ensayo clínico reciente demostró que el tratamiento etiológico en la fase crónica disminuye la carga parasitaria pero no previene la progresión de la miocardiopatía crónica severa (Morillo et al., 2015).

### 1.9 Respuesta inmune frente a *Trypanosoma cruzi*

El conocimiento sobre los mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia hacia el parásito ha avanzado considerablemente en los últimos años, si bien aún es insuficiente. Debido a que *T. cruzi* puede ingresar al organismo a través de diversas vías y establecerse en distintos tejidos, la eliminación del mismo depende de una amplia diversidad de

mecanismos inmunológicos efectores. Por tratarse de un parásito que exhibe tanto formas circulantes como intracelulares, el control de la infección requiere de la participación de distintas poblaciones de células inmunocompetentes, tales como macrófagos, células dendríticas (CD), células “*natural killer*” (NK), como así también de varias poblaciones de linfocitos T y de linfocitos B.

Los principales mecanismos que median la respuesta inmune innata y adaptativa protectora (brevemente esquematizados en la Fig. 8) se describen a continuación:



**Figura 9: Respuesta inmune protectora durante la infección con *Trypanosoma cruzi*.** Adaptado de Aportes al conocimiento al aporte al conocimiento de la Enfermedad de Chagas. Beloscar, Revelli y Pérez. 2013. Editorial Corpus. (Beloscar, 2013)

### 1.9.1 Inmunidad Innata

Tal como se describió previamente, cuando la vía de transmisión es vectorial u oral, los parásitos ingresan a través de la piel y las mucosas. Estos tejidos conforman las llamadas

barreras anatómicas de la inmunidad innata. En estas barreras, están presentes células fagocíticas como macrófagos y células dendríticas, pero también NK y poblaciones linfoides innatas como los linfocitos  $T\gamma\delta$  de las mucosas (Acevedo et al., 2018; de Pinho et al., 2014; Rezende-Oliveira et al., 2012).

Las células de la inmunidad innata son capaces de reconocer a través de los “receptores de reconocimiento de patrón” (PRR) distintos tipos de moléculas presentes en los patógenos, denominadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP). PRRs tales como los “Receptores Tipo Toll” (TLR) y los “Receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos” (NLR), han sido los más estudiados en el contexto de la infección por *T. cruzi*.

Los TLR de membrana o del compartimento lisosomal, tras el reconocimiento de su ligando específico, transmiten la señal a través de moléculas adaptadoras citosólicas (por ej. MyD88), para posteriormente inducir la activación de factores de transcripción nuclear (por ej. NF- $\kappa$ B), que llevan a la producción de citocinas pro-inflamatorias e interferones de tipo I. Los receptores de membrana TLR-2 y TLR-4, y los lisosomales TLR-7 y TLR-9 son fuertemente activados durante la infección por *T. cruzi* (Camargo et al., 1997; Ouaisi et al., 2002). Moléculas presentes en la superficie del parásito tales como el aquilacilglicerol y los lipofosfoglicanos son reconocidos por TLR-2, los glicoinositolfosfolípidos y glicosilfosfatidilinositoles son reconocidos por TLR-2/TLR-4, mientras que las moléculas de ARN parasitario son reconocidas por TLR-7 y el ADN genómico es reconocido por TLR-9 (Rodrigues et al., 2012). Estas moléculas estimulan fuertemente en los macrófagos y células dendríticas la síntesis de IL-12, TNF- $\alpha$ , especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). En particular, los macrófagos que se activan en un medio ambiente rico en IL-12 e IFN- $\gamma$  y son llamados “Macrófagos clásicamente activados” o “Macrófagos M1”, y desempeñan un papel fundamental en el control de la infección por *T. cruzi*. Recientemente, también se ha evidenciado que en macrófagos infectados, la IL-17 actúa de forma sinérgica con el IFN- $\gamma$ , incrementando la capacidad tripanocida de los mismos (Erdmann et al., 2013).

La importancia de las vías de reconocimiento mediadas por los TLR en el curso de la infección por *T. cruzi*, es evidente ante la carencia de TLR-4 o TLR-9 (por ejemplo, en ratones deficientes en estos receptores), que lleva a la disminución de la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$ , al incremento de la parasitemia y a un aumento en la letalidad (Bafica et al., 2006; Camargo et al., 1997; Oliveira et al., 2004; Ouaisi et al., 2002).

La activación de la vía mediada por NLR lleva a la formación del inflammasoma, un complejo multimérico que se ensambla en el citoplasma de la célula infectada en respuesta a moléculas del patógeno. Se ha demostrado que tras la infección por *T. cruzi*, se produce la activación del complejo inflammasoma-NLRP3/ASC/caspasa-1. El proceso finaliza con la liberación IL-1 $\beta$  y la muerte de la célula infectada por piroptosis (Zamboni and Lima-Junior, 2015). Ratones deficientes en NLR tipo-1 (NOD1) presentan un incremento en la letalidad que está asociada a un incremento en la carga parasitaria circulante y tisular. Sin embargo, la producción de citocinas como IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-10 no parece verse afectada en relación a los animales *wild type*, lo cual sugiere que podría existir una posible interacción entre las vías NLR y TLR durante la infección por *T. cruzi* (Silva et al., 2010).

También se ha demostrado que el DNA parasitario puede ser detectado por sensores intracitoplasmáticos como la “GMP-AMP sintasa cíclica” (cGAS) o PARP1, los que posteriormente inducen la síntesis de citocinas pro-inflamatorias mediada por NF- $\kappa$ B y por otros factores de transcripción como IRF3 (Choudhuri and Garg, 2020). En particular esta vía parece activarse en respuesta a moléculas de ADN oxidado contenidas en vesículas que son liberadas por las células infectadas (Choudhuri and Garg, 2020). A diferencia de TLR-9, el cual generalmente se activa tras el reconocimiento de secuencias de ADN simple hebra (ssDNA) que contienen CpG no metilado, cGAS detecta el ADN citosólico y cataliza la síntesis de di-nucleótidos cíclicos, los cuales a su vez activan el receptor STING (del inglés “*Stimulator of Interferon Genes*”) localizado en el retículo endoplasmático, lo que lleva en macrófagos a la posterior secreción de IFN- $\beta$ , IL-12 e incluso IL-6 (Vieira et al., 2021). La importancia de esta vía se evidencia ante el hecho que la señalización de la vía STING aumenta la resistencia

a la infección, mientras que ratones deficientes en STING presentan un control deficitario del parásito en circulación y en tejido cardíaco (Vieira et al., 2021).

Las vías de señalización mediadas por los distintos PPRs también pueden ser activadas por moléculas propias del hospedero conocidas como alarminas o “patrones moleculares asociados a daño tisular” (DAMP). Estos componentes son liberados como resultado del daño tisular que, en el contexto de la infección por *T. cruzi*, se produce tras la destrucción de la célula huésped infectada debido a la liberación de los tripomastigotes sanguíneos (Cribb et al., 2017).

La IL-12 es un mediador clave para la producción de IFN- $\gamma$  por las NK y las NKT (Duthie et al., 2005). Este último actúa en la respuesta innata activando la capacidad fagocítica de macrófagos y dendríticas. El IFN- $\gamma$  induce en los fagocitos la expresión de la enzima NO sintasa inducible (iNOS), y de esta forma se favorece la citotoxicidad contra *T. cruzi* mediada por NO (Vespa et al., 1994). De hecho, ratones deficientes en IFN- $\gamma$ , iNOS o IL-12 presentan una alta susceptibilidad a la infección (Graefe et al., 2003; Hölscher et al., 1998; Torrico et al., 1991).

En la fase aguda, los macrófagos producen grandes cantidades de TNF- $\alpha$ , el cual proporciona una señal autocrina que permite incrementar aún más la actividad microbicida mediada por IFN- $\gamma$ . La neutralización de la citocina o el bloqueo de las vías de transducción de señales mediadas por sus receptores TNFR1 y TNFR2, lleva a una menor producción de NO y una menor capacidad tripanolítica (Green et al., 1990; Langermans et al., 1992; Pérez et al., 2007). Por otra parte, niveles excesivos de esta citocina aceleran la mortalidad de los animales infectados (Black et al., 1989). Esto se debería a que el TNF- $\alpha$  favorece un shock similar al “endotóxico” que induce un gran daño tisular (Roggero et al., 2004; Tracey et al., 1986). Una situación similar tiene lugar en etapas más tardías de la infección, ya que se ha determinado que en las formas crónicas más graves de la ECh, las células innatas que infiltran

los tejidos blanco favorecen el daño tisular debido a la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Lannes-Vieira, 2022; Tracey et al., 1986)

Durante la respuesta innata también se producen en forma simultánea citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). En esta fase, la IL-10 puede ser producida por macrófagos (Abrahamsohn, 1998), neutrófilos (Tosello Boari et al., 2012) y células dendríticas con un perfil regulador (Poncini et al., 2010) y su presencia es indispensable para contrabalancear el exceso de inflamación (Abrahamsohn, 1998). Asimismo, un exceso de citocinas anti-inflamatorias se ha asociado con un incremento de la susceptibilidad a la infección (Poncini and González-Cappa, 2017; Reed et al., 1994). En ciertos contextos, la presencia de IL-4 e IL-13 inducen la activación alternativa de los macrófagos, que se evidencia por un aumento en la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ , acompañado de una disminución en la producción de NO y un incremento de la actividad arginasa (Stempin et al., 2002). Por lo tanto, puede afirmarse que del balance resultante entre citocinas pro- y anti-inflamatorias que se genera durante la respuesta innata, se modela la posterior respuesta adaptativa, así como el curso y desenlace de la infección (Gazzinelli et al., 2004).

Por último, cuando los tripomastigotes se liberan a la circulación pueden ser blanco de la rama humoral de la respuesta innata, es decir, por el sistema del complemento. Sin embargo, el parásito ha generado múltiples estrategias para evadir la lisis mediada por este sistema, que se discutirán más adelante (Cestari et al., 2013).

### 1.9.2 Inmunidad Adaptativa

Una vez que las células dendríticas han fagocitado al parásito, las mismas comienzan su proceso de maduración y migran hacia los órganos linfoides secundarios. La presentación de

antígenos a los linfocitos B y T en estos órganos dará comienzo a la respuesta inmune adaptativa específica contra *T. cruzi*.

Las células dendríticas presentan los antígenos parasitarios a los linfocitos T CD4 cooperadores vírgenes (Th0). El reconocimiento entre ambas células y la liberación de IL-12 por parte de las células dendríticas, inducirá a los Th0 a diferenciarse hacia linfocitos Th1, los cuales se caracterizan por la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Numerosas evidencias experimentales indican que la respuesta Th1 tiene un rol protector clave en la infección (Hoft et al., 2000; Kumar and Tarleton, 2001; Roggero et al., 2002; Torrico et al., 1991). Cabe remarcar que si bien durante la respuesta innata el IFN- $\gamma$  es producido principalmente por las NK, serán los linfocitos Th1 quienes lo produzcan durante la respuesta adaptativa, lo que desencadenará la activación de más macrófagos, amplificando de esta forma los mecanismos efectores antiparasitarios de la inmunidad innata durante la fase adaptativa (Hoft et al., 2000). A su vez, la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por los linfocitos Th1 permite la diferenciación y activación de los linfocitos T CD8 con capacidad citotóxica. Estos linfocitos controlan la infección a través de una serie de mecanismos líticos que incluyen la secreción de perforina/granzima y la vía Fas-FasL (Martin and Tarleton, 2004). Estudios realizados en ratones que carecen de perforina, así como también de granzimas A y B, muestran que estos presentan una menor supervivencia que los ratones *wild type*, lo que indica que estos mecanismos son cruciales para el control de la infección (Müller et al., 2003). Las células T CD8 también producen IFN- $\gamma$ , de manera tal que favorecen la activación de los macrófagos y la consecuente eliminación de *T. cruzi* (Martin and Tarleton, 2004). Si bien los linfocitos T CD8 protegen contra la infección, también están involucrados en el daño tisular y predominan en los sitios de inflamación tanto durante la infección aguda como la crónica. La destrucción tisular mediada por estos linfocitos sería consecuencia no sólo de la eliminación de las células parasitadas sino que también podrían estar involucrados en los eventos reportados de autoinmunidad (por ejemplo por mimetismo molecular) (Sun and Tarleton, 1993).

Simultáneamente, algunos Th0 se diferenciarán hacia linfocitos del tipo Th2, los que producirán citocinas involucradas en la síntesis de anticuerpos o con propiedades anti-inflamatorias o regulatorias tales como como IL-4, IL-5 e IL-13 (Annunziato and Romagnani, 2009). La producción en exceso de citocinas Th2 está generalmente asociada con un aumento en la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*. En cuanto a la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T, las evidencias indican que una respuesta coordinada entre los perfiles Th1 y Th2 generan mejores niveles de protección (Petray et al., 1993; Silva et al., 1992), si bien se requiere un predominio de los mecanismos efectores Th1 para el control y/o eliminación del parásito (Hoft and Eickhoff, 2005; Kumar and Tarleton, 2001; Rodrigues et al., 1999).

No obstante, en los últimos años se ha empezado a poner énfasis en otro subconjunto de células denominadas Th17. Estas células se diferencian tras la estimulación antigénica de los Th0 en medios ricos en TFG- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23. Su programa de diferenciación está gobernado por el factor de transcripción ROR $\gamma$ t. Los linfocitos Th17 son la principal fuente de IL-17A y la IL-17F, pero también de IL-21, IL-22 e IL-26 y la quimiocina CCL20. Se ha demostrado que las células Th17 pueden ejercer una potente función protectora durante la infección por *T. cruzi* en ratones, al inducir la NADPH oxidasa dependiente de IL-17A, enzima que está involucrada en la producción de especies oxidativas en las células infectadas. Dado que también pueden secretar IL-21 también están involucradas en la activación de mecanismos efectores mediados por los linfocitos T CD8+ destinados a eliminar los parásitos intracelulares (Cai et al., 2016). Incluso, la transferencia adoptiva de células Th1 o Th17 específicas contra la transialidasa, un importante factor de virulencia de *T. cruzi*, demostró que estas últimas confieren mayor protección contra el parásito que las primeras etapas de la infección (Cai et al., 2016). En animales infectados con *T. cruzi*, el bloqueo o la carencia de IL-17 (independientemente de la población celular que la produzca), se asocia a una mayor letalidad, lo cual indica que esta citocina media la resistencia contra el parásito (Cai et al., 2016; Cobb and Smeltz, 2012; Erdmann et al., 2013; Guedes et al., 2010; Hölscher et al.,

2000; Miyazaki et al., 2010; Tosello Boari et al., 2012). Por otra parte, recientemente también se demostró que los linfocitos Th17 también parecen tener un papel relevante en la inmunidad de mucosas y particularmente ante la infección experimental causada por vía oral (Cai et al., 2016).

Las células Th foliculares (Thf) localizadas en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios proporcionan el apoyo necesario para montar la respuesta B y serían las encargadas de secretar IL-4, IL-10 e IL-21. Si bien esta población no ha sido evaluada en una fase temprana de la infección, estudios en pacientes con Enfermedad de Chagas crónica, muestran que las Thf circulantes presentan alteraciones en la composición de sus distintos subsets (Thf1/Thf2/Thf17), lo cual podría reflejar una dinámica particular en los linfocitos B del centro germinal que podría tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. Independientemente de quien las produzca, la IL-10 y la IL-4 tendrían un efecto regulatorio importante, ya que evitarían la producción de cantidades excesivas de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y la posterior inducción de injuria tisular en el hospedero (Abrahamsohn et al., 2000; Hölscher et al., 2000; Savino et al., 2007; Soares et al., 2001).

En modelos experimentales murinos, la infección por *T. cruzi* se caracteriza por mostrar durante todo el curso de la infección aguda, una disminución ya sea absoluta o relativa en el número de linfocitos T CD4 reguladores FoxP3<sup>+</sup> (Treg), causada por el incremento en la población T efectora CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> (Araujo Furlan et al., 2018; González et al., 2015). Esta disminución relativa actuaría de forma permisiva, favoreciendo el montaje de una respuesta T efectora tendiente a erradicar el parásito. Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo indicaron que, en un modelo letal de infección aguda, los linfocitos Treg adquieren un perfil “Th1-like” ya que expresan además de FoxP3, el factor de transcripción T-bet (regulador maestro del perfil Th1), e incluso IFN- $\gamma$ . Este perfil se ha descrito incluso en otras infecciones (Bouladoux et al., 2012; Oldenhove et al., 2009; Zhao et al., 2011) y se lo ha asociado tanto al desarrollo de inmunopatología como a protección (Silverio et al., 2012; Smigiel et al., 2014).

En los seres humanos, las evidencias indican que la proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> es mayor en los individuos en fase indeterminada/sin patología demostrada, mientras que la frecuencia de estas células decae en los individuos con MCC, lo cual sugiere que su presencia limita el limitando el daño tisular colateral causado ya sea por la persistencia del parásito o bien por la respuesta inmunitaria (de Araújo et al., 2011). Entre los mecanismos efectores mediados por las Treg en la infección causada por *T. cruzi*, se ha reportado la secreción de IL-10 y un incremento en la expresión de CTLA-4 (en cual aparentemente interaccionaría con CD86) (de Araújo et al., 2011), aunque otros mecanismos no pueden descartarse, como por ejemplo la secreción de TGF- $\beta$ .

La evidencia disponible hasta el momento, y que surge tanto de evaluaciones experimentales como de estudios en seres humanos infectados con el parásito, destaca la diversidad de funciones que los distintos tipos de linfocitos T, ya sea células Th1, Th2, Thf, Th17 y Treg pueden ejercer durante el curso de la infección y cómo estas pueden influenciar el curso de la misma. Aún hacen falta estudios que profundicen aún más en el conocimiento de la inmunidad celular mediada por las diversas células T en el contexto de esta infección, dado que podría favorecer el desarrollo de nuevas terapias y vacunas destinadas a la ECh.

La rama humoral de la respuesta adaptativa también desempeña un papel crucial en el control de *T. cruzi*. Ratones incapaces de producir anticuerpos no pueden controlar el crecimiento parasitario y mueren durante la fase aguda de la enfermedad, demostrando así la importancia de esta población linfocítica en el control de la infección por *T. cruzi* (Kumar and Tarleton, 1998). Por otra parte, el parásito es capaz de inducir la producción de anticuerpos espúreos y distraer la respuesta inmune (Bermejo et al., 2011). Independientemente del tipo de anticuerpo producido (protectores o no), es evidente que *T. cruzi* desencadena una vigorosa respuesta de células B en los individuos con infección aguda (Grauert et al., 1993). Los anticuerpos "líticos" (llamados así por su capacidad de inducir la depuración de los tripomastigotes circulantes en presencia de complemento), se identificaron por primera vez en ratones y se demostró que los mismos se correlacionan con el grado de protección (Umekita and Mota,

2000). Por otra parte, se sabe que en modelos murinos, los anticuerpos IgG<sub>2a</sub> son unos de los más importantes para la actividad anti-tripanosoma. (Grauert et al., 1993; Hölscher et al., 2000; Takehara et al., 1981). El isotipo IgG<sub>2a</sub> es inducido por IFN- $\gamma$ , razón por la cual se lo considera un anticuerpo de tipo Th1, siendo homólogos en seres humanos IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub> (Kawasaki et al., 2004). Asimismo, durante la fase crónica de la infección en seres humanos como así también en ratones, se han detectado anticuerpos neutralizantes con actividad anti-transialidasa (Leguizamón et al., 1994; Pereira-Chiocola et al., 1994). Aunque los linfocitos B son parte fundamental de una respuesta inmunitaria eficaz, los anticuerpos producidos principalmente contra los antígenos de superficie del parásito no resuelven completamente la infección y requieren de la inmunidad celular para eliminar las formas intracelulares del parásito.

En base a lo anterior, puede inferirse que el curso de la enfermedad estará, al menos en parte, determinado por el equilibrio que se establezca entre las características cuali-cuantitativas de la respuesta inflamatoria montada por el hospedero y la actividad replicativa de los parásitos (Cardillo et al., 2007). En otras palabras, y adhiriendo a la teoría de la persistencia parasitaria, puede afirmarse que una respuesta inmunológica ineficaz favorecerá la persistencia parasitaria y, en consecuencia, dará lugar a una respuesta inflamatoria persistente que provocará daño tisular. Por el contrario, en caso de una respuesta inmune eficaz, la carga parasitaria se reducirá, hecho que redundará en un menor daño tisular (Cardillo et al., 2007). Sin embargo, sabemos que la respuesta inmune es incapaz de eliminar totalmente al parásito, lo que posibilita que la infección se cronifique. En este sentido, se ha demostrado fehacientemente que es posible detectar la presencia de ADN parasitario, parásitos o sus antígenos tanto por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como por inmunohistoquímica en individuos chagásicos crónicos (Gutierrez et al., 2009; Higuchi et al., 1993; Jones et al., 1993; Pinto et al., 2022).

## 1.10 Mucosas e infección por *Trypanosoma cruzi*

Tal como se mencionó anteriormente, la infección natural por *T. cruzi* puede acontecer a través de las mucosas. En 1935, Romaña describió por primera vez la “conjuntivitis esquizotripanosómica unilateral” (más tarde conocida como signo de Romaña) asociada a la infección aguda por *T. cruzi* y asimismo demostró que la infección chagásica crónica podría resultar de la inoculación conjuntival de *T. cruzi* (Prata, 1999). Sin embargo, relativamente pocos estudios experimentales abordan este tipo de infección. Giddings y col. han descrito que luego de que los parásitos *T. cruzi* se depositan en la mucosa conjuntiva, drenan hacia el conducto nasolagrimal y la cavidad nasal, donde infectan los tejidos más proximales revestidos con epitelio cuboidal y columnar. Se ha demostrado que el parásito no infecta directamente la conjuntiva sino que primero infecta el epitelio que recubre los conductos nasolagrimal y las cavidades nasales. Después de varias rondas de replicación, los parásitos se diseminan a través de los tejidos locales y finalmente llegan a los ganglios linfáticos parotídeos y submandibulares. Posteriormente, se diseminan a tejidos distantes a través de la sangre y la linfa (Giddings et al., 2010).

Tal como se comentó anteriormente, la transmisión oral de la ECh es una importante vía de transmisión emergente en América latina, que se produce por la ingesta de alimentos o bebidas contaminados con excrementos o macerados de insectos infectados con *T. cruzi*. (Benchimol Barbosa, 2006; Coura, 2006; Dias et al., 2008; Sánchez and Ramírez, 2013; Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012; Toso M et al., 2011). Hoft y col. han evidenciado mediante análisis histológicos que después de la infección oral, *T. cruzi* invade y se replica dentro de las células epiteliales de la mucosa gástrica formando nidos de amastigotes. Esta invasión inicial es seguida por el establecimiento de una gastritis progresiva, seguida de una diseminación sistémica del parásito (Hoft, 1996). El epitelio gástrico expresa mucinas que interactúan con las glicoproteínas de *T. cruzi*, como gp82 y gp30, las que tras la interacción con el parásito. Esta interacción desencadena distintas cascadas de señalización intracelular tanto en el parásito como en la célula huésped, lo que lleva a la movilización de  $Ca^{2+}$

intracelular, proceso esencial para la internalización del parásito (Staquicini et al., 2010; Yoshida, 2009, 2008; Yoshida et al., 2011). Por otra parte, los parásitos se encuentran con diferentes células a lo largo del tracto gastrointestinal, y en relación a esto, se han observado signos de penetración parasitaria en la mucosa oral, esofágica, gástrica e intestinal tras la infección oral (Díaz-ungría and Maldonado Alvarez, 1970). En un estudio realizado en colaboración con nuestro grupo, se demostró que, dependiendo de la mucosa por la cual el parásito ingresa al sistema digestivo, existen claras diferencias en el montaje de la respuesta inmune y en el curso de la infección. Cuando los animales fueron infectados en la mucosa bucal presentaron tasas de infección, parasitemias y producción de citocinas Th1 más elevadas que aquellos que habían sido infectados utilizando una sonda intragástrica (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015). Cuando el parásito es depositado sobre la mucosa bucal, el ingreso del mismo se produce preferencialmente a través del paladar, luego se multiplica en la cavidad nasal y posteriormente se disemina hacia los tejidos periféricos. Incluso en algunos animales, se observó diseminación al sistema nervioso central. Estas evidencias indican que tras la ingesta de alimentos contaminados, la cavidad bucal sería el sitio primario de infección y que la cavidad nasal puede albergar la replicación parasitaria (Silva-dos-Santos et al., 2017). Si bien los estudios en seres humanos son escasos, se ha reportado que tras la infección oral, es frecuente observar edema facial, con inflamación de ganglios linfáticos centinelas, hipertrofia de glándulas salivales, fibrosis en lengua y gingivitis (Peñafiel et al., 2014).

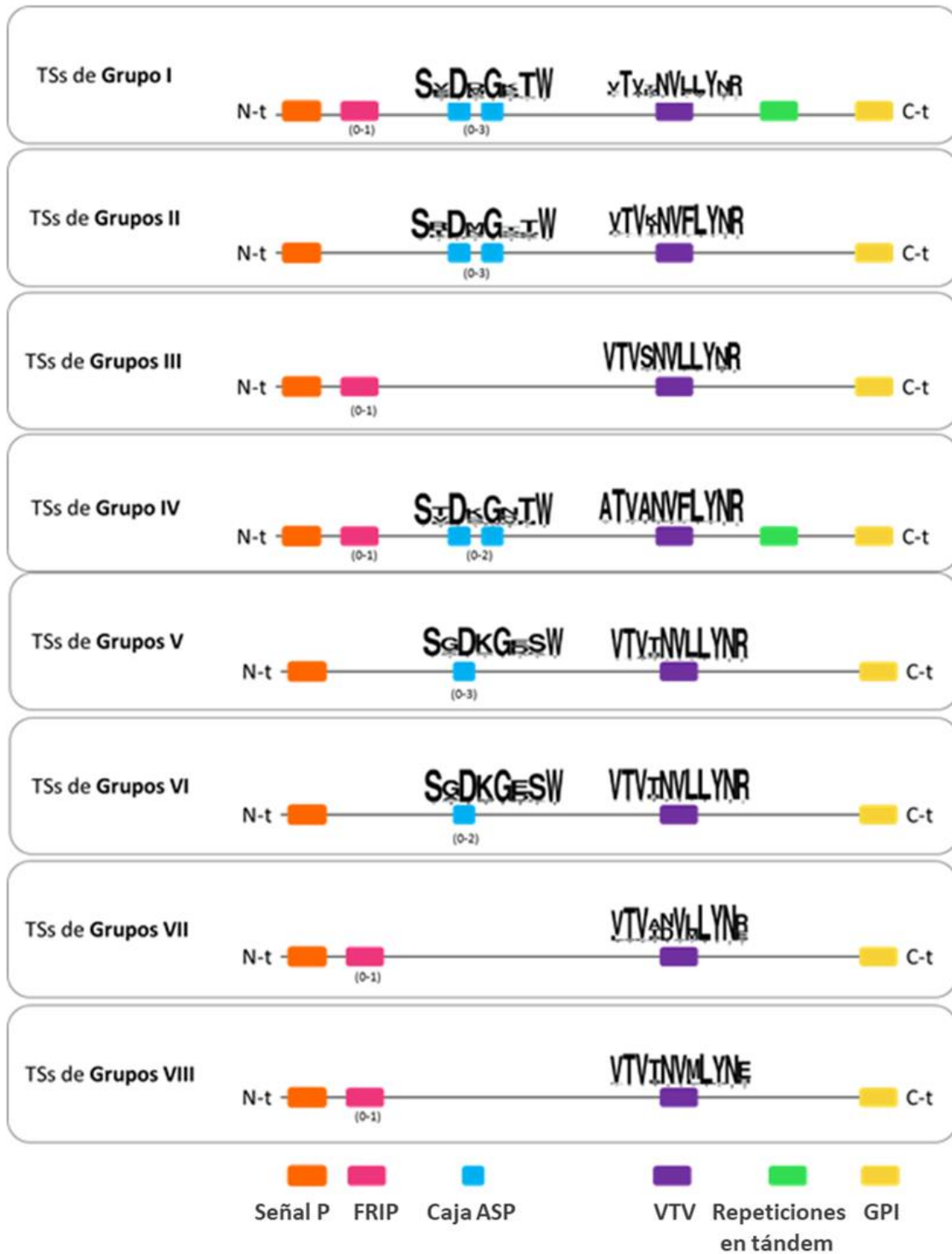
### 1.11 La familia de las Transialidasas

Uno de los inmunógenos más importante de *T. cruzi* es la enzima TS y representa un importante factor de virulencia del parásito, debido en parte a que los niveles más altos de la actividad enzimática se asocian con procesos tales como la penetración de la célula huésped o la patogénesis tisular (Cross and Takle, 1993). Esta enzima participa en el proceso de trans-

sialidación, que consiste en la transferencia de residuos de ácido siálico (AcS), desde la superficie de las células de los mamíferos hacia  $\beta$ -galactosas terminales localizadas sobre su propia superficie (Freire-De-Lima et al., 2015; Previato et al., 1985). Los AcSs son una familia de monosacáridos que están presentes en la superficie de todas las células de mamíferos y que confieren diversas actividades biológicas a glicoproteínas y glicolípidos, tales como la promoción de las interacciones célula-célula o el enmascaramiento de ciertos sitios debido a su elevada carga negativa (Frasch, 2000). A diferencia de otros microorganismos, *T. cruzi* no puede sintetizar “*de novo*” AcSs y por tal motivo los recupera de las células del hospedero.

Las TSs son una superfamilia codificada por 1430 genes. Entre estos se encuentran genes que codifican para TSs enzimáticamente activas (en donde el dominio catalítico está altamente conservado) y genes que codifican para formas inactivas, ya que carecen del dominio catalítico o bien que constituyen pseudogenes (Atwood, 2005; El-Sayed et al., 2005). Las TSs se distribuyen en diferentes regiones del parásito, ya sea a lo largo del cuerpo celular, o bien el flagelo o el bolsillo flagelar (Frevert et al., 1992; Lantos et al., 2016).

Recientemente, esta gran familia fue subdividida en ocho grupos, en función de la similitud de secuencias y las propiedades funcionales, así como también de la presencia o ausencia de varios motivos muy conservados (Fig. 10). En esta clasificación las TSs activas se encuentran reunidas en el grupo I (TS-GI) y el resto de los miembros de la familia distribuidos en los grupos restantes (Freitas et al., 2011).



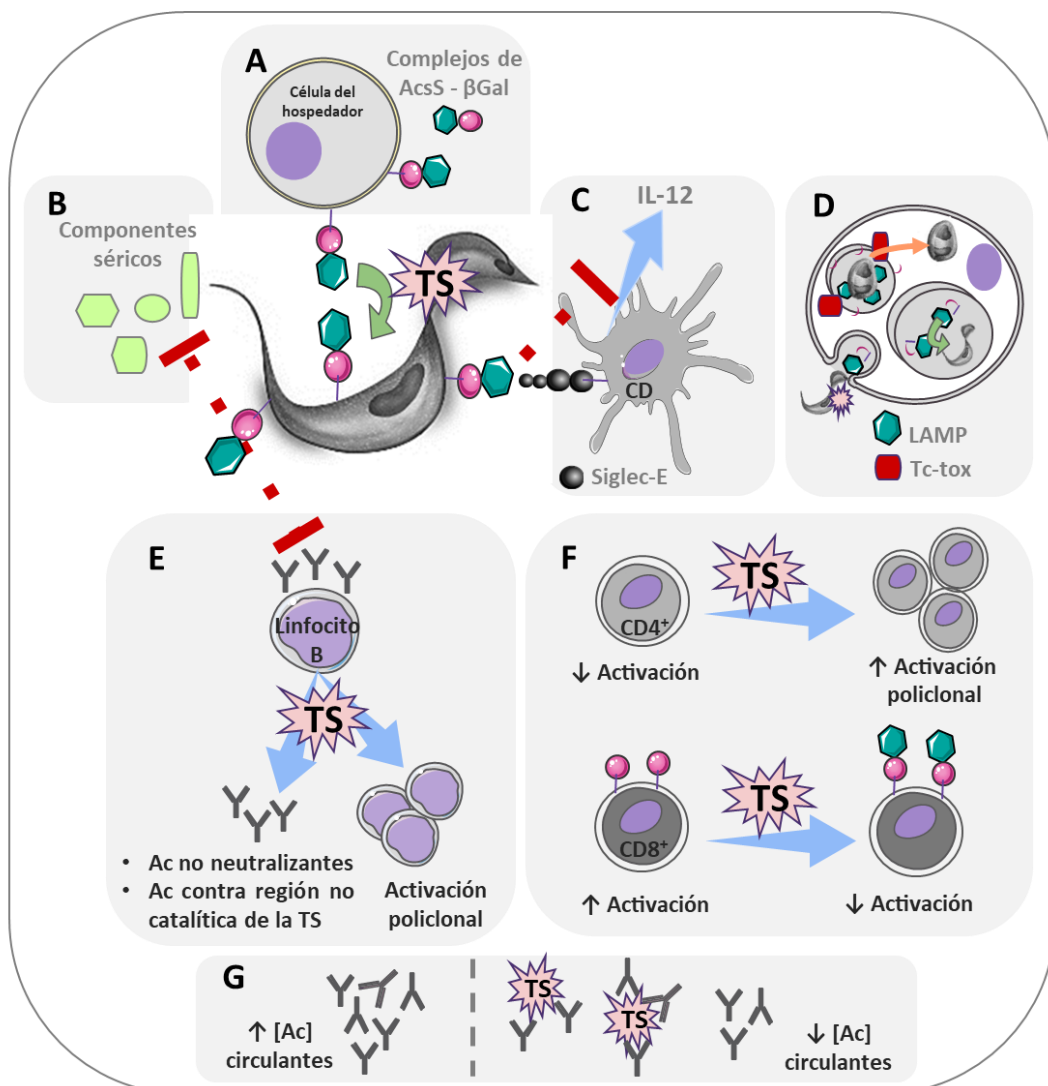
**Figura 10: Clasificación de la superfamilia de la TS.** Esquema comparativo de las secuencias de las TS pertenecientes a los grupos I a VIII, en donde se visualizan la Caja Asp y el motivo VTVxNVxLYNR. Los números entre paréntesis indican el número de apariciones de un motivo dado. Adaptado de Freitas et al, 2011. (Freitas et al., 2011)

El TS-GI está constituido por enzimas activas, que pueden poseer no sólo actividad TS sino también neuraminidasa, función que consiste en la remoción del AcS mediante la incorporación de una molécula de agua. Los miembros del TS-GI son: TcNA (neuraminidasa), TS-SAPA (por "*Shed Acute Phase Antigen*") y TS-Epi. Las enzimas TS-SAPA y TcNA se expresan en los tripomastigotes sanguíneos y tienen funciones de TS y neuraminidasa. Ambas contienen dos regiones principales, una región catalítica N-terminal y una región C-terminal en donde se localiza la región SAPA, caracterizada por la presencia de repeticiones de 12 aminoácidos en tándem. Ambas proteínas están ancladas en la membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (GPI). A diferencia de las anteriores, TS-Epi sólo se expresa en la forma epimastigote, carece de repeticiones SAPA y no está anclado a la membrana por GPI. En este caso, su anclaje depende de la presencia de un dominio transmembrana seguido de una sección hidrófila en C-terminal (Revisado en (Dinatale et al., 2021)).

### 1.11.1 Rol de las Transialidasas en la invasión celular y la evasión del sistema inmune

*T. cruzi* emplea diversas estrategias para subsistir a largo plazo dentro del hospedador, muchas de las cuales están mediadas por las TSs e influyen tanto la respuesta innata como la adaptativa (Fig. 11). Cuando el parásito ingresa al organismo del hospedero, se encuentra en un entorno celular rico en AcS. El parásito utiliza estos AcSs para cubrir su superficie de cargas negativas, a través de la reacción de trans-sialidación catalizada por la TS (Fig. 11A). Esta cubierta protectora cargada negativamente permitiría al parásito eludir los efectos del complemento (Vimr and Lichtensteiger, 2002) (Fig. 11B), ya que cuando dicha cubierta se elimina por tratamiento con una sialidasa, los tripomastigotes son más susceptibles a la lisis mediada por el complemento (Kipnis et al., 1981).

Además, y como consecuencia de la actividad TS, en la superficie del parásito se encuentran distintos sialil glicoconjugados que pueden unirse a las lectinas de tipo Ig (Siglec-E) localizadas en la superficie de las CDs (Fig. 11C). Esta interacción conduce en estas células a la supresión de la producción de IL-12 y de TNF- $\alpha$ , proceso que desfavorece la interconexión entre el sistema inmune innato y adaptativo (Erdmann et al., 2009; Nardy et al., 2016). *T. cruzi* también estimula la secreción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$  que favorecen la propagación de la infección y la persistencia del parásito en el hospedero (Freire-de-Lima et al., 2000; Hunter et al., 1997; Silva et al., 1991).



**Figura 11: Mecanismos de evasión del sistema inmune mediado por TS.** Adaptado de Nardy, et al 2016 (Nardy et al., 2016).

Otro mecanismo de evasión del sistema inmune que presenta *T. cruzi* consiste en eludir la actividad microbicida de los macrófagos escapando del fagolisosoma al citoplasma, un evento que está mediado por la actividad citolítica de una proteína formadora de poros derivada del parásito, llamada Tc-Tox y cuya actividad es máxima a pH bajos (Fig 11D) (Albertti et al., 2010; Andrews, 1990; Andrews and Whitlow, 1989; Bogdan and Röllinghoff, 1999; Hall et al., 1992; Rubin-de-Celis et al., 2006). En el entorno ácido del fagolisosoma, la proteína TS que se ha liberado de la superficie del parásito se activa, luego transfiere el AcS de las proteínas que recubren la membrana del fagolisosoma a las mucinas de la superficie del parásito, y ésta desialidación hace que las membranas del fagolisosoma sean más susceptibles a la ruptura (Nardy et al., 2016).

La fase aguda de la infección está marcada por un estado transitorio de inmunosupresión, en donde se observan alteraciones en la respuesta del compartimento de células T, lo que implica, entre otras cosas, una respuesta disminuida a mitógenos, la inducción de anergia y deleción clonal (Flávia Nardy et al., 2015). Asimismo, la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8 se sesga hacia epítomos inmunodominantes del parásito derivados de la familia de las TSs. Por otra parte, la TS también puede promover cambios en el patrón de sialilación de las células T CD8 activadas, debilitando sus funciones efectoras (Flávia Nardy et al., 2015; Nardy et al., 2016).

Se considera que la región SAPA de las TS-GI actúa como un señuelo distractor, ya que la presencia de epítomos B inmunodominantes en su estructura promueve la producción de anticuerpos no neutralizantes dirigidos contra regiones distantes del sitio catalítico (Buscaglia et al., 1999). Normalmente, en individuos infectados se detecta una respuesta robusta de anticuerpos contra la región C-terminal y N-terminal de TS. Sin embargo, estudios preclínicos demostraron que los anticuerpos que reconocen el sitio catalítico de la TS, son capaces de conferir inmunidad pasiva a animales infectados, mientras que los anticuerpos dirigidos contra

el dominio C-terminal de la proteína completa (SAPA) no son protectores, ya que no logran bloquear la actividad enzimática (Giddings et al., 2010). Así, es posible que el antígeno SAPA haya evolucionado para evitar la producción de anticuerpos protectores dirigidos contra la región catalítica N-terminal, esencial para la transferencia de AcS (Fig 11E). Por esta razón, la incorporación en formulaciones vacunales de TSs que carezcan del fragmento SAPA sería una estrategia prometedora para incrementar la producción de anticuerpos protectores (Bontempi et al., 2015; Fontanella et al., 2008). La TS también puede activar en forma policlonal a los linfocitos B (Gao and Pereira, 2001), y probablemente esto conduzca a restringir el tamaño del nicho requerido para un desarrollo óptimo de linfocitos específicos y protectores, ya que incrementa la competencia por las señales de activación y supervivencia de estas células en los órganos linfoides (Freitas and Rocha, 2000; Montaudouin et al., 2013). Además, la superficie del tripomastigote es rica en  $\alpha$ -galactosilmucinas, objetivos de los anticuerpos líticos (es decir anticuerpos que median reacciones de citotoxicidad). Sin embargo, *T. cruzi* evita la muerte inducida por estos anticuerpos debido a que, al igual que sucede con las moléculas del complemento, logra repelerlos por tener una superficie cargada negativamente debido a la presencia de AcS (Buscaglia et al., 2006; Pereira-Chiocola et al., 2000).

Por otra parte, se ha demostrado que las TSs activas e inactivas son capaces *in vitro* de activar a los linfocitos T CD4 mediante su unión a CD43, el cual está altamente sialilado (Fig 11F). Esta evidencia sugiere que las TSs podrían estar involucradas en la respuesta exacerbada y no protectora que se evidencia en el hospedero tras la infección (Todeschini et al., 2002). Asimismo, las TSs también pueden sialidar la superficie de los linfocitos T CD8, lo cual conduce a la desactivación de estas células. Este mecanismo constituye una importante estrategia de evasión parasitaria que influye indirectamente en la supervivencia de *T. cruzi* dentro de las células del hospedero, ya que evita de esta manera el control inmunitario mediado por las células T CD8 (Freire-de-Lima et al., 2010).

Por último, las TSs liberadas al torrente sanguíneo tras la escisión del GPI que las ancla a membrana, pueden formar inmunocomplejos con anticuerpos específicos anti-TS, hecho que provocaría un descenso en la concentración efectiva de anticuerpos neutralizantes circulantes (Fig 11G) (Mucci et al., 2017; Pitcovsky et al., 2002).

## 1.12 Vacunas Mucosales

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las vacunas y el acceso al agua potable son las dos herramientas más importantes para prevenir el desarrollo de enfermedades infecciosas. En este sentido, el plan de acción mundial sobre vacunas de la OMS sostiene que "la inmunización es un componente esencial del derecho humano a la salud además de ser responsabilidad de individuos, comunidades y gobiernos". Esta misma entidad estima que gracias a la vacunación se previenen unos 2,5 millones de fallecimientos cada año.

En lo que respecta a la ECh, hoy en día existe una necesidad urgente de nuevas herramientas de prevención, control y tratamiento, ya que como se describió anteriormente, el tratamiento actual se basa en dos fármacos, BNZ o NFX, los que son altamente eficaces siempre que la terapia se inicie durante la fase aguda de la enfermedad.

Actualmente no se dispone de una vacuna contra la ECh y los esfuerzos de prevención actuales dependen mayoritariamente del control de vectores y del tamizaje en bancos de sangre. Si bien estas estrategias han reducido la incidencia de la enfermedad, no parece que las medidas de control vectorial por sí solas sean suficientes para eliminar la ECh en las zonas altamente afectadas (Quijano-Hernandez and Dumonteil, 2011). Es por esta razón que el desarrollo de una vacuna profiláctica sería clave para lograr el control de la ECh con eficacia. En este contexto, la presente tesis se enfoca en el desarrollo de prototipos vacunales basados en TS-GI, la realización de pruebas preclínicas de inmunización a nivel de mucosas, y estudios de protección tras la infección oral.

Las mucosas recubren las cavidades y los órganos internos, y comprenden en los seres humanos un área extensa de aproximadamente 400 m<sup>2</sup>. Estas se caracterizan por ser el nexo entre el ambiente externo e interno de un organismo, lo que hace que se encuentren continuamente expuestas a una inmensa variedad de antígenos y a la flora comensal (Corr et al., 2008; Sato and Kiyono, 2012). La inmunización a nivel de mucosas busca desencadenar una respuesta tanto celular como humoral antígeno específica, y que a la vez sea efectiva tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, la respuesta que se genere depende en gran parte del sitio de administración, dado que existen distintas vías para llevar a cabo este tipo de inmunizaciones: oral/sublingual, intragástrica, rectal, vaginal, intraocular e intranasal, siendo la oral y la intranasal las más accesibles y aceptadas.

Las mucosas interaccionan funcionalmente entre sí, conformando lo que se conoce como un “sistema de mucosas”. Esto se evidencia en el hecho que la administración oral de antígenos puede inducir la producción de IgA secretora (sIgA) específicas en otras mucosas anatómicamente distantes, tales como la del tracto gastrointestinal, la de las glándulas salivales y las glándulas mamarias, mientras que las inoculaciones intranasales pueden generar IgA específicas en el tracto respiratorio superior, como también, a nivel gástrico y genital (Lycke, 2012; Sallusto et al., 2010). La sIgA presenta una estructura que le permite resistir la degradación química y las enzimas degradativas del hospedero o derivadas de microorganismos. Su producción está finamente regulada y distintos mecanismos T-independientes y T-dependientes influyen en las respuestas montadas por este tipo de anticuerpos contra microbios comensales y patógenos (Corthésy, 2013).

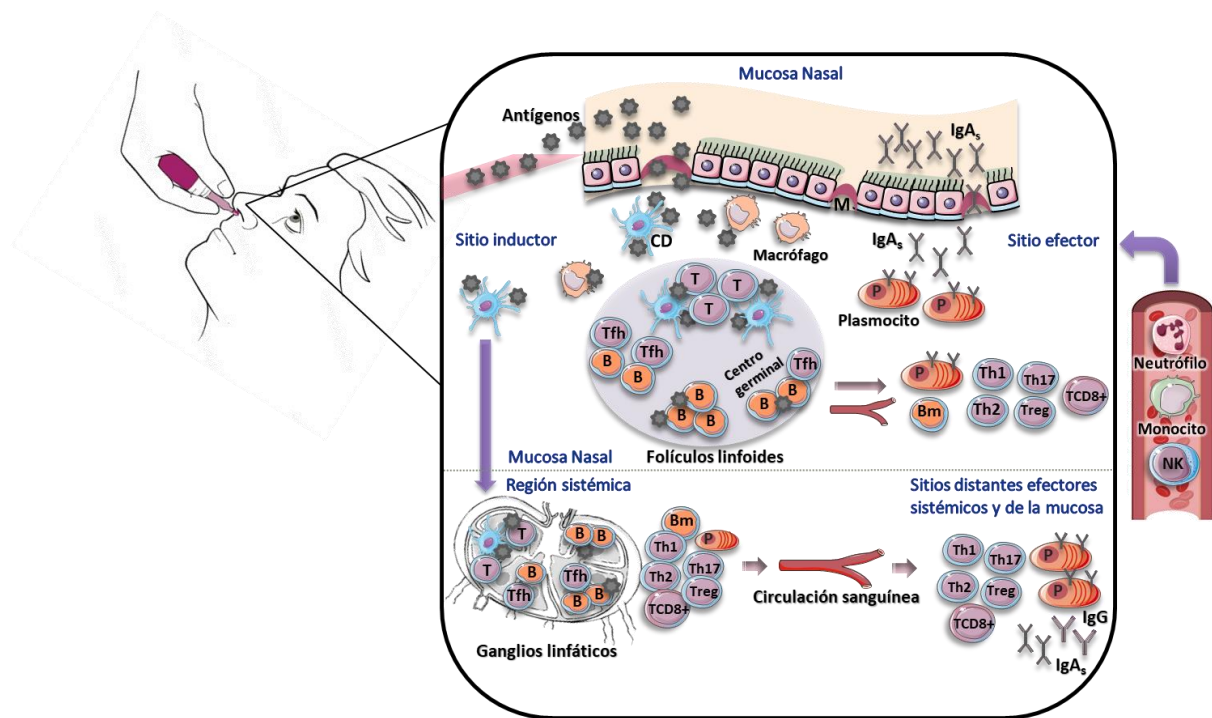
El conjunto de linfocitos y estructuras linfoides que están presentes en las mucosas recibe el nombre generalizado de tejido linfoide asociado a mucosas o MALT (del inglés “*Mucosal-Associated Lymphoid Tissue*”), el cual se encuentra conformado por una red de mucosas que incluyen el tejido linfoide asociado al tubo digestivo o GALT (del inglés “*Gut-Associated Lymphoid Tissue*”), el tejido linfoide asociado a la nasofaringe o NALT (del inglés “*Nasal-*

*Associated Lymphoid Tissue*”) y el tejido linfoide asociado a los bronquios o BALT (del inglés “*Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*”), entre otros (Nizard et al., 2014).

Asimismo, en las mucosas se distinguen dos tipos de sitios estructural y funcionalmente diferentes, los llamados sitios inductores y efectores. Los sitios inductores son aquellos en donde los linfocitos T y B vírgenes se activan, se expanden y se transforman en células efectoras y de memoria. Los sitios efectores son los responsables de llevar a cabo la respuesta efectora propiamente dicha. En el NALT de los seres humanos los sitios inductores incluyen las amígdalas y las adenoides (contenidas en lo que se conoce como el anillo de Waldeyer), mientras que los sitios efectores comprenden el epitelio nasal y la lámina propia (Staats et al., 1994). En el tracto respiratorio superior murino, el NALT es el equivalente del anillo de Waldeyer de los seres humanos y consiste en un tejido linfoide ubicado en el piso de la cavidad nasal revestida por epitelio respiratorio ciliado, y cuya composición sería muy similar a la de las Placas de Peyer del GALT (Asanuma et al., 1997; Heritage et al., 1997). Los neutrófilos, monocitos y macrófagos del NALT son componentes innatos que median la fagocitosis en el tejido subepitelial de la nariz y los senos paranasales, así como la respuesta inflamatoria subyacente tras la liberación de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios. En el contexto de una infección, las células NK que infiltran la mucosa destruyen las células blanco y liberan distintas citocinas que refuerzan la respuesta inflamatoria (Beule, 2010).

Los antígenos administrados en la cavidad nasal deben atravesar una capa de moco y ser transportados hacia la lámina propia de la mucosa. Existen diversos mecanismos que llevan a cabo este proceso, entre ellos el transporte mediado por células especializadas del tejido epitelial, denominadas células M (del inglés “*Microfold cells*”) (Fainboim and Geffner, 2005). En la lámina propia los antígenos son captados por las CDs, parte de las cuales migran a los folículos linfoides del sitio inductor y presentan allí los antígenos procesados a los linfocitos T vírgenes, lo que genera su activación hacia un determinado perfil Th. Además de una respuesta celular mediada por linfocitos T, en el NALT también se desarrolla una respuesta

humoral específica (Zuercher and Cebra, 2002). Los antígenos que llegan a los folículos linfoides activan a los linfocitos B, los cuales luego de interactuar con los linfocitos T foliculares (Tfh) forman el centro germinal donde proliferan de forma muy activa, con nuevos eventos de procesamiento antigénicos y colaboraciones con más células Tfh. Durante este proceso ocurre el cambio de isotipo, tras lo cual, las células B primordialmente se diferencian a células plasmáticas secretoras de IgA, como también a linfocitos B de memoria. Luego, tanto los linfocitos B como T que han sido activados, se vuelcan a la circulación general vía el conducto torácico, para posteriormente retornar a la mucosa y ejercer allí su función efectora. Este proceso logra conectar un determinado sitio inductor con los sitios efectores de otras mucosas, provocando una respuesta inmune mucosal expandida (Fig. 12).



**Figura 12: Inducción de la respuesta inmune luego de la administración de una vacuna intranasal.** Adaptado de Riese et al 2014 (Riese et al., 2014).

Por otra parte, una proporción de las CDs que capturan los antígenos en el sitio inductor migran hacia los ganglios linfáticos en la región sistémica para activar a los linfocitos T y B específicos, los cuales ingresan a través del torrente sanguíneo a los sitios efectores distantes

y contribuyen con la protección sistémica. Así, la generación de inmunidad específica de antígeno no solo se limita a los sitios inductores locales, sino también a áreas distantes de la mucosa y otros tejidos a nivel sistémico. Esto destaca el enorme potencial de las vacunas administradas por vía mucosal, particularmente a través de la vía intranasal (Riese et al., 2014).

### 1.13 Adyuvantes

Los adyuvantes son un grupo variado de moléculas y materiales que en combinación con un antígeno pueden optimizar la magnitud, la funcionalidad, la amplitud y la durabilidad de las respuestas inmunitarias, y a su vez, minimizar la necesidad de refuerzos, lo cual facilita el ahorro de dosis y amplía en gran medida el suministro de las vacunas que lo requieran. Los adyuvantes fueron descritos por primera vez en 1925 (Schmidt, 2010; Turley and Lavelle, 2022). Actualmente, las sales de aluminio, como el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio y el sulfato de aluminio y potasio, se utilizan de manera segura en distintas formulaciones vacunales. Estas sales se comenzaron a utilizar a partir de 1930 en las formulaciones de las vacunas contra la difteria y el tétanos, luego de que se descubrió que favorecían la respuesta inmunitaria humoral hacia los patógenos causantes de estas enfermedades.

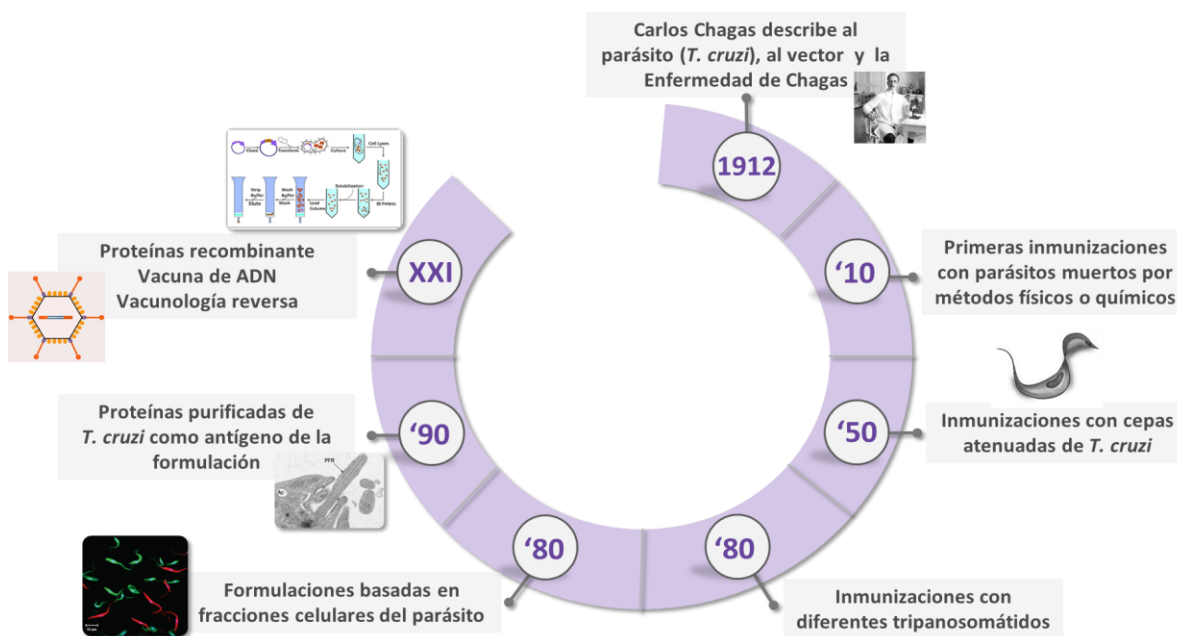
Particularmente, las vacunas a subunidades requieren el uso de inmunoestimulantes o adyuvantes para lograr una eficacia óptima. Las sales de aluminio son las más utilizadas en las vacunas de subunidades que se administran vía parenteral (inyectadas), ya que inducen el incremento en IgG específicas en suero. Sin embargo, estos adyuvantes no son efectivos en la inducción de sIgA o en el homing de linfocitos B y T efectores hacia otros tejidos mucosales.

Actualmente, los adyuvantes pueden clasificarse en tres grandes grupos: a) Sistemas de “*delivery*” o de entrega (Sistema adyuvante 03 -AS03-, MF59, LNP, alumbre, ISCOMATRIX, entre otros); b) Ligandos de PRRs (CpG 1018); c) sistemas que combinan los 2 grupos anteriores (MPL más sales de aluminio -AS01-, AS04, Alhydroxiqum-II, etc.). Sin embargo, los adyuvantes que hoy se están evaluando para uso humano incluyen principalmente emulsiones de aceite, complejos inmunoestimulantes, saponinas, liposomas, micropartículas, polisacáridos, copolímeros no iónicos, citocinas y derivados bacterianos. Muchos de estos adyuvantes, están diseñados para favorecer no solo la respuesta humoral, sino también la respuesta celular, imprescindible en el caso de patógenos intracelulares.

Un adyuvante que ha sido reportado como un inmunopotenciador a nivel de mucosas, es el segundo mensajero bacteriano monofosfato de adenosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico (di-AMP-c). Esta molécula actúa como agonista de la proteína STING e induce la producción de interferones de tipo I (IFNs-I) y citocinas de la familia de la IL-1 (Lirussi et al., 2017). Varias investigaciones han demostrado que en procesos de inmunización mucosal donde se utiliza como adyuvante el di-AMP-c, se observa la promoción de un fuerte sesgo Th1 -un requisito fundamental para el control de patógenos intracelulares-, pero que además es capaz de promover en forma concomitante una respuesta humoral (Burdette et al., 2011). Más aún, recientemente se describió que la vía di-AMP-c/STING/IFN-I favorecería el proceso de presentación cruzada (mecanismo por el cual los antígenos que ingresan por la vía extrínseca, son presentados sobre las MHC-I) (Lirussi et al., 2017), amplificando así las posibilidades de establecer una respuesta celular efectiva. Asimismo, el uso de di-nucleótidos cíclicos como adyuvantes intranasales favorecería no solo la producción mucosal de IgA e IgG sistémica, sumado a una estimulación equilibrada de las respuestas Th1/Th2/Th17 (Ebensen et al., 2011), sino que también estimularía el desarrollo de linfocitos Th1 multifuncionales y T CD8 citotóxicos (Madhun et al., 2011).

## 1.14 Vacunas profilácticas contra *Trypanosoma cruzi*

La idea de desarrollar una vacuna contra *T. cruzi* surgió en 1912, cuando Blanchard demostró que los animales que sobrevivían a la fase aguda eran resistentes a las re-infecciones. Desde ese entonces y hasta la actualidad, se han evaluado numerosas estrategias con el objetivo de desarrollar una vacuna contra esta enfermedad (Fig. 13).



**Figura 13: Historia del desarrollo de vacunas profilácticas para la Enfermedad de Chagas.** Cronología sobre las estrategias evaluadas para el desarrollo de vacunas profilácticas contra *T. cruzi*, desde su descubrimiento en el año 1912 hasta la actualidad. (Dinatale et al., 2021).

Las primeras inmunizaciones se llevaron a cabo con tripanosomas muertos por métodos tanto químicos como físicos. Entre estos podemos mencionar el tratamiento con Timerosal o Formalina (químicos), sonicación, congelado y descongelado, pulverización, irradiación y diferencia de presión (físicos). Los primeros intentos de inmunización dieron resultados desalentadores ya que estas vacunas proporcionaban bajo grado de protección. En parte, esto podría haber estado relacionado con la pérdida de epítopos protectores durante la inactivación y/o el fraccionamiento (Cassab et al., 1999).

A finales del siglo XX, se llevaron a cabo inmunizaciones experimentales con tripanosomátidos relacionados como *Trypanosoma rangeli* o parásitos con cierta similitud antigénica como *Phytomonas serpens*, los cuales no son patogénicos para seres humanos. Estos estudios, realizados en animales de experimentación, mostraron una reducción significativa de la parasitemia y un aumento en la supervivencia ante la infección posterior con *T. cruzi* (Basso and Marini, 2015; Breganó et al., 2003).

Entre la década de los 80 y los 90, se intentó identificar porciones inmunogénicas, proteínas o glicoproteínas del parásito capaces de inducir una respuesta inmune protectora. En una primera instancia se realizaron diversos estudios de fraccionamiento celular. Así, se identificó que una fracción flagelar de *T. cruzi* era capaz de disminuir la parasitemia (Ruiz et al., 1985), y más adelante se lograron aislar diferentes glicoproteínas (GP) de la superficie del parásito que exhibieron un buen grado de protección, tales como las GP90, GP70 (Snary et al., 1983) y las proteínas 45 kDa y de 68 kDa emulsionadas en un derivado de saponina llamado Quil A (Araujo and Morein, 1991). Incluso, una proteína 72 kDa obtenida a partir de epimastigote generó un título elevado de IgG, inmunidad celular específica y una disminución significativa de la parasitemia (Gomes et al., 1999). También se identificaron los antígenos de la superfamilia de la transalidasa (TS) (737 genes), las mucinas (662 genes), las proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP, 944 genes), GP63 (174 genes) (El-Sayed et al., 2005), la proteína reguladora del complemento (CRP) (Norris et al., 1994), la cisteína proteasa lisosomal cruzipaina (Cz) (Fonseca et al., 2005), la proteína de unión a calcio flagelar (FCaBP o Tc24) (Godsel and Engman, 1999; Krautz et al., 1998), GP90, GP82 (Yoshida et al., 1993) y TC52 (Fernandez-Gomez et al., 1998).

Hoy en día y gracias al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante muchas de estas proteínas pueden sintetizarse para su posterior uso en el desarrollo de vacunas (Cazorla et al., 2010; García et al., 2006; Matos et al., 2017; Pereira et al., 2003).

Asimismo, también se han evaluado sistemas de *delivery* de inmunógenos procedentes de *T. cruzi* basados en adenovirus *recombinantes de tipo 5 humanos no replicantes* (Ad5), *Salmonella* y *Lactococcus lactis* (Barbosa et al., 2013; Quintana et al., 2018).

Más recientemente, el desarrollo de las "ómicas" (tales como genómica y proteómica), junto con distintas herramientas bioinformáticas, permitieron detectar nuevos y potenciales inmunógenos. Este enfoque se conoce actualmente como "vacunología inversa" (Rappuoli, 2000). Con esta estrategia se detectaron nuevas proteínas secretadas o ancladas a la membrana que podrían funcionar como buenos antígenos vacunales para la ECh (Bhatia and Garg, 2005).

#### 1.14.1 Uso de Transialidasa como inmunógeno en formulaciones vacunales contra *Trypanosoma cruzi*

Numerosos estudios básicos y preclínicos han centrado su interés en la utilización de miembros o derivados de la superfamilia de la TS para el desarrollo de distintas estrategias profilácticas contra *T. cruzi* (Bustamante and Tarleton, 2015; Cazorla et al., 2009; Eickhoff et al., 2011; Fralish and Tarleton, 2003).

En una primera instancia, se utilizaron en las formulaciones vacunales formas enzimáticamente activas de la TS. Sin embargo, más tarde se demostró que su utilización genera una serie de efectos adversos tales como toxicidad hepática y alteraciones a nivel del miocardio y del bazo (Chen et al., 1999; Risso et al., 2007), sin cambios significativos en la tasa de protección (Chen et al., 1999). Por esta razón, se concluyó que este tipo de formulaciones no eran lo suficientemente seguras para ser evaluadas en una potencial fase clínica (Schalk et al., 2006). A partir de estos resultados, las nuevas estrategias consistieron en utilizar formas inactivas de la TS. Aquí comenzaron a jugar otros aspectos, como la expresión diferencial de estas proteínas en las distintas etapas de la vida del parásito o su

papel en la respuesta inmune (Colli and Alves, 1999; Fontanella et al., 2008; Millar et al., 1999). Por lo tanto, la estrategia más prometedora fue el uso de mutantes inactivos de las TS-GI o bien fragmentos recombinantes inactivos que no incluían la región SAPA (Fontanella et al., 2008). La utilización de estos inmunógenos aseguraría el mantenimiento de la inmunogenicidad y disminuiría la posibilidad de presentar reacciones adversas. Varios estudios preclínicos han utilizado esta estrategia, tal como se describe más adelante.

#### 1.14.2 Transialidasas recombinantes utilizadas en vacunas experimentales

En la era de la ingeniería genética surgieron las vacunas basadas en proteínas recombinantes. La vacuna contra la hepatitis B fue la primera vacuna autorizada para su uso en seres humanos producida en base a esta tecnología. Estas vacunas están formadas por fragmentos del antígeno que son altamente inmunogénicos. Una ventaja de este tipo de vacunas es que son seguras (no inducen infección) y su probabilidad de inducir reacciones adversas es potencialmente menor (Clem, 2011). Sin embargo, presenta la limitante de que, a diferencia de las vacunas a patógenos atenuados, este tipo de vacunas requiere de adyuvantes para lograr una respuesta inmunitaria protectora. Lo mismo ocurre con las vacunas inactivadas, los toxoides y las vacunas conjugadas (Coffman et al., 2010).

En el año 2007, un estudio preclínico evaluó una TS recombinante junto al adyuvante CpG (agonista TLR-9). Esta TS recombinante presentaba una mutación puntual en el aminoácido 342 -que provoca un cambio de histidina por tirosina-, lo cual conduce a la pérdida de la actividad catalítica. Esta vacuna fue administrada tanto de forma intramuscular como intranasal (dos dosis separadas por 15 días en cada uno de los casos). Ambos esquemas proporcionaron un buen nivel de protección (Hoft et al., 2007). La administración intramuscular desarrolló buenos niveles séricos de IgG específica e indujo un perfil Th1

caracterizado por la secreción de IFN- $\gamma$ , lo cual se reflejó en un incremento en la supervivencia de los animales. A nivel nasal, su administración indujo un incremento en los niveles circulantes de IgG, así como de IgA en los extractos fecales, menor parasitemia, y una mayor activación de células T CD4 y CD8 (Hoft et al., 2007). En otro estudio donde también se utilizó TS+CpG por vía intranasal, se observó el desarrollo de un sesgo hacia Th1 y una respuesta T CD8 específica contra el epítoto inmunodominante IYNVGQVSI/TSKb20. Asimismo, se observaron niveles significativamente elevados de IgA específica en heces y lágrimas. El desafío fue realizado tanto con tripomastigotes metacíclicos como sanguíneos y tanto por vía subcutánea como a nivel de la mucosa conjuntiva. Independientemente del esquema utilizado de infección, los animales inmunizados previamente con TS+CpG mostraron una mayor tasa de supervivencia (Giddings et al., 2010).

Asimismo, en nuestro Instituto se llevó a cabo un estudio preclínico en donde se administró a ratones C57BL/6 una TS recombinante glicosilada que poseía una mutación en el sitio activo (T<sub>Sm</sub>) y que carecía de SAPA, previamente emulsionada en adyuvante de Freund. Los estudios de protección ante el desafío intraperitoneal con una dosis letal de tripomastigotes sanguíneos mostraron que los animales inmunizados presentaban una mayor tasa de supervivencia, asociada a la falta de evidencia clínica o tisular de infección durante todo el estudio, en comparación con los ratones no vacunados e infectados (Fontanella et al., 2008). Unos años más tarde, Bontempi y col., evaluaron una nueva vacuna formulada con la misma T<sub>Sm</sub>, pero esta vez utilizando animales BALB/c y un adyuvante que estaba siendo evaluado para uso humano llamado ISCOMATRIX, en un esquema de 3 dosis. En términos de inmunogenicidad, esta formulación incrementó significativamente los niveles de IgG<sub>2a</sub> anti-TS, lo que sugería el establecimiento de un perfil Th1. Asimismo, la respuesta de hipersensibilidad retardada (DHT, por "*Delayed-type hypersensitivity test*") y una fuerte secreción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T CD8 fue marcadamente significativa en los animales inmunizados en comparación con los no inmunizados o con los que solo habían recibido la TS o el ISCOMATRIX. En esplenocitos procedentes de los animales vacunados con

TSm+ISCOMATRIX y re-estimulados *in vitro* con TS, se observó una producción equilibrada de IFN- $\gamma$  e IL-10. En cuanto al grado de protección alcanzado, los animales que recibieron TSm+ISCOMATRIX sobrevivieron, mientras que el resto presentó una elevada mortalidad. Esta formulación vacunal logró un mejor control de la carga tisular no sólo durante la etapa aguda sino también durante la crónica (100 días post-infección). A nivel cardíaco, también indujo una disminución del infiltrado inflamatorio y menor grado de lesiones (Bontempi et al., 2015). Estos estudios debieron interrumpirse debido a que la TSm fue licenciada y la producción de ISCOMATRIX se vió discontinuada.

Más recientemente, se utilizó un nuevo inmunógeno recombinante expresado en *E. coli*, que consistía en un fragmento de tamaño reducido (<900 pares de bases) correspondiente al dominio C-terminal de la proteína, al que se denominó TS emulsionado en un adyuvante de tipo caja lipídica similar al ISCOMATRIX llamado ISPA. En forma análoga a lo que se había reportado previamente con las demás formulaciones, la administración subcutánea de esta vacuna generó un sesgo hacia el perfil Th1 caracterizado por un incremento en la relación IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub> y una mayor producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T CD8 específicos al ser re-estimulados *in vitro*. Los animales vacunados experimentaron parasitemias más bajas y un incremento en la supervivencia. Si bien previamente se había demostrado que la administración de la secuencia completa de TS en presencia de un adyuvante promovía buenos niveles de protección (Bontempi et al., 2015; Fontanella et al., 2008), la importancia de este estudio radicó en el hecho que, disponer de una TS recombinante de tamaño reducido y con capacidad protectora, representaba una herramienta valiosa a la hora de facilitar el desarrollo de una vacuna, ya que la expresión heteróloga de antígenos mejora cuando el tamaño de la secuencia de ADN es inferior a 1000 pares de bases.

La Traspaina es un antígeno quimérico que incluye el dominio N-terminal de la Cruzipaina, la región central de ASP2 (TS-GII) y un pequeño fragmento de TS-GI que actúa como “*linker*” o nexa entre los dos primeros (Sanchez Alberti et al., 2017). En ratones, la administración intranasal de Traspaina junto al adyuvante di-AMP-c desencadenó la producción de IgG

específicas (predominantemente contra ASP2) y con capacidad neutralizante, mientras que la respuesta celular específica también se vió incrementada y mostró un perfil compatible con un sesgo Th1/Th17 y un incremento de la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8. Los ratones inmunizados e infectados por vía intraperitoneal exhibieron una menor sintomatología en la fase aguda y un menor grado de lesión tisular durante el período crónico de la infección (Sanchez Alberti et al., 2017).

### 1.14.3 Transialidasa en vacunas de ADN

Las vacunas de ADN consisten en una secuencia de ADN que codifica para el antígeno de interés. Tras ser captado por las células del individuo vacunado, este se copiará a ARN y luego se traducirá a proteína, la que estimulará al sistema inmune. Estas vacunas son simples de producir, relativamente económicas y estables, lo cual facilita su producción a gran escala (Clem, 2011). Los primeros estudios preclínicos que utilizaron esta estrategia consistieron en la administración de ADN plasmídico que codificaba para el fragmento del dominio catalítico de la TS. Los ensayos de inmunogenicidad fueron exitosos en términos de inmunidad humoral y celular, mientras que los estudios de protección mostraron una reducción significativa en la parasitemia y la mortalidad (Costa et al., 1998).

También se realizaron estudios que combinaron la administración secuencial del plásmido p154/13-TS seguida de dos dosis de TS recombinante (estrategia de “prime-boost”) que otorgó buenos resultados en materia de inmunogenicidad, pero con una eficacia relativamente baja (Vasconcelos et al., 2003). La administración del mismo plásmido pero coadyuvado por IL-15, mostró incluso una buena eficacia tras 6 meses de finalizado el esquema de vacunación (Eickhoff et al., 2011).

El ADN se puede vehicular dentro de las células del hospedero en forma desnuda (“*naked DNA*” o ADN plasmídico”), o bien utilizando un vector viral o bacteriano. Los Ad5 son uno de

los vectores más utilizados en el diseño de vacunas, ya que, entre otras propiedades, tienen la capacidad de inducir una respuesta celular de tipo Th1. El uso combinado de dos Ad5 modificados genéticamente que codificaban fragmentos de TS o ASP2 también reportaron niveles elevados de anticuerpos específicos, un sesgo hacia el perfil Th1, logrando muy buenos niveles de protección dependiente de linfocitos T CD8 (Machado et al., 2006). Más recientemente, la Traspaina fue probada en un sistema “prime-boost” que consistió en la administración dos dosis de un vector bacteriano (*Salmonella enterica serovar Typhimurium aroA 7207*) que transportaba el plásmido que codificaba para Traspaina, seguidos de dos refuerzos de la quimera recombinante emulsionada en di-AMP-c. Este esquema vacunal logró una fuerte reducción de los parásitos en sangre, una respuesta celular específica sesgada al perfil Th1/Th17, y una reducción del daño cardíaco (Sanchez-Alberti et al., 2020).

En un trabajo realizado recientemente por nuestro grupo, se demostró que la administración oral de una cepa de *L. lactis* que expresa un fragmento antigénico de la TS y conjuntamente sobre-expresa el mensajero secundario di-AMP-c provocó una respuesta inmunogénica celular evidente (Quintana et al., 2018). Sin embargo, los ensayos de protección tras la infección oral o intraperitoneal fracasaron, probablemente debido al establecimiento de mecanismos de tolerancia inmunológica y a una baja producción de anticuerpos circulantes (resultados no publicados).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Idealmente, los candidatos vacunales a utilizarse en una vacuna contra *T. cruzi* deben ser altamente inmunogénicos, expresarse en las formas amastigote y tripomastigote, estar conservadas y expresarse en los diferentes DTUs de *T. cruzi*, y por último, ser parte de una molécula crucial para el patógeno. Asimismo, existe un consenso en la comunidad científica en torno al tipo de respuesta inmune que debería inducir una vacuna profiláctica y potencialmente esterilizante contra *T. cruzi*. Esta formulación vacunal debería inducir no solo una apropiada respuesta de anticuerpos, sino también una potente respuesta celular específica de tipo Th1/Th17.

En este contexto, nuestra hipótesis de trabajo postula que formulaciones vacunales basadas en TS-GI recombinantes generarían una respuesta protectora contra *T. cruzi*, particularmente cuando son administradas a nivel nasal.

En base a ello nos propusimos los siguientes objetivos:

### 2.1 Objetivo general

Evaluar la antigenicidad, inmunogenicidad y eficacia profiláctica de distintos prototipos vacunales contra *T. cruzi* basados en el uso de proteínas recombinantes de TS-GI.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar en un modelo pre-clínico la inmunogenicidad de formulaciones vacunales basadas en fragmentos recombinantes de TS-GI, adyuvadas con di-AMP-c y administradas a nivel de mucosas.

- ✓ Valorar en un modelo pre-clínico el grado de protección ejercido por formulaciones vacunales basadas en fragmentos recombinantes de TS-GI, adyuvadas con di-AMP-c y administradas a nivel de mucosas.
- ✓ Analizar *in silico* la variabilidad de las secuencias de TS-GI entre distintos linajes de *T. cruzi* y su potencial influencia en el desarrollo de vacunas.
- ✓ Analizar *in silico* las características antigénicas de distintos fragmentos de TS-GI utilizados en vacunas preclínicas.

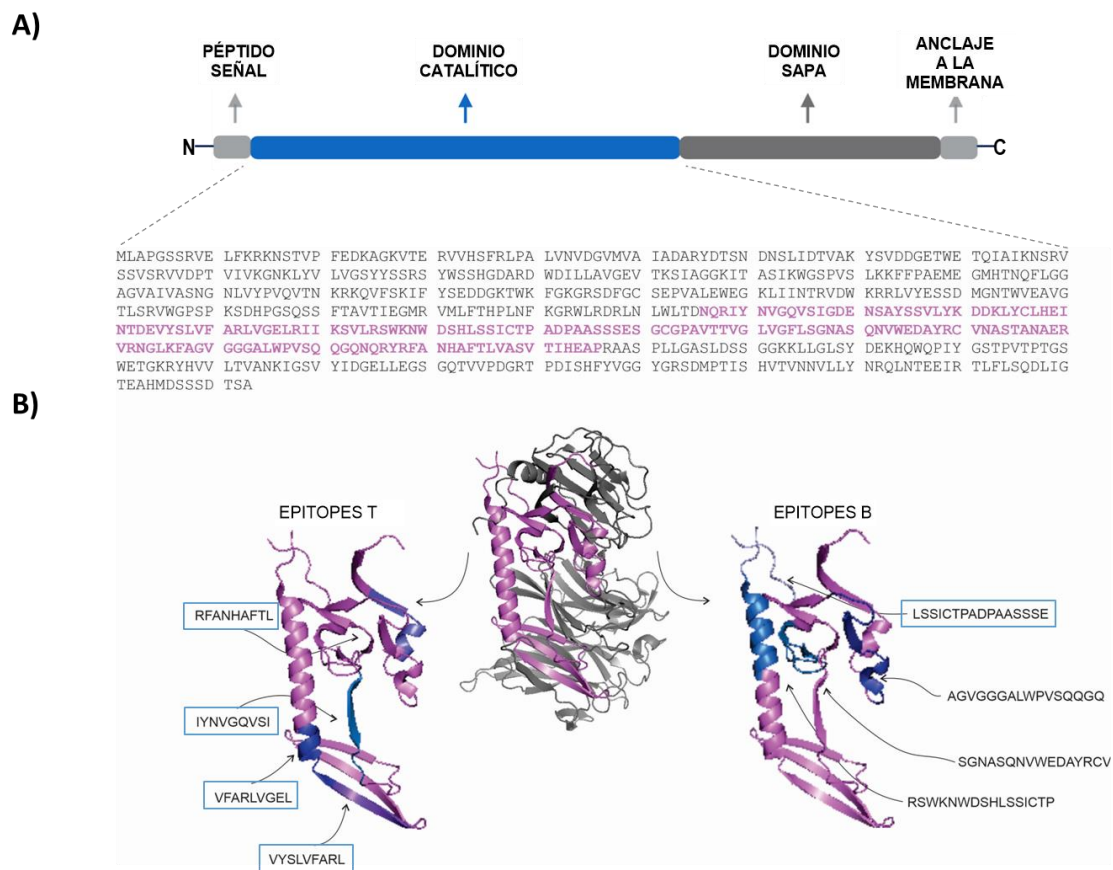
## 3. CAPÍTULO 1

*Evaluación preclínica de la inmunogenicidad y eficacia de una formulación vacunal basada en el fragmento C-terminal del dominio catalítico de la enzima Transialidasa administrada por vía nasal*

### 3.1 INTRODUCCIÓN

Estructuralmente, las TS-GI constan de dos dominios, uno corresponde a la región catalítica, responsable de su función y el otro es denominado región SAPA.

En una primera etapa, nos propusimos evaluar la inmunogenicidad y eficacia protectora de un fragmento recombinante que carece del dominio SAPA y que corresponde al extremo C-terminal del dominio catalítico. Este fragmento abarca la fracción comprendida entre los aminoácidos 326 y 496 de la secuencia original. El mismo había sido previamente seleccionado por nuestro grupo de trabajo, en el marco de una colaboración CONICET-SANOFI, en donde se utilizaban bacterias *L. lactis* como vectores de expresión y delivery. Para asegurar la expresión heteróloga de la TS en *L. lactis*, este fragmento había sido seleccionado en función de su tamaño y antigenicidad, por lo cual se se optó por la secuencia más pequeña posible (Le Loir et al., 2005) que ostentara la mayor densidad de epítomos T y B, tal como se observa el la Fig. 14.



**Figura 14: Selección del antígeno. A)** Esquema representativo de la secuencia completa de la proteína TS-GI, mientras que el fragmento TS seleccionado aparece resaltado en rosa. **B)** Modelado de la estructura del fragmento recombinante de TS-GI visualizado utilizando el sistema de gráficos estructurales PyMol v1.3 (<http://www.pymol.org>). La predicción de epítomos T restringidos por H-2K<sup>d</sup> se realizaron mediante la utilización del servidor de predicción Propred-1 y para predecir los epítomos lineales B el servidor de predicción ABCpred. Los epítomos encuadrados coinciden con epítomos que se han validado previamente en forma experimental. Imagen adaptada de Pacini et al 2022.

Este fragmento luego se expresó en forma heteróloga en *L. Lactis* LL5 y LL7, la cual tras su administración oral, generaba una respuesta celular apreciable en un modelo animal, pero carecía de eficacia profiláctica (Quintana et al., 2018; y resultados no publicados). Dado que era posible que el ambiente adverso de la mucosa digestiva fuera la causa de la escasa respuesta observada, posteriormente se decidió evaluar la inmunogenicidad y eficacia protectora una nueva formulación vacunal basada en el mismo fragmento recombinante, expresado en *L. lactis* y posteriormente purificado, coadyuvado por di-AMP-c y administrado por una vía mucosal alternativa.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Evaluar la inmunogenicidad y eficacia profiláctica de un prototipo vacunal basado en un fragmento recombinante C-terminal del dominio catalítico de la proteína TS-GI, formulada con el adyuvante di-AMP-c y administrada por vía intranasal.*
- *Evaluar si esta formulación vacunal permite prevenir las lesiones tisulares generadas durante la fase aguda experimental.*

## 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.3.1 Expresión y purificación del fragmento recombinante C-terminal del dominio catalítico de la proteína TS-GI

El fragmento C-terminal del dominio catalítico utilizado en este capítulo se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico de la cepa Y GenBank: AJ276679.1 como se describió previamente por nuestro grupo (Quintana et al., 2018). Brevemente, el gen codificante fue clonado en pUC57 y posteriormente subclonado en el plásmido pNZ8048 (de Ruyter et al., 1996), al que se denominó pNZ-TS. La cepa *L. lactis* NZ9000 clpP-htrA fue electroporada con el plásmido anterior y la nueva cepa fue denominada *L. lactis* LL5. Luego, la cultivó en medio M17G a 30°C hasta una  $DO_{600}=0,5$ , y posteriormente se indujo la expresión génica durante 3 h con 5 ng/mL de nisina. Para la purificación de la proteína recombinante, las células se lisaron con un *mini-beadbeater-16* (Biospec, Bartlesville, USA) en solución de lisis que contenía (Tris-HCl 30 mM pH 8,0 y urea 8 M), utilizando perlas de vidrio. El lisado se clarificó por centrifugación y luego se agregó

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Imidazol a una concentración final de 100 y 5 mM, respectivamente, y el pH se ajustó a 8,0. El lisado clarificado se colocó en una columna de afinidad Ni<sup>2+</sup>-NTA (Qiagen) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h para permitir la unión. La proteína se replegó mediante pasajes sucesivos en *buffer C* (mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 5 % de glicerol) y concentraciones decrecientes de urea (6 a 0 M). Tras el lavado de la columna con *buffer C*/imidazol 25 mM, la proteína se eluyó de la misma utilizando *buffer C*/imidazol 500 mM. La proteína purificada se dializó contra PBS/glicerol al 5 % y luego se almacenó a -80 °C.

En este capítulo usaremos el término genérico TS para referirnos a este fragmento C-terminal derivado del dominio catalítico de la TS-GI, a menos que se indique lo contrario.

### 3.3.2 Adyuvante

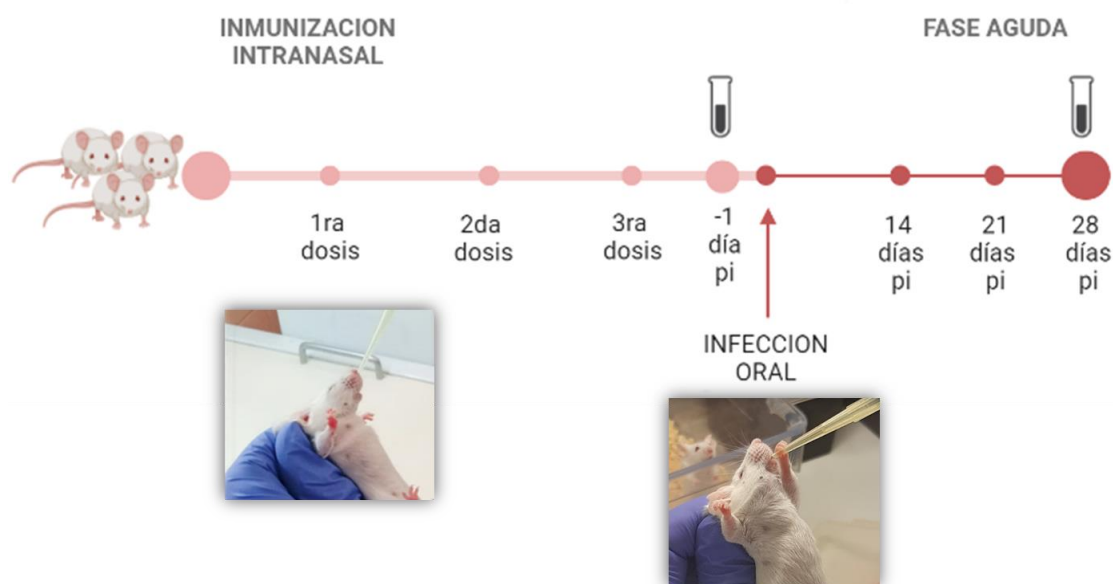
Como adyuvante se utilizó el di-AMP-c (Sigma-Aldrich, USA) el cual se disolvió en H<sub>2</sub>O destilada en condiciones estériles y se almacenó a -80 °C. La dosis utilizada fue de 5 µg/ratón.

### 3.3.3 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembras BALB/c (6–8 semanas de edad), procedentes del Laboratorio de Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (LAE-FCV-UNLP). Los mismos se mantuvieron en gabinetes ventilados con filtros HEPA, con control de temperatura y humedad y manteniendo ciclos de luz oscuridad de 12 h, en las instalaciones del Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina (CIPReB-FCM-UNR). Todos los protocolos para los estudios en animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (Res. Nro: 6698/2014 y Nro: 2958/2018).

### 3.3.4 Diseño experimental

En la Fig. 15 se puede observar el esquema experimental utilizado en este capítulo.



**Figura 15: Esquema experimental de trabajo.** Administración profiláctica de formulaciones basadas en un fragmento C-terminal del dominio catalítico de la TS adyuvado o no con di-AMP-c, y posterior evaluación de la eficacia vacunal en un modelo agudo de infección

### 3.3.5 Protocolo de inmunización

Los animales fueron inmunizados por vía intranasal con 3 dosis, administradas en intervalos de 15 días. El volumen de cada dosis fue de 20  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{L}$ /fosa nasal). Los grupos de trabajo fueron los siguientes:

- Grupo SS:** animales a los que se le administró solución salina;
- Grupo TS:** animales a los que se le administró 10  $\mu\text{g}$  del fragmento recombinante correspondiente al extremo C-terminal de región catalítica de la TS diluido en el vehículo, sin adyuvante;
- Grupos TS+A:** animales a los que se le administró 10  $\mu\text{g}$  del fragmento recombinante correspondiente al extremo C-terminal de región catalítica de la TS, más 5  $\mu\text{g}$  de di-AMP-c;

d) **Grupo A:** 5 µg de di-AMP-c.

Para la evaluación de daño tisular, se agregó un grupo control adicional que consistió en animales no inmunizados ni infectados (**Grupo NI**), los que se mantuvieron bajo las mismas condiciones de trabajo. Para la evaluación de la inmunogenicidad de las formulaciones, se utilizaron de 4–7 animales/grupo y un número similar para determinar la eficacia de las mismas. Se llevaron a cabo dos rondas experimentales.

### 3.3.6 Evaluación de la inmunogenicidad

Transcurridos 15 días de finalizado el esquema de inmunización, se realizaron distintas pruebas tendientes a evaluar la respuesta humoral y celular gatillada por la TS recombinante adyuvada por di-AMP-c. Los mismos se describen a continuación.

#### 3.3.6.1 Determinación de anticuerpos específicos en plasma y muestras fecales

Se obtuvo sangre a partir de la vena facial utilizando tubos eppendorf heparinizados. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm para la obtención de plasmas, los que posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Dado que los animales estaban agrupados de 3-4 individuos por caja, las muestras fecales de cada grupo se recolectaron en forma conjunta en tubos eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, 0,4 gramos de heces se resuspendieron en 2 mL de un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche,USA), se centrifugaron 20 min a 7000 rpm a 4°C, y se almacenaron -20°C hasta su uso.

La producción de anticuerpos específicos contra el fragmento recombinante de la TS se realizó mediante ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) directo. Para ello, microplacas de 96 pocillos (Nunc-Inmuno Maxisorp™, Thermo, USA) se recubrieron con el fragmento recombinante (0,5 µg/pocillo) diluido en una solución amortiguadora carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6). Después de incubar las mismas durante la noche (o.n.), las placas se lavaron con solución fosfato (PBS)/Tween-20 al 0,05 % y se bloquearon con PBS/albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, USA) al 5 % durante 1 hora y se enjuagaron con PBS/Tween-20 0,05%. El plasma y los extractos fecales se diluyeron en PBS/BSA al 0,5 % según una estandarización realizada previamente en nuestro Instituto (Bontempi et al., 2015; Fontanella et al., 2008) y se incubaron en las placas sensibilizadas con la TS por duplicado durante 2 h en un volumen final de 100 µL/pocillo. Las placas se lavaron y fueron luego incubadas con anticuerpos policlonales anti-IgG<sub>2a</sub> o anti-IgG<sub>1</sub> de ratón conjugados peroxidasa de rábano picante (HRP) diluidos 1:10000 (BD Biosciences, USA); o bien con anti-IgA de ratón conjugada a biotina/estreptavidina-HRP diluida 1:5000 (BD Biosciences, USA). Las muestras se leyeron a 450 nm con corrección a 545 nm en un lector ELISA (Epoch Biotek Instruments) luego de incubar las mismas con 100 µl de trimetilbencidina lista para usar (Sigma,USA) y la adición posterior de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Wiener Lab, Argentina). Los valores de densidad óptica (OD) para la medición de Igs se ajustaron restando la lectura de OD del diluyente (blanco).

### 3.3.6.2 Ensayo de inhibición de la invasión parasitaria

Se cultivaron células Vero en botellas de 5 mL a 37 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS, 10 % v/v) y penicilina-estreptomycin-glutamina (1 % v/v), ambos de Gibco, USA, en una atmósfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub>. Para el ensayo de inhibición de la invasión de parásitos, se

sembraron  $2,5 \times 10^4$  células Vero en placas de 24 pocillos que contenían cubreobjetos de vidrio redondos estériles de 12 mm de diámetro. Luego de 5 h de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , las células se infectaron con  $2,5 \times 10^5$  tripomastigotes sanguíneos previamente incubados durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$  con el plasma procedente de cada grupo inmunizado, diluido 1:50 en DMEM o sin plasma. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron con PBS, se tiñeron con Tinción 15 (Biopur SRL, Argentina) y se montaron sobre el portaobjeto con solución de montaje. Se registró el número de amastigotes/célula y el porcentaje de inhibición de la invasión se calculó como sigue:  $\{1 - [(n^\circ \text{ de células infectadas en presencia de plasma inmune}) / (n^\circ \text{ de células infectadas en ausencia de plasma inmune})]\} \times 100$ .

### 3.3.6.3 Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada

Los animales fueron inoculados con 5  $\mu\text{g}$  del fragmento purificado de *L. lactis* en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha, siguiendo el protocolo de Bontempi y colaboradores (Bontempi et al., 2015). La almohadilla de la pata trasera opuesta se utilizó como control interno. La inflamación de las almohadillas se cuantificó con un calibrador Vernier digital antes de la inoculación del antígeno y después de 24 y 48 h. La inflamación resultante se expresó como la diferencia de espesor (delta,  $\Delta$ ) entre el valor en mm arrojado por la almohadilla plantar control y la inoculada con el fragmento recombinante.

### 3.3.6.4 Cultivo de esplenocitos y estimulación *ex vivo*

Brevemente, los bazos se recogieron asépticamente y se homogeneizaron en Roswell Park Memorial Institute medium -RPMI- 1640 (Gibco). Los eritrocitos se lisaron mediante la adición de una solución de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15 M,  $\text{KHCO}_2$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM, pH:

7,3), y luego los esplenocitos se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10 % (Gibco, USA), penicilina (100 g/mL, Sigma, USA), estreptomina (100 U/mL, Sigma, USA) y 2-mercaptoetanol 0,4 mM (Wiener Lab, Argentina). Luego,  $1 \times 10^6$  células/pocillo se cultivaron en placas de 48 pocillos (GBO, Austria) en medio RPMI 1640 completo. Las muestras fueron estimuladas o no con TS (10  $\mu$ g/pocillo). Esplenocitos provenientes de animales SS fueron también tratados con Concanavalina A (2,5 g/mL) como control positivo de estimulación. Luego de 60 h de cultivo, las células se recolectaron y lavaron. Posteriormente, para determinar la producción de IFN- $\gamma$ , los esplenocitos se se estimularon en presencia de brefeldina A (BD GolgiPlug, BD Pharmingen, USA) durante 4 h a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, como se informó anteriormente (Bontempi et al., 2015). Estos estudios fueron realizados pre y post-infección.

### 3.3.6.5 Citometría de flujo

Los esplenocitos procedentes de los animales inmunizados y reestimulados con TS, se incubaron con anticuerpos anti-FcII/III-R, se lavaron e incubaron con anti-CD4/PE-Cy7 y anti-CD8/PE (BD Pharmingen, USA) durante 30 min. Luego, las células se lavaron y resuspendieron en una solución de permeabilización/fijación durante otros 30 min a 4°C, y tras un nuevo lavado se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ /FITC de ratón (BD Pharmingen, USA). Posteriormente, las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSAria II (Beckton-Dickinson, USA). En los análisis, las células muertas se eliminaron en función de la dispersión de la luz en diferentes ángulos (dispersión frontal -FCS- y dispersión lateral -SSC-). Se adquirió un mínimo de  $1 \times 10^5$  eventos para cada muestra. En todos los casos, se restaron los valores de tinción basal obtenidos con los controles de isotipo conjugados con los mismos fluorocromos. Los

análisis de frecuencia e intensidad de fluorescencia se realizaron utilizando el software FlowJo (Beckton Dickinson, USA). Estos estudios fueron realizados pre y post-infección.

### 3.3.7 Evaluación de la eficacia protectora

La vía de infección utilizada en este caso para evaluar protección fué la vía oral. Esta vía se seleccionó ya que: 1) Es una vía de transmisión emergente en América Latina, 2) Permitía evaluar si la administración de la formulación vacunal a nivel de la mucosa nasal, generaba tanto inmunidad mucosal como sistémica. Asimismo, cabe aclarar que el modelo utilizado es no letal, hecho que impide que la sobrevida pueda utilizarse como punto final del estudio. Debido a esto, y para lograr una mayor apreciación de la eficacia vacunal, se confeccionó un score *ad hoc* teniendo en cuenta distintos signos clínicos que tienen lugar durante la infección.

#### 3.3.7.1 Protocolo de infección y determinación de la parasitemia

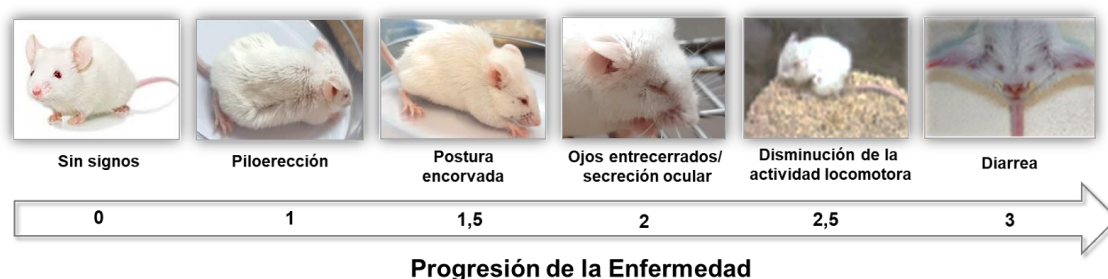
Transcurridos 15 días de la última inmunización, los animales fueron infectados por vía oral con 2500 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén (DTU-VI). Los animales fueron privados de alimento *ad libitum* 4 h antes de la infección y al menos 15 minutos después de la inoculación. La misma fue realizada con un pipeta, depositando lentamente 100 µL de una suspensión de parásitos en la mucosa bucal, tal como se informó previamente (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015).

La parasitemia se cuantificó cada 7 días mediante la evaluación microscópica directa de 5 µl de sangre heparinizada entre portaobjeto y cubreobjeto de 22x22mm. En cada muestra, se contabilizó el número de parásitos presentes en 50 campos, a un aumento de 40X, y dicho número luego se transforma a parásitos/mL. Los parásitos utilizados en

los procedimientos experimentales, se obtienen a partir de la sangre de ratones CBI machos destete, infectados con  $1,5 \times 10^5$  parásitos Tulahuén.

### 3.3.7.2 Score clínico

Para estimar el impacto clínico de la eficacia protectora, desarrollamos un sistema de puntuación o “score” clínico, en base a diferentes signos o manifestaciones que tienen lugar durante la infección aguda en ratones. Estos signos aparecen en forma gradual y progresan con la severidad de la infección. De esta forma el impacto clínico de la infección se monitoreó utilizando la escala de clasificación que se observa en la Fig. 16.



**Figura 16:** Puntuación asignada a cada una de las manifestaciones clínicas observadas en los ratones infectados durante la etapa aguda de la infección.

Los signos clínicos se registraron diariamente tras la infección. La puntuación individual se computó como la suma de los valores preestablecidos para cada signo clínico (por ejemplo: piloerección más postura encorvada: 2,5). La puntuación global de cada grupo/día se calculó como la media de las puntuaciones individuales. Por último, el score acumulado de cada grupo se determinó como el área bajo la curva (AUC) (Blättner et al., 2016; Shahi et al., 2019). El peso de los animales se controló en forma semanal y la supervivencia se registró diariamente.

### 3.3.7.3 Determinación de la carga parasitaria en músculo esquelético y cardíaco

En estudios previos nuestro grupo ha observado que la cepa Tulahuén, además de ser una cepa predominantemente reticulotrópica, tiene también un gran tropismo por el músculo cardíaco y esquelético. Por este motivo, se evaluó en corazón y músculo esquelético la carga parasitaria, siguiendo el método de qPCR descrito en Cummings y Tarleton (Cummings and Tarleton, 2003). A partir de cada tejido, se extrajo el ADN total y se purificó utilizando el kit QIAamp DNA mini (QIAGEN GmbH, Dinamarca). Las muestras de ADN se ajustaron a una concentración final de 25 ng/ $\mu$ L. Se utilizaron los siguientes cebadores específicos para *T. cruzi* que reconocen una secuencia satélite de 182 pb presente en el genoma del parásito:

TCZ-F(5'-GCTCTTGCCCACAAGGGTGC-3')

TCZ-R(5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3')

Adicionalmente, como control interno, las muestras también fueron amplificadas utilizando cebadores específicos para la secuencia murina del TNF- $\alpha$ :

TNF-5242 (5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3')

TNF-5411 (5'-CAGCAAGCATCTTAGCACTTAGACCCC-3')

Las curvas de calibración de *T. cruzi* se prepararon mezclando 250 mg de corazón o músculo de ratones no infectados con una alícuota de  $1 \times 10^7$  tripomastigotes sanguíneos procedentes de ratones CBi infectados y contados en cámara de Neubauer. Se extrajo el ADN total y la concentración final se ajustó a 25 ng/mL. A continuación, las curvas se construyeron mediante diluciones en serie usando ADN de tejidos no infectados (25 ng/mL) como diluyente. También se construyó otra curva estándar para la cuantificación de ADN murino (100–12,5 ng). Se emplearon como controles negativos, ADN

procedente de un ratón sano y agua destilada sin ADN (blanco). Las muestras se corrieron por duplicado en cada ensayo y se analizaron en paralelo a sus correspondientes curvas de calibración en cada ensayo. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus con ROX (Solis BioDyne, Estonia). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA). La carga de parásitos se expresó como equivalentes de parásitos/50 pg de ADN murino.

#### 3.3.7.4 Detección de ADN del kinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* en sangre

Se colocaron 50 µL de sangre de ratones infectados en 100 µL de una solución de Guanidina 6 M más EDTA 0,2 M (pH 8,0). Las muestras se hirvieron durante 15 min y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante una secuencia de pasos de separación y precipitación en cloroformo/isopropanol/etanol (Cummings and Tarleton, 2003). Una vez obtenido el ADN, se disolvió en 50 µL de agua ultrapura estéril. El ADN del parásito se amplificó con los cebadores específicos: S121 (F 5'-AAATAATG TACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') y S122 (R 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'), que detectan un fragmento específico de ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* de 330 pb. La PCR se realizó según Velazquez y col. (Velazquez et al., 2008). Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó un marcador de peso molecular que oscilaba entre 10.000 y 300 (marcador de ADN en escalera, Axygen 1 Kb). Se incluyeron controles de ADN negativos y positivos (tripomastigotes de sangre y agua destilada respectivamente) en cada reacción de PCR.

### 3.3.7.5 Histopatología

Al día 28 pi, porciones de tejido muscular y cardíaco (conteniendo aurículas y ventrículos) extirpados de los ratones inmunizados se fijaron en formol 4% durante 48 h y posteriormente se embebieron en parafina. Posteriormente, cortes de 5  $\mu$ m se tiñeron con hematoxilina/eosina para la evaluación del parasitismo tisular y la intensidad y magnitud de los infiltrados inflamatorios. La miocarditis y la inflamación del músculo esquelético se clasificó de la siguiente manera: Normal (sin infiltrados inflamatorios), Leve (Infiltración leve, con daño de pocas fibras musculares), Moderado (los infiltrados comprometen más de 3-5 fibras musculares), y Severo (Infiltrados de gran tamaño que provocan la destrucción de múltiples fibras musculares); como se informó anteriormente (Bontempi et al., 2015; Roggero et al., 2002). También se registraron las características de los infiltrados (focales o difusos). Los infiltrados inflamatorios encontrados en el tejido adiposo se clasificaron según su tamaño en Leves, Moderados o Severos.

Las muestras fueron analizadas por un patólogo experto, que desconocía los datos (Dr. Eduardo Roggero). De cada tejido se evaluaron entre 4-6 cortes utilizando un microscopio Zeiss equipado con una cámara digital Nikon. Finalmente, considerando la inflamación registrada en cada corte, se asignó el siguiente puntaje: Normal:0, Leve: 1, Moderado:2 y Severo:3, que permitió determinar el *score* global como la suma de los puntajes individuales (Blättner et al., 2016; Shahi et al., 2019).

### 3.3.8 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas (prueba ANOVA Kruskal-Wallis (k grupos > 2), seguida de la prueba U de Mann Whitney (para comparaciones entre dos grupos). Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad InStat 4.0

(GraphPad, California, USA). Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando el valor de p fue  $< 0,05$ .

### 3.4 RESULTADOS

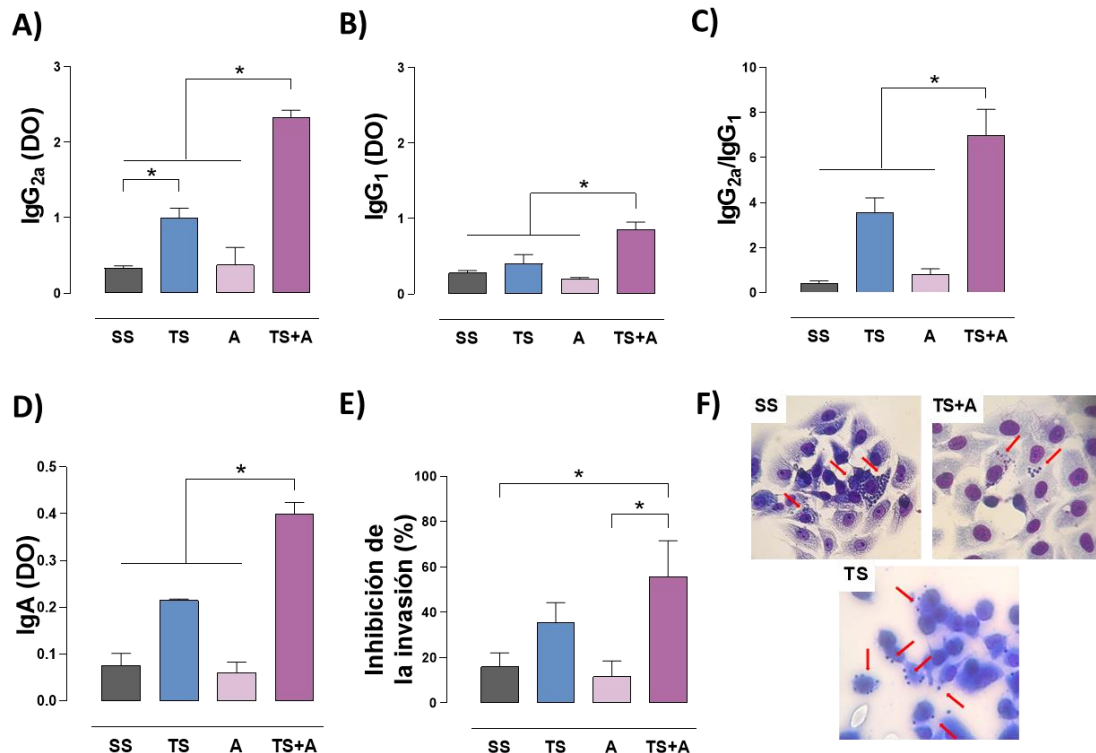
#### 3.4.1 Inmunogenicidad de las formulaciones administradas por vía intranasal

El análisis de la respuesta inmune humoral específica gatillada luego de 15 días de finalizado el esquema vacunal (Fig. 17A-B), mostró que los animales que habían sido inmunizados por vía intranasal con el fragmento de la TS en ausencia de adyuvante, presentaban niveles plasmáticos de IgG<sub>2a</sub> más significativos que los animales SS, mientras que no presentaban entre ellos diferencias en IgG<sub>1</sub>. En comparación, los animales inmunizados con TS+A mostraron una respuesta sustancial en términos de IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>1</sub> en comparación con los grupos TS y SS. El grupo control A no mostró diferencias con el grupo SS. Además, la formulación TS+A generó un incremento significativo en la relación IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub> (Fig. 17C), lo que sugería que la misma promovía una respuesta de tipo Th1.

La presencia de IgA en los extractos fecales se considera un reflejo de la producción de esta inmunoglobulina en la mucosa digestiva. Su evaluación mostró que la administración de TS+A causó un aumento significativo de IgA en las heces (Fig. 17D). Los animales que solo recibieron el fragmento recombinante de la TS mostraron un aumento menor de IgA en comparación con TS+A.

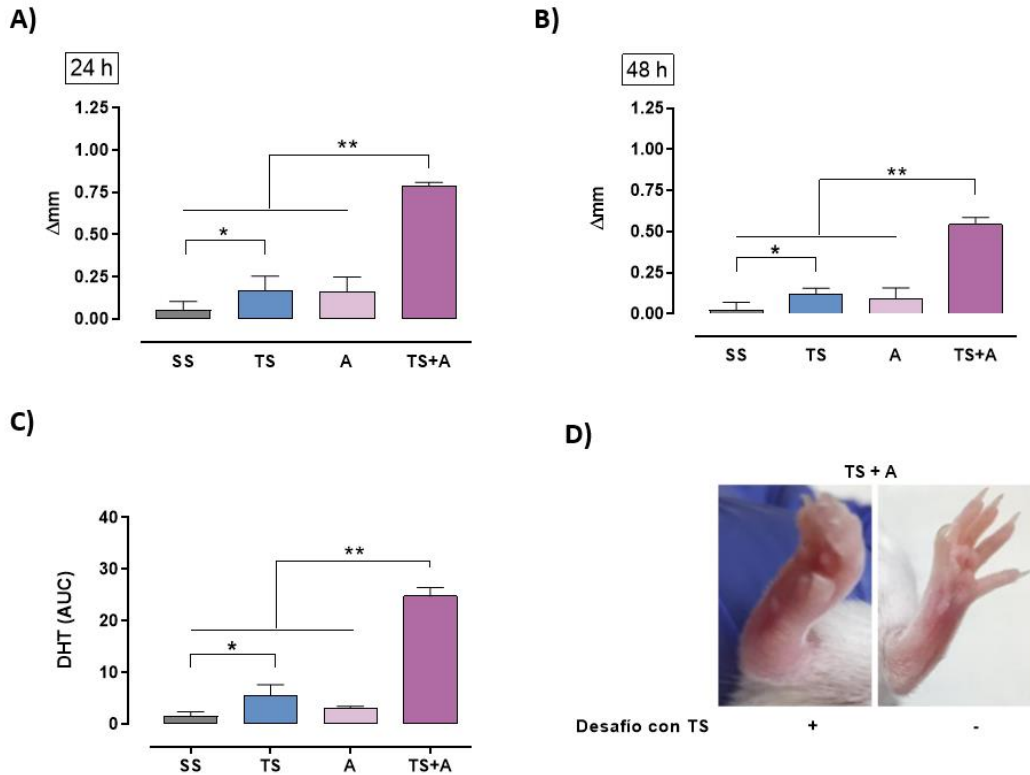
Los anticuerpos neutralizantes se definen por su capacidad para bloquear *in vitro* la entrada de distintos microorganismos. Tal como puede observarse en las Fig. 17E y 17F, los anticuerpos presentes en el plasma de ratones inmunizados con la formulación

TS+A mostraron una mayor capacidad para prevenir el ingreso de los parásitos a las células y la consiguiente replicación intracelular en células Vero, en comparación con el resto de los grupos.



**Figura 17: Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados por vía intranasal.** Quince días luego de finalizada la inmunización, los niveles de anticuerpos específicos dirigidos contra el fragmento recombinante de la TS se evaluaron en suero y extractos fecales mediante ELISA indirecto y determinación de densidad óptica (DO) a 450/540 nm. **A)** Niveles plasmáticos de IgG<sub>2a</sub> específicos; **B)** Niveles plasmáticos de IgG<sub>1</sub> específicos; **C)** Relación IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub>; **D)** Niveles de IgA específica en extractos fecales; **E)** Porcentaje de inhibición de la invasión. **F)** Imágenes representativas de células Vero infectadas y teñidas luego del ensayo de inhibición de la infección, en donde pueden observarse amastigotes intracelulares. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . Datos representativos de dos experimentos independientes ( $n = 5-7$ /grupo).

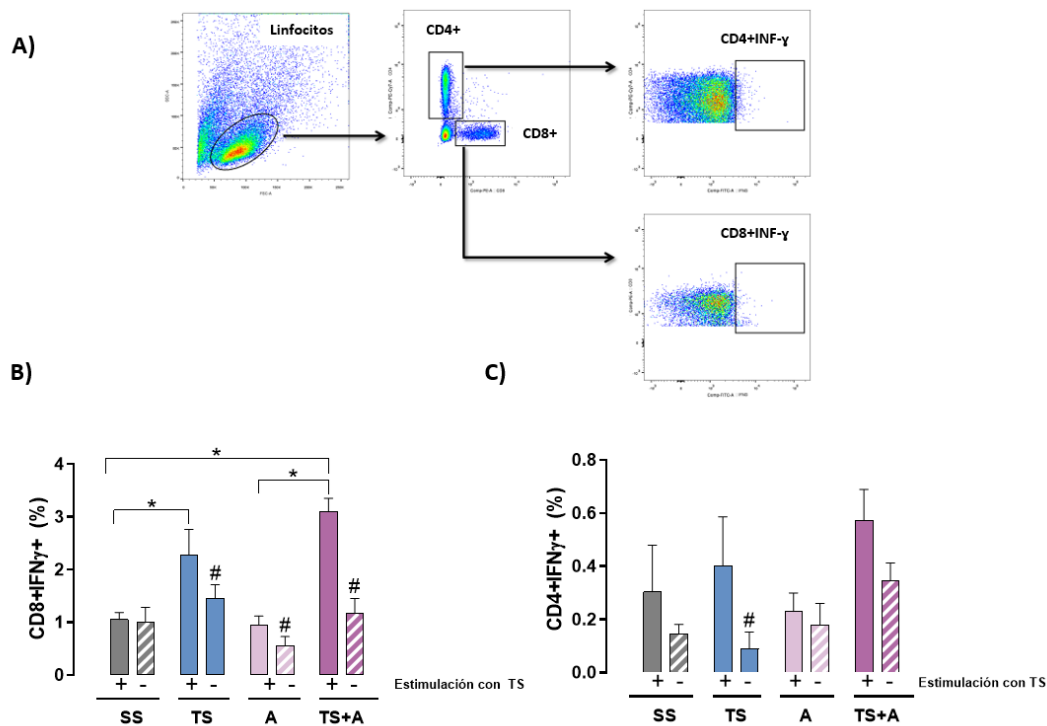
El análisis de la respuesta humoral indica que la formulación TS+A indujo una respuesta sistémica específica contra el fragmento recombinante de TS más significativa que el resto de los grupos, con predominio de IgG<sub>2a</sub> y capacidad neutralizante, y a la vez incrementó la producción de IgA específica en la mucosa digestiva.



**Figura 18: Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada.** Grosor de la almohadilla plantar tras la inyección intradérmica de 5  $\mu$ g del fragmento recombinante correspondiente al extremo C-terminal del dominio catalítico de la TS. Los resultados se expresan como la diferencia entre el valor de la almohadilla plantar control y la inoculada con TS (delta,  $\Delta$ ). Diferencias en el grosor obtenidos tras: **A)** 24 h y **B)** 48 h. **C)** El área bajo la curva (AUC) corresponde al intervalo de 0 a 48 h luego de la re-exposición a TS. **D)** Imágenes representativas que muestran la inflamación de la almohadilla plantar en la pata derecha de un animal del grupo TS+A transcurridas 24 h de la inoculación de TS en comparación con la pata no inoculada. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 5-7$ /grupo). Los datos son representativos de dos experimentos independientes. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$

Asimismo, las pruebas de hipersensibilidad del tipo retardada (Fig. 18A-B) realizadas tras la finalización del esquema vacunal, mostraron que el engrosamiento de la almohadilla plantar fue evidentemente más significativo en los animales que habían sido inmunizados con TS+A, tanto 24 como 48 h post-inoculación. También se observaron diferencias significativas en el grado de engrosamiento plantar entre los animales inmunizados con SS y TS, aunque menores en relación a lo observado con la TS+A. La respuesta celular específica en el grupo TS+A es evidente al observar la respuesta global gatillada desde el momento de la inoculación hasta las 48 hs, representada en la figura Fig. 18C como el área bajo la curva (AUC).

Estudios posteriores realizados *in vitro* (Fig. 19A-B), mostraron que la re-estimulación *ex vivo* con TS de esplenocitos procedentes de los animales TS y TS+A, inducía una mayor proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de INF- $\gamma$ . En los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se observó un comportamiento similar, pero no significativo en términos estadísticos (n.s.). No se observaron diferencias entre el grupo A y el grupo SS.

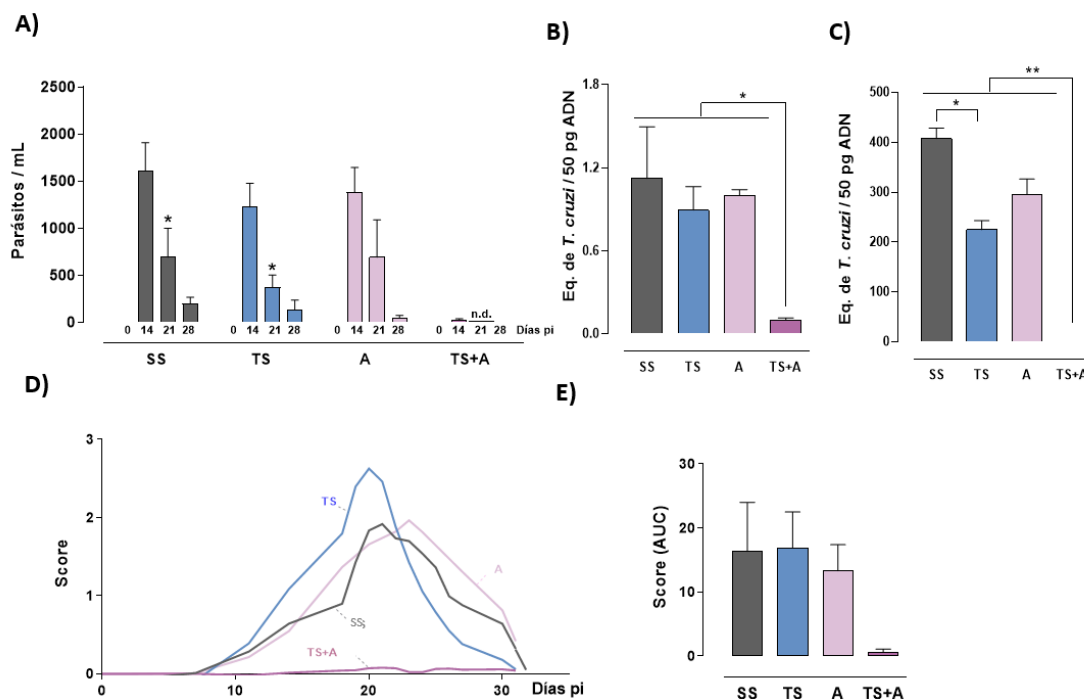


**Figura 19: Producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T específicos tras la re-estimulación *ex vivo* con TS.** Dos semanas luego de finalizado el esquema de inmunización, se extirparon los bazo de los animales inmunizados y  $1 \times 10^6$  esplenocitos se re-estimularon *ex vivo* con el fragmento recombinante correspondiente al dominio C-terminal del dominio catalítico de la TS, a fin de evaluar la secreción de INF- $\gamma$  mediada por linfocitos T específicos. Luego de 60 h de incubación, los esplenocitos se cultivaron en presencia de brefeldina A y posteriormente se procesaron para citometría de flujo **A)** Estrategia de "gating" utilizada para el análisis; **B)** Proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de INF- $\gamma$  **C)** Proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de INF- $\gamma$ . Los datos son representativos de dos experimentos independientes. \*= $p < 0,05$  versus SS; #  $p < 0,05$  versus al respectivo grupo estimulado con TS.

### 3.4.2 Evaluación de la eficacia protectora en el contexto de la infección oral

Los animales inmunizados fueron desafiados posteriormente con 2500 tripomastigotes de la cepa Tulahuen, en la cavidad bucal. Tal como se muestra en la Fig. 20A, en los grupos SS, TS y A infectados, el pico máximo de parasitemia se registró en el día 14 pi

en los grupos SS, TS y A; y niveles mucho menores en el día 28 pi. Sin embargo, la reducción de la parasitemia fue especialmente notable en los animales inmunizados con TS+A (Fig. 20A), ya que solo unos pocos animales resultaron positivos tras la examinación directa de la sangre (en cada ronda experimental: 1/6 y 2/7). Sin embargo, la evaluación molecular del ADN del kinetoplasto del parásito en sangre confirmó la existencia de parasitemias subpatentes (datos no mostrados). La formulación TS+A indujo también una clara disminución de parásitos en el corazón (Fig. 20B) y músculo esquelético (Fig. 20C) a los 28 días p.i. en comparación con el resto de los grupos.

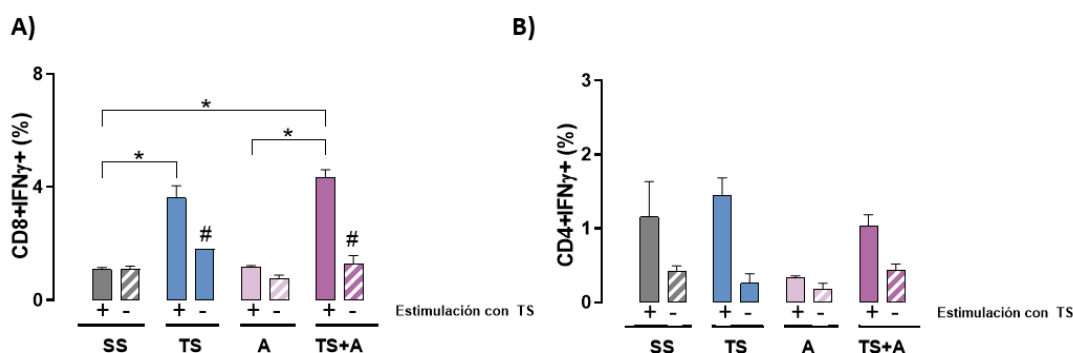


**Figura 20: Características de la infección aguda oral en los animales inmunizados.** Los animales ( $n=4-7$ /grupo) fueron desafiados por vía oral con 2500 tripomastigotes (cepa Tulahuen) 15 días luego de la última inmunización. **A)** La parasitemia se determinó a distintos días post-infección (pi) por microscopía (n.d.: no detectable). **B)** Carga parasitaria tisular determinada por qPCR al día 28 pi. **C)** Carga parasitaria del músculo esquelético determinada por qPCR tras 28 días de infección. **D)** La evaluación clínica de los animales infectados se realizó en forma diaria. Se desarrolló un score basado en puntajes para clasificar la gravedad de los signos de la enfermedad, como se indica a continuación: ausencia de signos (0), piloerección (1), postura encorvada (1,5), afectación ocular (2), disminución de la actividad locomotora (2,5) y diarrea (3). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. **E)** El grado global de afectación clínica se estimó como el área bajo la curva (AUC) de los scores clínicos registrados durante la infección.

Dada la no letalidad de nuestro modelo, desarrollamos un sistema de puntuación para reemplazar la muerte como punto final y así evaluar la eficacia de la protección vacunal

en ratones infectados por vía oral, siendo al mismo tiempo informativo sobre la progresión de la enfermedad. Como puede observarse en la Fig. 20D, los signos clínicos comienzan a aparecer alrededor de los 7 días pi. Durante la fase aguda, casi todos los grupos presentaron signos evidentes de afectación clínica, excepto el grupo que fue inmunizado con TS+A, el cual mostró una reducción significativa de la morbilidad, como se refleja en sus respectivas AUC (Fig. 20E). Independientemente del tratamiento, los signos clínicos desaparecen a los 35 días pi. Globalmente, estos resultados indican que la formulación TS+A presenta una alta eficacia protectora contra la infección oral por *T. cruzi*.

A fin de evaluar si la eficacia protectora de la formulación TS+A estaba asociada a una mayor secreción IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T también durante la fase aguda de la infección, se realizó un ensayo similar al mostrado en la Fig. 19A. Como puede observarse en la Fig. 21A, al día 28 pi., los grupos TS y TS+A infectados presentaron un incremento en la proporción de células T CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> específicas en comparación con el grupo SS infectado. Además, el grupo control A no mostró un aumento evidente de IFN- $\gamma$  en comparación con los animales SS. No se detectaron diferencias entre grupos en relación a la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Fig. 21B) luego se ser estimulados *ex vivo* con el fragmento recombinante de la TS.



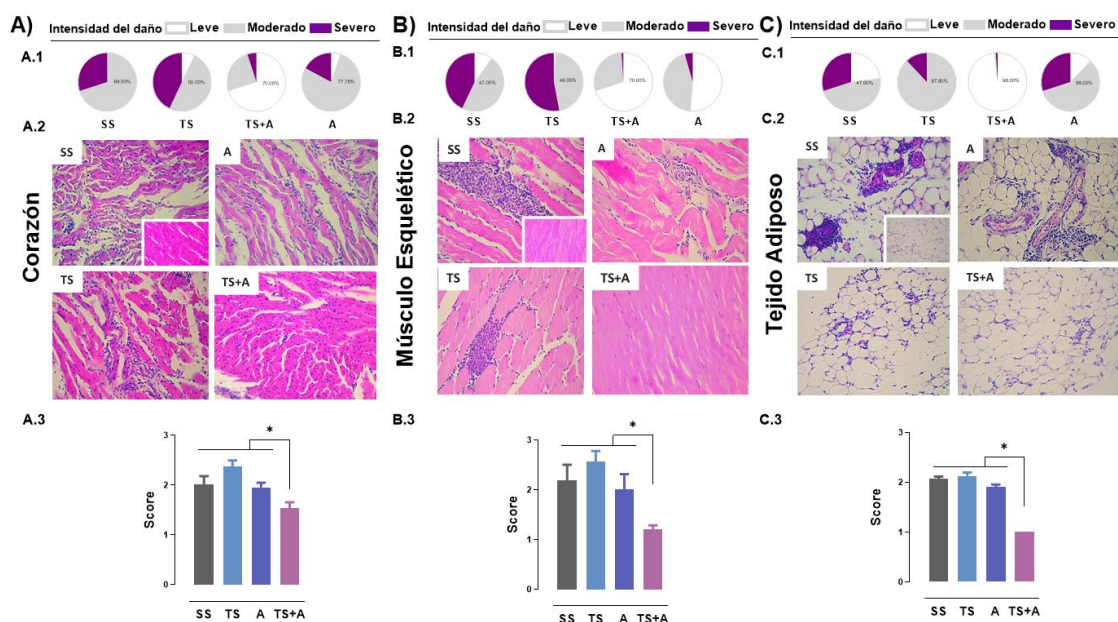
**Figura 21: Producción de IFN- $\gamma$  en linfocitos T de ratones inmunizados e infectados.** Se obtuvieron los bazos al día 28 pi y  $1 \times 10^6$  esplenocitos se re-estimularon *ex vivo* con el fragmento recombinante de TS correspondiente al extremo C-terminal del dominio catalítico. Luego de 60 H los esplenocitos se cultivaron en presencia de brefeldina A y luego se procesaron para

*citometría de flujo. A) Proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de INF- $\gamma$ ; B) Proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de INF- $\gamma$ . Los datos son representativos de dos rondas experimentales independientes. \*  $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$  versus el respectivo grupo estimulado.*

Por último, para analizar si la inmunización nasal con las diferentes formulaciones atenuaba el daño tisular causado por la infección oral por *T. cruzi*, se evaluó la intensidad de las lesiones en el miocardio, músculo esquelético y tejido adiposo al día 28 pi.

Como se observa en la Fig. 22A, los estudios histopatológicos del tejido cardíaco indicaron que, excepto los animales vacunados con TS+A, el resto de los grupos infectados presentaron predominantemente miocarditis moderada (Fig. 22A.1), que consistía en acúmulos de tamaño mediano de células mononucleares, enriquecidos en macrófagos y linfocitos y que comprometían varias fibras. Por el contrario, los corazones de los animales que habían recibido TS+A, presentaban una miocarditis leve y difusa. Asimismo, tanto el número como el tamaño de los focos inflamatorios eran menores en comparación con los otros grupos (Fig. 22A.2). El score global refleja que la administración de TS+A atenuó la miocarditis aguda tras la infección oral (Fig. 22A.3).

A nivel de músculo esquelético, los animales vacunados con SS, TS, y A presentaron grandes focos inflamatorios de intensidad moderada a severa (Fig. 22B.1). Sin embargo, los infiltrados inflamatorios del músculo esquelético de los animales vacunados con TS+A fueron significativamente menores (Fig. 22B.2), lo cual también se reflejó en una drástica disminución del daño tisular (Fig. 22B.3).



**Figura 22: Evaluación del daño tisular en animales vacunados e infectados por vía oral.** Se realizó un examen histopatológico de corazones (A), músculo esquelético (B) y tejido adiposo (C) procedentes animales a los que se le administró SS, TS, A, y TS+A, recolectados tras 28 días pi. Secciones histológicas de 5 µm se tiñeron con hematoxilina/eosina. La intensidad de los infiltrados se clasificó como leve, moderado o severo. (A-C.1) Proporción relativa de cada tipo de infiltrado inflamatorio. (A-C.2) Las imágenes muestran secciones histológicas representativas de cada tejido evaluado (Aumento 40X). La imagen pequeña localizada en la esquina inferior derecha del grupo SS muestra una imagen de tejido normal. (A-C.3) Score de daño histológico. Se le asignó al tejido normal una puntuación de 0, a los infiltrados leve: 1, moderados: 2 y severos: 3. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

Hay un cierto número de evidencias que sugieren que el tejido adiposo puede actuar como reservorio de *T. cruzi*, ya que el parásito puede infectar y persistir durante largos períodos dentro de los adipocitos y desencadenar una inflamación persistente (Combs et al., 2005). Como se observa en la Fig. 22C, al día 28 pi, se detectó un número pequeño de infiltrados inflamatorios, mayoritariamente de intensidad leve, en el tejido adiposo de los animales vacunados con TS+A en comparación con el resto de los grupos, que exhiben infiltrados predominantemente moderados a severos, adipocitos apoptóticos y daño celular (Fig. 22B.1-22B.3).

Por último, cabe destacar que si bien el número de amastigotes observado fue muy bajo en todas las formulaciones (coincidente con la disminución en la parasitemia que tiene lugar al día 28 pi), no se observó ningún nido en los animales inmunizados con TS+A.

### 3.5 CONCLUSIONES PARCIALES y DISCUSIÓN

En este estudio, evaluamos si la administración por vía intranasal de una formulación basada en un fragmento recombinante de TS y el adyuvante di-AMP-c, era suficientemente inmunogénica y capaz de potenciar la respuesta mucosal y sistémica contra el parásito tras la infección por vía oral.

En el contexto de la profilaxis contra la ECh, los estudios que examinan este tipo de vías de inmunización y desafío son realmente escasos. En un par de estudios similares, la inmunización se realizó por vía intranasal utilizando una TS diferente de la utilizada en este trabajo -ya que estaba constituida por el dominio catalítico completo- y acompañada por un agonista TLR-9 (TS+CpG), mientras que el desafío se realizó tanto a nivel de la conjuntiva. A pesar de que en estos estudios no se evaluó la administración de la proteína recombinante sin el agregado de adyuvantes, nuestros datos indican que la mera presencia de una TS recombinante en las formulaciones vacunales es insuficiente para desarrollar una respuesta protectora. Esta noción coincide con otros estudios donde se afirma que cuando la inmunización intranasal es realizada sin la presencia de un adyuvante, no se induciría protección en la mucosa, sino tolerancia antígeno-específica (Waldo et al., 1994). En línea con lo anterior, estudios previos de nuestro grupo muestran que cuando la TS (o alguno de sus fragmentos) fue administrada por vía subcutánea sin adyuvantes tampoco generó una buena respuesta protectora (Bontempi et al., 2015; Fontanella et al., 2008; Prochetto et al., 2017). Como excepción, podría mencionarse un estudio donde la respuesta hacia la TS se vió aumentada cuando esta se administró por vía subcutánea, pero no en forma recombinante sino utilizando un vector vivo (Machado et al., 2006). Estos resultados señalan la necesidad de evaluar adyuvantes nuevos y/o más efectivos para favorecer la inmunogenicidad de las

proteínas recombinantes y la eficacia de la respuesta contra el parásito a nivel de mucosas, tales como el di-AMP-c (Bivona et al., 2020; Matos et al., 2017; Quintana et al., 2018).

La respuesta protectora contra *T. cruzi* requiere de mecanismos tanto humorales como celulares. El fragmento recombinante utilizado en este estudio presenta epítomos capaces de desencadenar ambas respuestas cuando se le añade un adyuvante específico de mucosas (Quintana et al., 2018). Los epítomos B lineales que están contenidos en nuestro fragmento serían los responsables de desencadenar la producción de anticuerpos protectores, tal como ocurre con otros antígenos derivados de *T. cruzi* (Durante et al., 2017; Lesénéchal et al., 2005). Incluso, es altamente factible que algunos epítomos conformacionales estén presentes en la secuencia y promuevan de manera análoga la producción de anticuerpos específicos.

Por otra parte, los epítomos MHC-I presentes en la secuencia de las TS-GI son relevantes en términos de inmunodominancia y capacidad protectora. En particular, el epítomo inmunodominante TSKd1/IYNVGQVSI (restringido por el haplotipo H2-K<sup>d</sup>), el cual está contenido en nuestro fragmento, sería esencial para obtener buenos niveles de protección contra *T. cruzi* (Eickhoff et al., 2016). Otros 3 epítomos que aparecen en nuestro fragmento también han sido validados experimentalmente (Eickhoff et al., 2016). Sin embargo, desconocemos en qué medida cada uno de ellos influencia la respuesta celular. Estudios posteriores utilizando tetrámeras podrían dar una idea cabal de la respuesta específica que se monta contra cada epítomo presente en el fragmento utilizado.

La inducción de respuestas mucosales y sistémicas son objetivos importantes para cualquier estrategia vacunal dirigida contra patógenos intracelulares que sean capaces de invadir a través de una ruta mucosal, como *T. cruzi*. En este estudio, observamos que la inmunización con TS+A indujo una fuerte producción de IgG<sub>2a</sub> y en menor medida

de IgG<sub>1</sub>, lo que también sugiere que puede desencadenar una respuesta mixta Th1/Th2 a nivel sistémico. Incluso, la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante también se vería favorecida por la administración intranasal de TS+A.

Algunos autores sostienen que en el NALT existe un microambiente predominante Th0, el cual se diferenciaría a Th1 o Th2 luego de la estimulación antigénica apropiada, por lo cual es posible detectar linfocitos T que producen localmente citocinas de tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) o Th2 (IL-4) (Fukuyama et al., 2012; Hiroi et al., 1998). Este microambiente sería incluso capaz de sostener la producción mucosal de IgA específica e inducir paralelamente respuestas humorales y celulares sistémicas (Fukuyama et al., 2012; Hiroi et al., 1998).

En línea con lo anterior, verificamos que la administración de TS+A indujo una clara respuesta secretora de IgA a nivel de la mucosa digestiva, lo cual indica que los linfocitos B específicos generados en el NALT migran a la lámina propia y al epitelio intestinal. Es posible que estos anticuerpos bloqueen el ingreso de los parásitos a través del epitelio intestinal, pero que también lo hagan a nivel de la mucosa bucal, sitio principal de ingreso al organismo cuando la infección experimental es causada por vía oral (Silva-dos-Santos et al., 2017). Dado que en este estudio no se evaluó la presencia de IgA específica en otras mucosas, son aún necesarios más estudios para determinar de manera precisa el o los mecanismos de protección inducidos por el direccionamiento de estas los linfocitos B a otros sitios del sistema de mucosas.

En la mayor parte de los estudios relacionados con las vacunas anti-*T. cruzi* suele emplearse como un criterio de valoración de la eficacia vacunal la supervivencia del animal. Dado que la infección oral aguda por *T. cruzi* en los seres humanos suele ser muy sintomática y eventualmente mortal, los modelos animales que dan lugar a desenlaces mortales abruptos no reflejan con precisión el curso natural de la infección observado en la mayoría de los seres humanos y esto también es cierto en la

transmisión por vectores (Buckner, 2011). Sobre la base de estas observaciones, y también teniendo en cuenta las cuestiones éticas relacionadas con la experimentación en ratones de laboratorio, en este estudio empleamos un modelo no letal pero altamente sintomático de infección oral, para reflejar con mayor precisión la ECh aguda humana oral, y diseñamos un score clínico *ad hoc* para valorar el impacto de la vacunación sobre la progresión de la enfermedad. Los resultados de los estudios de eficacia, mostraron que el grado de protección ejercido por la administración nasal de TS+A fue significativamente superior al resto de formulaciones, en términos de parasitemia y repercusión clínica. Aunque TS+A no logró establecer inmunidad esterilizante, el control efectivo de la carga parasitaria se reflejó claramente en la ausencia de sintomatología. El mejor control de la infección oral en los animales inmunizados con TS+A está claramente ligado a las diferencias cualitativas y cuantitativas en la respuesta humoral y celular específica.

A pesar de que no se encontraron diferencias *ex vivo* en la proporción de células T CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> esplénicas ni post-inmunización ni post-infección, la mayor proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  observado en los animales TS+A, se asoció claramente con un mejor nivel de protección. Estos resultados sugieren que cuando el fragmento recombinante de TS y el di-AMPC se administran conjuntamente se genera una sinergia de señales que favorecen la presentación antigénica y un microambiente de tipo Th1. De hecho, un estudio reciente señala que la activación de STING mediada por ADN parasitario induce una respuesta T CD8 específica contra *T. cruzi*, mientras que la deficiencia de STING afecta el número de linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>perforina<sup>+</sup> y la secreción de IFNs de tipo I por los macrófagos (Vieira et al., 2021). Si bien en este ensayo pre-clínico no evaluamos la inducción de IFNs de tipo I por parte de las células de la inmunidad innata (Chessler et al., 2009), es evidente que estas citocinas tienen un papel fundamental en la respuesta frente al parásito, y no podemos descartar que su producción facilite la síntesis de IFN- $\gamma$  en nuestro modelo. Ciertamente,

la producción de IgG<sub>2a</sub> mediada por TS+A sugiere claramente el establecimiento previo de un ambiente rico en IFN- $\gamma$ . De acuerdo con esto, la inducción de IFN- $\gamma$  y el patrón Th1 global gatillado por TS+A estarían relacionados con una rápida eliminación de la célula infectada por parte de los linfocitos T CD8. Además, en estos animales, el rápido control del parásito tuvo un efecto favorable, no solo sobre las manifestaciones clínicas de la enfermedad, sino también sobre la prevención del daño tisular, a juzgar por la ausencia de nidos de amastigotes al día 28 pi, y la menor intensidad de los infiltrados inflamatorios observados en el miocardio, músculo esquelético y tejido adiposo.

Por último, cabe destacar que el desarrollo de vacunas mucosas para uso humano requiere de sistemas de producción de antígenos y adyuvantes cada vez más seguros. En este sentido, *L. lactis* se ha convertido en uno de los sistemas de expresión bacteriano gram-positivo más relevante para la producción de proteínas heterólogas (Daniel et al., 2011; Morello et al., 2007), ya que previene posibles efectos adversos debido a la contaminación por lipopolisacáridos en las formulaciones vacunales (Erridge et al., 2002; Freudenberg and Galanos, 1990; Morello et al., 2007). El uso de estas bacterias para la producción de antígenos heterólogos ha sido poco explotado en el campo de las vacunas experimentales contra *T. cruzi* (Quintana et al., 2018), por lo que este trabajo aporta nuevas pruebas experimentales para su utilización en entornos pre-clínicos.

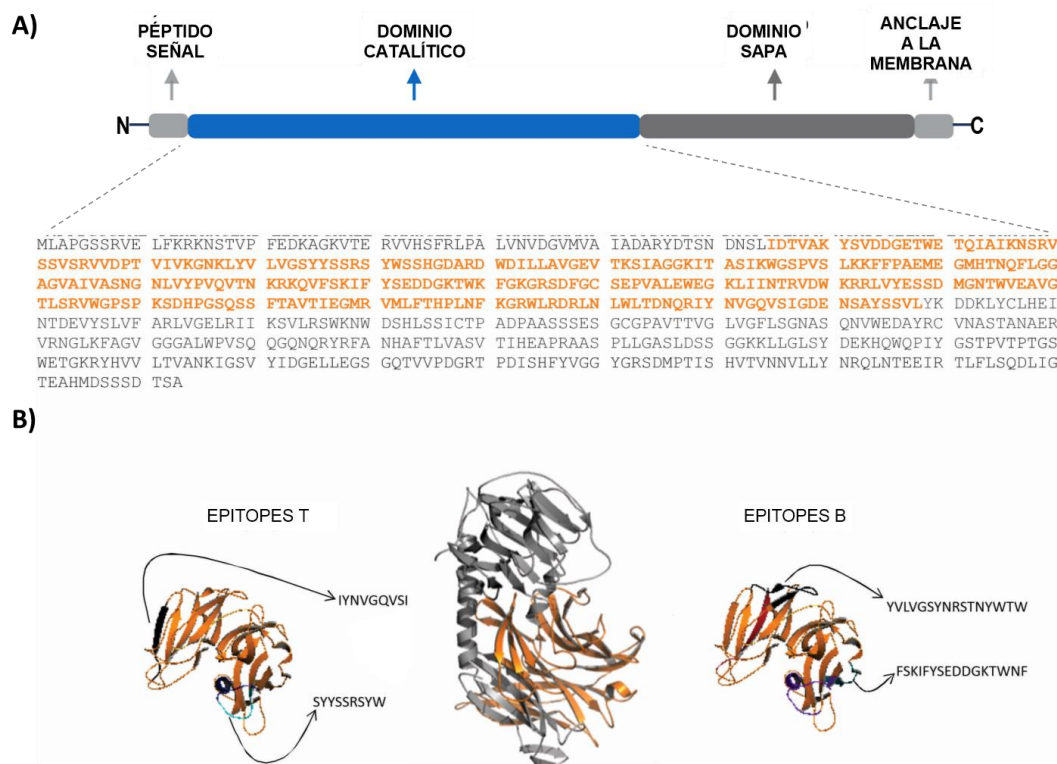
*Los resultados mostrados en este capítulo indican que una vacuna experimental basada en un fragmento recombinante correspondiente al extremo C-terminal del dominio catalítico de la TS, adyuvada por di-AMP-c (TS+A) y administrada por vía intranasal proporciona protección local y sistémica contra la infección oral por T. cruzi.*

## 4. CAPÍTULO 2

*Evaluación preclínica de la inmunogenicidad y eficacia de una formulación vacunal basada en el fragmento N-terminal del dominio catalítico de la enzima Transialidasa administrada por vía intranasal*

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Como se comentó anteriormente, las TS-GI constan de dos dominios, uno corresponde a la región catalítica, responsable de su función y el otro es denominado región SAPA. En esta segunda etapa, nos propusimos evaluar la inmunogenicidad y eficacia protectora de un fragmento recombinante de la TS-GI que carece del dominio SAPA y que corresponde al extremo N-terminal del dominio catalítico. Este fragmento abarca la fracción comprendida entre los aminoácidos 63 y 346 de la secuencia original (Fig.23A). Esta secuencia había sido previamente seleccionada por el Dr. Iván Marcipar para desarrollar una vacuna contra *T. cruzi* en base a una bacilo de Calmette-Guérin (BCG) recombinante como plataforma de expresión y *delivery*; y cuyos niveles de inmunogenicidad y eficacia resultaron alentadores (Bontempi et al., 2020). La predicción de epítomos *in silico*, mostró que esta proteína presenta 2 epítomos T fuertes (uno de ellos es TSKb20) y 2 epítomos B lineales potencialmente inmunogénicos (Fig. 23B).



**Figura 23: Selección del antígeno.** **A)** Esquema representativo de la secuencia completa de la proteína TS. El fragmento seleccionado, correspondiente a la región N-terminal del dominio catalítico de la TS aparece resaltado en naranja. **B)** Modelado de la estructura del fragmento N-terminal del dominio catalítico de la TS, para el cual se utilizó el software de PyMol v1.3 (<http://www.pymol.org>). La secuencia seleccionada se analizó para predecir los epitopos T contra H-2Kd MHC-I usando el servidor de predicción Propred-I y para predecir los epitopos B usando el servidor de predicción ABCpred.

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Evaluar la inmunogenicidad y eficacia profiláctica de un prototipo vacunal basado en un fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la proteína TS-GI, formulada con el adyuvante c-di-AMP y administrada por vía intranasal.*
- *Evaluar si esta formulación vacunal permite prevenir las lesiones tisulares generadas durante la fase aguda y crónica de la infección experimental.*

## 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.3.1 Expresión y purificación del fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la proteína TS-GI

A diferencia del capítulo anterior, el fragmento de TS N-terminal fue expresado en *E. coli*. El mismo se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico de la cepa CL Brenner, utilizando la secuencia GenBank XM 811430. Para obtener el fragmento N-terminal de la proteína TS, se diseñaron cebadores específicos: cebador directo (5'-GAATTCattgatacgggtggcgaagtaca-3'), al que se le añadió el sitio de restricción de la enzima EcoRI (secuencia subrayada), y un cebador inverso (5'-GAGCTCtacaggacggagctgtaggc-3'), al que se le añadió el sitio de restricción de la enzima SacI (secuencia subrayada). Se obtuvo un fragmento de ADN de 866 pb que codifica el fragmento N-terminal de 35 kDa. Este se clonó en el vector de expresión pET-28a (+) (Novagen™) y se transformó en células de *E. coli* BL21 (DE3). La secuencia antigénica obtenida incluía desde el aminoácido 63 al 346 de la secuencia de la TS-GI

original y una etiqueta His en la región N-terminal de la misma. La misma se indexó en GenBank con el número de acceso MZ215730.

La proteína se indujo con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) 0,1 mM a 20 °C durante 18 h en agitación constante, en 200 mL de medio LB-kanamicina (50  $\mu$ g/mL). Luego de la inducción, las bacterias se sonicaron y los gránulos se lavaron cuatro veces con tritón al 1%. Los cuerpos de inclusión que contenían el fragmento seleccionado de la TS-GI se resuspendieron en PBS/urea 8M y luego la purificación se realizó por cromatografía de afinidad en columnas de Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa (Invitrogen™, USA) con un gradiente de imidazol/Urea 8 M. Todas las fracciones se recogieron y dializaron frente a PBS/Urea 0,5 M y se cuantificaron mediante el método del ácido bicinconínico. La presencia de lipopolisacárido (LPS) en la proteína recombinante se determinó usando el kit de lisado de amebocitos de Limulus (prueba LAL) (Genscript, USA). Los niveles de LPS fueron <10 unidades de endotoxina (UE)/mg de proteína. La pureza de la proteína se comprobó mediante SDS-PAGE.

En este capítulo también usaremos el término genérico TS para referirnos a este fragmento N-terminal derivado del dominio catalítico de la TS-GI, a menos que se indique lo contrario.

### 4.3.2 Adyuvante

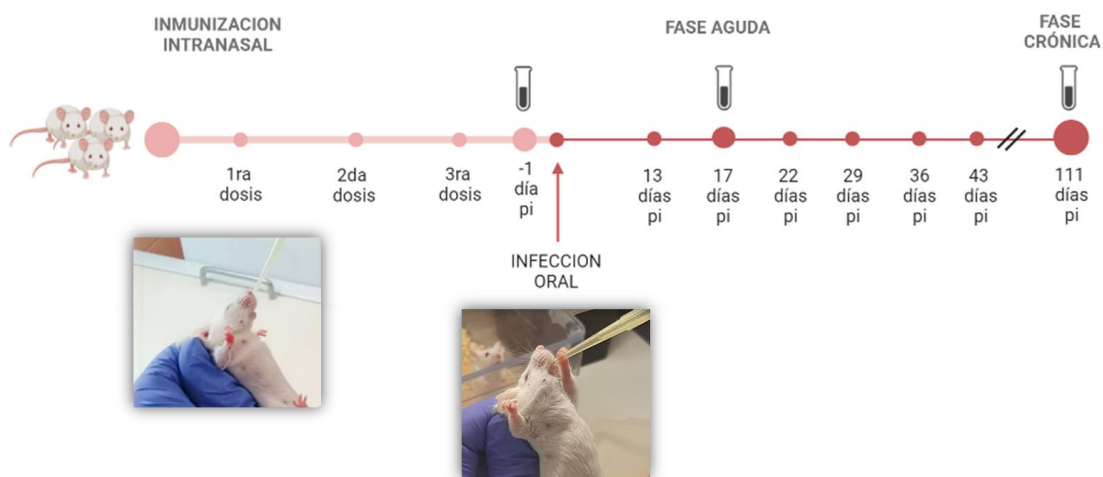
Se utilizó como adyuvante mucosal di-AMP-c (Sigma-Aldrich, USA) el cual se disolvió en H<sub>2</sub>O destilada en condiciones estériles y se almacenó a -80 °C. La dosis utilizada fue de 5  $\mu$ g/ratón.

### 4.3.3 Animales de experimentación

Al igual que en el capítulo anterior, se utilizaron ratones hembra BALB/c (6–8 semanas de edad), los cuales se adquirieron y mantuvieron en las mismas condiciones, mientras que su manipulación se realizó siguiendo los lineamientos institucionales para su utilización (Res. Nro: 6698/2014 y Nro: 2958/2018).

### 4.3.4 Diseño experimental

En la Fig. 24 se esquematiza sintéticamente el diseño experimental para la evaluación de la inmunogenicidad y la eficacia protectora de las nuevas formulaciones, mientras que las metodologías utilizadas en cada una de las etapas se describen a continuación.



**Figura 24:** Esquema de trabajo empleado para la evaluación de la inmunogenicidad y la eficacia profiláctica de las formulaciones vacunales en un modelo agudo y crónico de infección oral.

### 4.3.5 Protocolo de inmunización e infección

Los animales fueron inmunizados por vía intranasal con 3 dosis, administradas en intervalos de 15 días. El volumen de cada dosis fue de 20  $\mu$ L (10  $\mu$ L/fosa nasal). Los grupos de trabajo fueron los siguientes:

- a) **Grupo SS**: animales a los que se le administró solución salina;
- b) **Grupo TS**: animales a los que se le administró 10 µg del fragmento recombinante correspondiente al extremo N-terminal de región catalítica de la TS diluido en el vehículo, sin adyuvante;
- c) **Grupos TS+A**: animales a los que se le administró 10 µg del fragmento recombinante correspondiente al extremo N-terminal de región catalítica de la TS, más 5 µg de di-AMP-c;
- d) **Grupo A**: 5 µg de di-AMP-c.

Para la evaluación de alteraciones funcionales (enzimas y ECG) y daño tisular, se agregó un grupo control adicional que consistió en animales no inmunizados ni infectados (**Grupo NI**), los que se mantuvieron bajo las mismas condiciones de trabajo. Se utilizaron de 4–7 animales/grupo para la evaluación de la inmunogenicidad de las formulaciones y un número similar para determinar la eficacia de las mismas, tanto en la etapa aguda como en la crónica. Se realizaron 3 rondas experimentales.

#### 4.3.6 Evaluación de la inmunogenicidad

Transcurridos 15 días de finalizado el esquema de inmunización, se evaluó la respuesta humoral y celular gatillada por la TS recombinante adyuvada por di-AMP-c. Los mismos se describen a continuación.

##### 4.3.6.1 Determinación de anticuerpos específicos en plasma, lavado nasal y muestras fecales

La obtención de los plasmas y heces se realizó de la misma forma que lo explicado en el capítulo anterior. En plasma, adicionalmente se evaluó IgG total, y para evaluar la

producción mucosal en el sitio de la inmunización, se analizó la presencia de IgA en las secreciones nasales. Para la detección de los anticuerpos específicos, las microplacas para ELISA (Nunc-Inmuno Maxisorp™, Thermo) se recubrieron con el fragmento N-terminal seleccionado (0,5 µg/pocillo) diluido en buffer carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6). El procedimiento posterior para la determinación de IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>1</sub> e IgG total es idéntico al descrito anteriormente. En el caso de IgG total, la misma se utilizó a una dilución 1/2000.

Para la evaluación de IgA en las secreciones nasales, se realizaron lavados nasales siguiendo el protocolo informado por Cho y col. (Cho et al., 2012). Brevemente, se el mismo se obtuvo mediante infusión retrógrada a través de la tráquea con 0,3 mL de cocktail conteniendo inhibidores de proteasa (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche, USA) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Para la determinación de IgA, las muestras de lavado nasal se incubaron por duplicado en pocillos recubiertos con el fragmento N-terminal seleccionado durante 2 h. La IgA presente en las secreciones nasales se detectó mediante la incubación con anti-IgA de ratón producido en rata y marcado con biotina mezclada con estreptavidina/HRP (ambos en 1:5000, BD Biosciences, USA). Las muestras se leyeron a 450 nm con corrección a 545 nm en un lector ELISA (Epoch Biotek Instruments, USA) después de la incubación con 100 µL de trimetilbencidina lista para usar (Sigma, USA) seguido de la adición de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Wiener Lab, Argentina).

Los valores de densidad óptica (OD) para la medición de Igs se ajustaron restando la lectura de OD del diluyente (blanco).

#### 4.3.6.2 Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada

El test se realizó de manera similar a lo enunciado previamente en el Capítulo 1, sección 3.3.6.3

#### 4.3.6.3 Cultivo de esplenocitos y estimulación *ex vivo*

Los bazo se extirparon tras 15 días de finalizado el esquema de inmunización y los esplenocitos se procesaron y cultivaron siguiendo el mismo protocolo informado previamente en el Capítulo 1, sección 3.3.6.4. En este caso,  $1 \times 10^6$  esplenocitos/pocillo fueron estimulados o no con el fragmento N-terminal del dominio catalítico de la TS (10  $\mu\text{g}$ /pocillo). Como control positivo de estimulación se utilizó Concanavalina A (2,5 g/mL). La producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de ROR $\gamma$ t se evaluó en los esplenocitos luego de 60 h de cultivo, siguiendo el mismo protocolo que se informó previamente en el Capítulo 1, sección 3.3.6.4 (Bontempi et al., 2015).

#### 4.3.6.4 Citometría de flujo

Los esplenocitos procedentes de los animales inmunizados y reestimulados *in vitro* con el fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la TS, se procesaron para citometría de flujo y marcación intracelular tal como se informó en el Capítulo 1, sección 3.3.6.5 En este caso se utilizaron anticuerpos anti-FcII/III-R, anti-CD4/PE-Cy7 y anti-CD8/PE para la marcación de superficie, y anti-IFN- $\gamma$ /FITC y anti-ROR $\gamma$ t/PE (todos de BD Pharmingen, USA). La adquisición y el análisis posterior se realizó según lo informado en el Capítulo 1, sección 3.3.6.5

#### 4.3.6.5 Cuantificación de citocinas en plasma

Tras 15 días de finalizado el esquema de vacunación, se obtuvo sangre heparinizada, a partir de la vena facial o por punción cardíaca, para la determinación del perfil de citocinas circulantes Th1/Th2/Th17. El plasma se separó a 5000 rpm y se almacenó a -

80°C. La presencia de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17A en las muestras se determinó mediante citometría de flujo (BD Cytometric Bead Array, BD Biosciences, USA). Brevemente, las muestras se diluyeron al medio en un volumen final de 50  $\mu$ L y se incubaron durante 2 h con las perlas de captura y el reactivo de detección conjugado a PE, luego se lavaron con una solución *ad hoc* y se centrifugaron a 200 g, durante 5 min. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSAria II (Beckton-Dickinson, USA) y las concentraciones de las citocinas de interés se determinaron utilizando el software BD-CBA. Los límites de detección fueron: 0,8 pg/mL para IL-17A, 0,03 pg/mL para IL-4 y 0,5 pg/mL para el IFN- $\gamma$ .

#### 4.3.6.6 Aislamiento de NALT y determinación del perfil de citocinas por RT-qPCR

El NALT se aisló cortando cuidadosamente con un bisturí el paladar superior, siguiendo el contorno interior de los incisivos y molares del ratón, y luego se despegó suavemente con pinzas (Cisney et al., 2012). Las células del NALT se extrajeron con TRI-Reagent®. Posteriormente el ARN se transcribió en forma inversa a ADNc usando RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo-Fisher Scientific, USA). La PCR en tiempo real se realizó en un equipo StepOnePlus (Applied-Biosystems, USA) usando Mix-5x-HOT-FIREPol®EvaGreen® qPCR-Mix Plus con ROX (Solis-BioDyne, Estonia). El programa de amplificación incluyó un paso inicial de activación a 95°C durante 15 min, seguido de desnaturalización a 95°C durante 15 s, temperatura de anillado entre 59°/62°C, y finalmente elongación a 72°C durante 20 s, durante 40 ciclos. La fluorescencia se midió después de cada paso de extensión y la especificidad de la amplificación se evaluó mediante el análisis de la curva de *melting*. El gen GAPDH se utilizó como control para normalizar las muestras de ARNm. Los niveles relativos de expresión génica se calcularon usando una curva estándar *ad hoc* para cada gen. Las eficiencias de

amplificación fueron idénticas o similares entre los genes de interés y los controles. Los cebadores se diseñaron en nuestro laboratorio y se sintetizaron en Eurofins-Genomics, USA, los cuales se detallan a continuación:

***IFN- $\gamma$***  Fwd: AGACAATCAGGCCATCAGCAAC

Rev: CTCATTGAATGCTTGGCGCTG

***IL-17a*** Fwd: CAAAGCTCAGCGTGTCCAAA

Rev:CTTCCCAGATCACAGAGGGATA

***IL-4*** Fwd: GCCAAACGTCCTCACAGCAA

Rev:TCTGCAGCTCCATGAGAACACT

***GAPDH*** Fwd: AGCAATGCATCCTGCACCACCA

Rev: ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA

#### 4.3.7 Evaluación de la eficacia protectora

El esquema de evaluación de la eficacia vacunal utilizado en esta etapa del estudio, fue similar al reportado previamente en el Capítulo 1, sección 3.3.7. Sin embargo, en esta oportunidad también se evaluó si la vacuna es capaz de evitar o atenuar en los animales el desarrollo de la patología chagásica crónica.

##### 4.3.7.1 Protocolo de infección y determinación de la parasitemia

El protocolo de infección oral fue el mismo que el indicado anteriormente en el Capítulo 1, sección 3.3.7.1. La parasitemia se determinó durante todo el período agudo, hasta su desaparición (alrededor del día 45 pi), siguiendo la misma metodología de lectura directa entre portaobjeto y cubreobjeto de 22x22 mm, tal como se indicó previamente.

#### 4.3.7.2 Score clínico

Para determinar el impacto clínico de los prototipos de vacunas, se utilizó el mismo sistema de puntuación que el desarrollado en el Capítulo 1 sección 3.3.7.2. De igual manera, la puntuación acumulada de cada grupo se determinó como el área bajo la curva (AUC) (Blättner et al., 2016; Shahi et al., 2019).

#### 4.3.7.3 Determinación de daño muscular y hepático en fase aguda y crónica

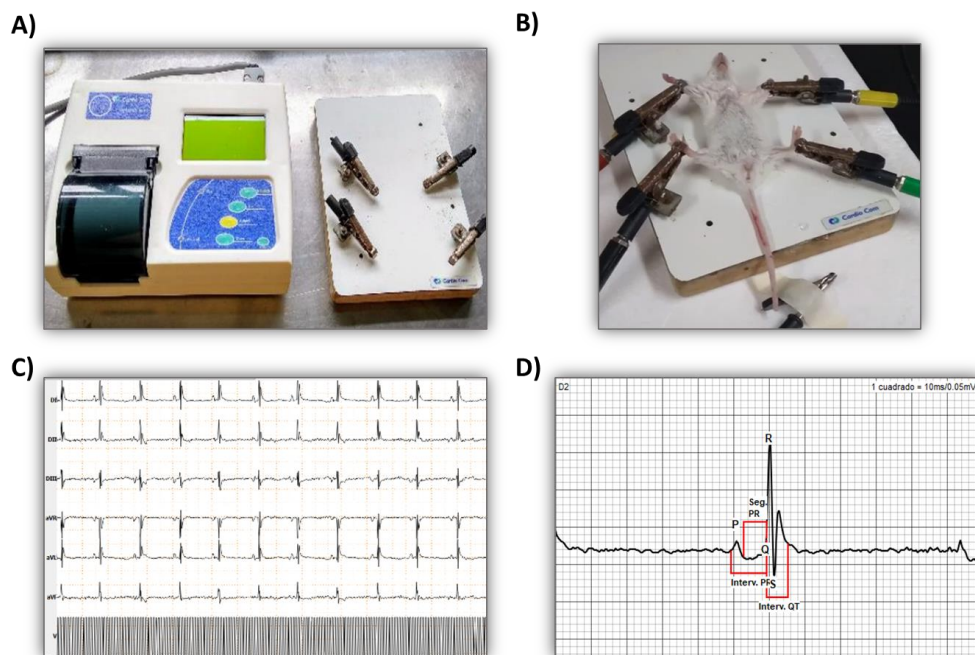
Al día 17 pi (coincidiendo con el pico de parasitemia) y al día 111 pi se determinó en plasma fresco la actividad de enzimas indicadoras de daño muscular y hepático: creatina quinasa (CK), glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT), mediante ensayos espectrofotométricos, de acuerdo con la descripción del fabricante (Roche).

#### 4.3.7.4 Histopatología

Al día 17 (fase aguda) y 111 pi (fase crónica) se extirparon los corazones y se fijaron en formol 4% y se embebieron en parafina. Luego secciones de 5 mm se tiñeron con hematoxilina/eosina para la evaluación del parasitismo tisular y la intensidad y magnitud de los infiltrados inflamatorios, de manera similar a lo descrito en el Capítulo 1, sección 3.3.7.5. Además, otras secciones se tiñeron con rojo de picrosirius, para observar la fibrosis del tejido. La fibrosis se clasificó en función del tamaño y de la cantidad de fibras cardíacas que afectaba en leve, moderada o severa. Teniendo en cuenta estos hallazgos se diseñó un score para cuantificar la misma. Los portaobjetos fueron analizados por un patólogo experto, que desconocía los datos.

#### 4.3.7.5 Electrocardiograma

Entre los días 105 y 110 pi, los animales se anestesiaron con una solución de Ketamina (50%, Holliday- Scott S.A.)/Xilacina (10%, PharmaVet) y posteriormente su función cardiológica se monitoreó mediante ECG. El registro de los ECG se llevó a cabo empleando un electrocardiógrafo especialmente diseñado para animales de laboratorio (Cardiocom, Argentina) y equipado con el software CC7DerS-Vet, suministrado por el fabricante del equipo, que permite evaluar la frecuencia cardíaca (Fc) de cada ratón y distintos parámetros de la funcionalidad cardíaca como la onda P, el intervalo PR, el segmento PR, el complejo QRS y el intervalo QT. Como el valor del intervalo QT varía con la Fc registrada (disminuye a Fc altas y aumenta a Fc bajas), su valor se corrigió aplicando la fórmula descrita en Mitchell et al., 1998 (Mitchell et al., 1998) y se obtuvo así el intervalo QT corregido (QTc). Se analizaron las derivaciones I y II, y se registraron todas las alteraciones que mostraban algún tipo de arritmia.



**Figura 25. Electrocardiogramas (ECG).** A y B) Electrocardiógrafo para animales pequeños de laboratorio. C y D) Imágenes extraídas del software para el análisis de los ECG en donde se

*observa el registro de las distintas derivaciones y los diferentes parámetros de ondas evaluados: onda P, segmento PR, intervalo PR, complejo QRS e intervalo QT.*

#### 4.3.8 Análisis estadístico

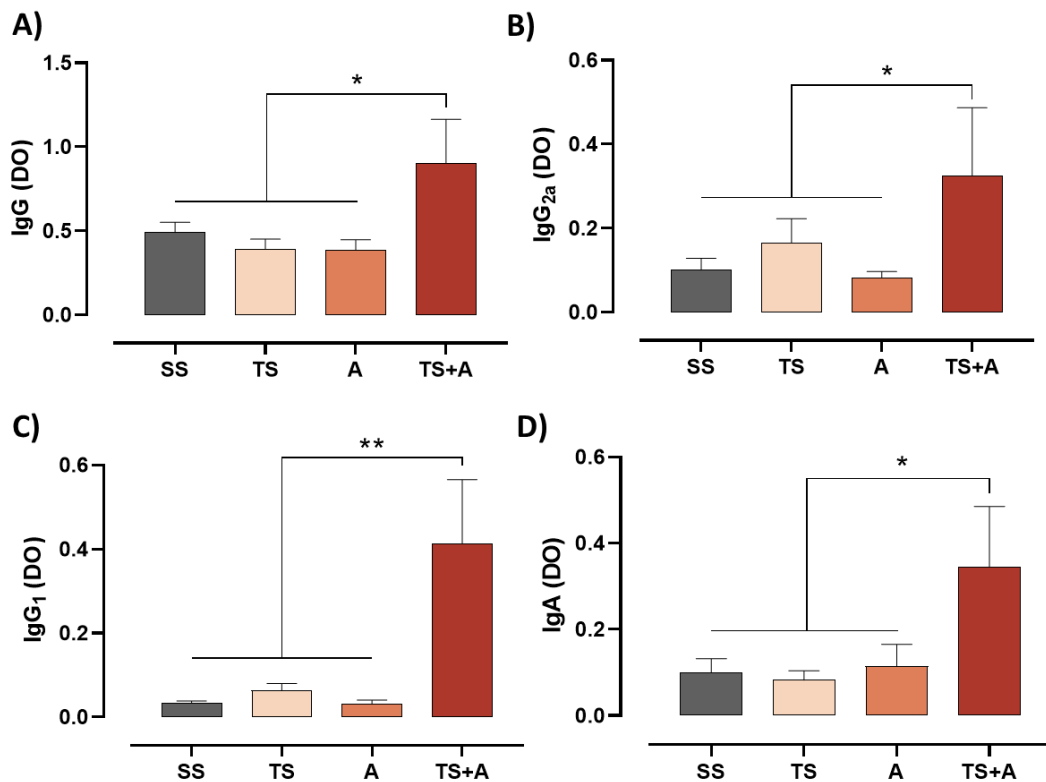
Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas (prueba ANOVA Kruskal-Wallis (para k grupos > 2), seguida de la prueba U de Mann Whitney (para comparaciones entre dos grupos). Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad InStat 4.0 (GraphPad, California, USA). Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando el valor de p fue < 0,05.

### 4.4 RESULTADOS

#### 4.4.1 Inmunogenicidad de las formulaciones administradas por vía intranasal

Tras 15 días finalizado el esquema de inmunización, se analizó la respuesta inmune humoral específica hacia el fragmento N-terminal del dominio catalítico de la TS, acompañado o no del adyuvante di-AMP-c. Como se muestra en las Fig. 26A, los animales inmunizados con TS+A mostraron un aumento significativo de IgG total en comparación con los demás grupos evaluados. Al evaluar los distintos isotipos se observó que TS+A gatillaba una respuesta sustancial en términos de IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>1</sub> (con una relación IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub>≈1) comparación con las formulaciones restantes (Fig. 26B-C).

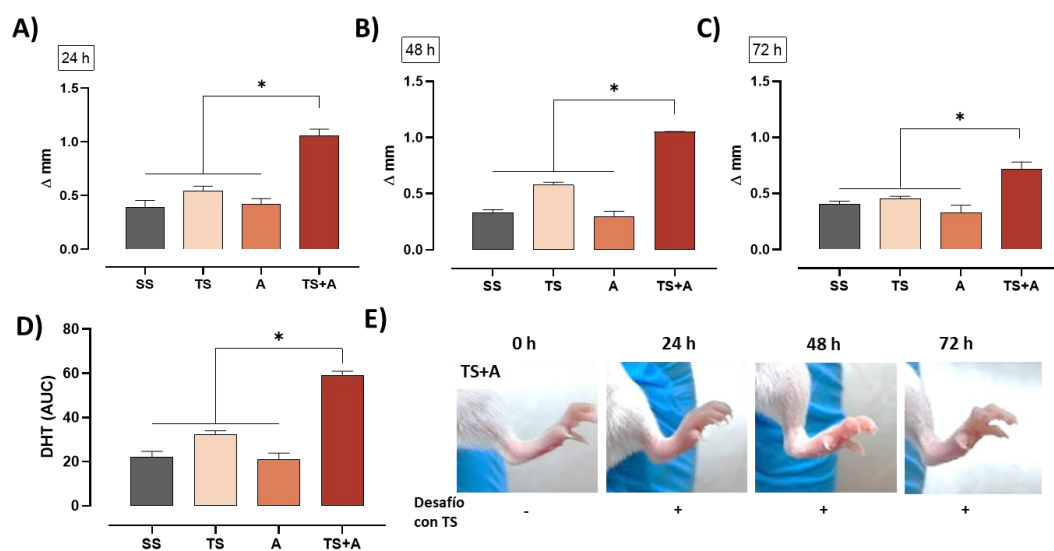
La evaluación de IgA en las heces, no mostró diferencias significativas entre grupos (no se muestran resultados), mientras que la producción de IgA en las secreciones nasales indicó que los animales que habían sido inmunizados con TS+A presentaban niveles incrementados de esta inmunoglobulina en el sitio de inmunización (Fig. 26D). Los animales vacunados con el fragmento TS mostraron valores similares a los SS y A (Fig. 26D).



**Figura 26: Respuesta inmune humoral en ratones BALB/c inmunizados por vía intranasal** Quince días luego de finalizada la inmunización, los niveles de anticuerpos específicos dirigidos contra el fragmento N-terminal del dominio catalítico de la TS se evaluaron en suero y lavados nasales mediante ELISA indirecto y determinación de densidad óptica (DO) a 450/540 nm. Niveles plasmáticos de: **A)** IgG total específicos, **B)** IgG<sub>2a</sub> específicos y **C)** IgG<sub>1</sub> específicos. **D)** IgA específica en lavados nasales. Los resultados se expresan como media±SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Datos representativos de 3 experimentos independientes ( $n = 5-7$ /grupo).

Posteriormente se examinó la respuesta celular *in vivo*, mediante la inoculación del fragmento N-terminal en las almohadillas plantares de los animales inmunizados. Como se observa en la Fig. 27A-C, el aumento del grosor de las almohadillas tras de 24, 48 y

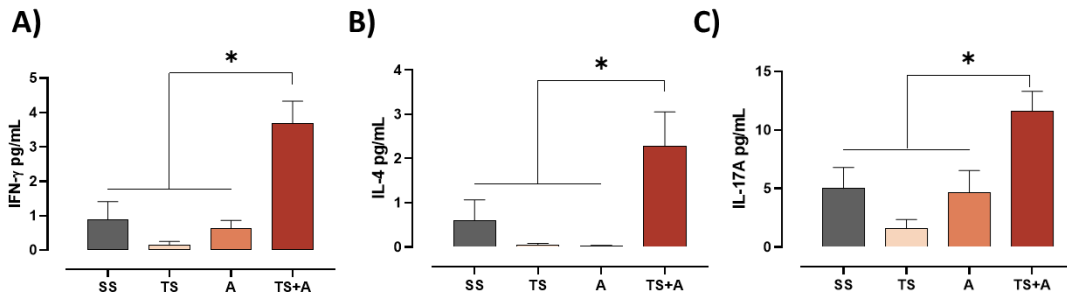
72 h de exposición intradérmica al fragmento recombinante fue evidentemente más significativo en el grupo TS+A. Asimismo, la respuesta inducida en los animales inmunizados sólo con el fragmento N-terminal, no difirió significativamente de la observada en el grupo SS, indicio de que la presencia del di-AMP-c es necesaria para inducir la inmunogenicidad del fragmento. La evaluación de la respuesta celular global que tuvo lugar entre las 0 y las 72 h, ratificó que sólo los animales sensibilizados con TS+A generaron una respuesta celular específica evidente hacia fragmento recombinante seleccionado (Fig. 27D-E).



**Figura 27: Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada.** Grosor de la almohadilla plantar tras la inyección intradérmica de 5  $\mu$ g del fragmento recombinante correspondiente al extremo N-terminal del dominio catalítico de la TS. Los resultados se expresan como la diferencia entre el valor de la almohadilla plantar control y la inoculada con TS (delta,  $\Delta$ ). Diferencias en el grosor obtenidos tras: **A)** 24 h, **B)** 48 h, y **C)** 72 h. **D)** El área bajo la curva (AUC) corresponde al intervalo de 0 a 72 h luego de la re-exposición al fragmento recombinante de la TS. **E)** Imágenes representativas que muestran la inflamación de la almohadilla plantar en la pata derecha de un animal del grupo SS y otro del grupo TS+A transcurridas 24, 48 y 72 h de la inoculación con el fragmento recombinante. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 5-7$ /grupo) con  $*p < 0,05$ . Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

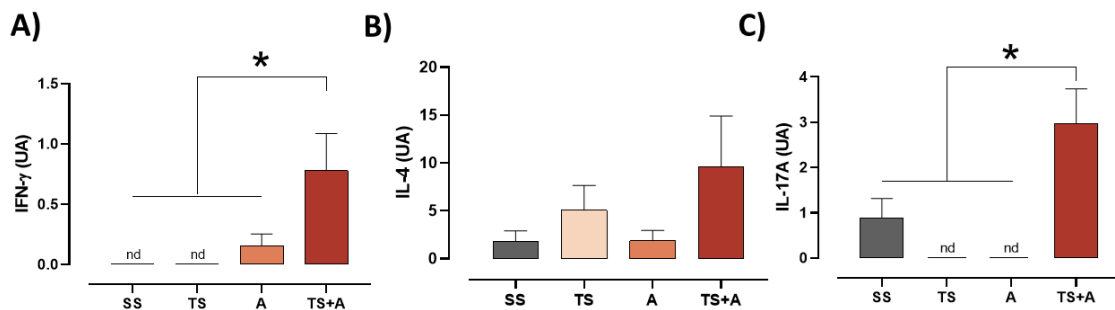
Para indagar sobre los perfiles inducidos por las formulaciones utilizadas, se analizó la expresión de mediadores típicos Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4) y Th17 (IL-17A) en el sitio de inmunización y su presencia en circulación luego de 15 días de finalizado el esquema de vacunación.

En el NALT, los animales inmunizados con TS+A presentaron un aumento significativo en la expresión de los ARNm de IFN- $\gamma$  e IL-17A, en comparación con los grupos SS, TS y A (Fig. 28A y 28C). Si bien el grupo TS+A mostró niveles más aumentados del ARNm IL-4 este no resultó significativo cuando se lo comparó con el resto de los grupos (Fig. 28B).

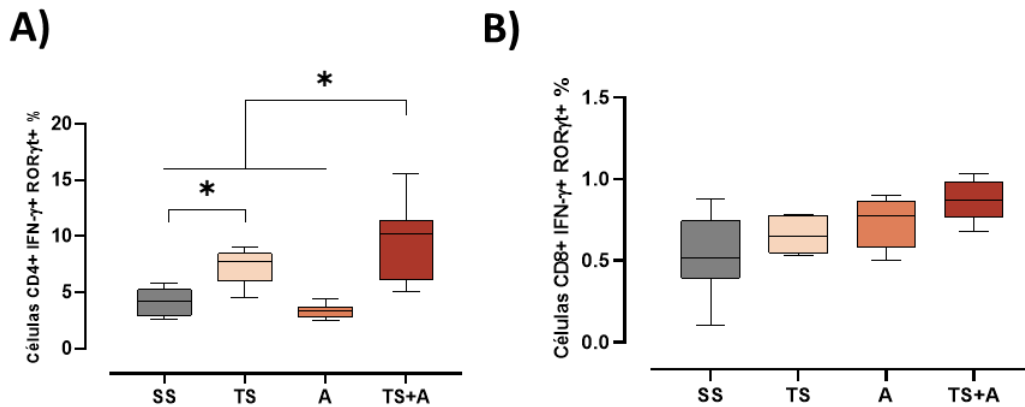


**Figura 28: Expresión de citocinas de tipo Th1, Th2 y Th17 en NALT.** Quince días luego de finalizado el esquema de vacunación, se extrajeron las células del NALT, y se evaluó la expresión de ARNm de citocinas típicas de cada uno de estos perfiles mediante RT-qPCR. **A)** IFN- $\gamma$ , **B)** IL-4, **C)** IL-17A. \*= $p < 0,05$ . nd: no detectable.

Asimismo, los animales inmunizados con TS+A presentaron en plasma un aumento leve en términos cuantitativos, pero significativo, de las 3 citocinas en comparación con los grupos SS, TS y A (Fig. 29).



**Figura 29: Cuantificación de citocinas en plasma.** Tras 15 días de finalizado el esquema de inmunización, las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17A se determinaron en el plasma de ratones inmunizados por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  ( $n=5-7$ /grupo). Los datos son representativos de dos rondas experimentales independientes.



**Figura 30: Poblaciones multifuncionales en esplenocitos re-estimulados *in vitro* con TS.** Tras 15 días de finalizado el esquema de inmunización, los esplenocitos fueron expuestos *ex vivo* al fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la TS y luego de 60 h se determinó la expresión intracelular de IFN- $\gamma$  y ROR $\gamma$ t. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  ( $n=4-5$ /grupo). Los datos son representativos de una ronda experimental,

La re-estimulación *ex vivo* de los esplenocitos con el fragmento N-terminal del dominio catalítico de la TS, indujo un leve aumento de la producción de IFN- $\gamma$  en los esplenocitos procedentes de los ratones inmunizados con TS+A, que no alcanzó significado estadístico (no se muestran resultados). Sin embargo, en los grupos TS y TS+A se observó una mayor proporción de linfocitos T CD4 productores de IFN- $\gamma$  que co-expresaban el gen maestro ROR $\gamma$ t en relación al grupo SS, y este aumento fué incluso mayor en el grupo TS+A que en el TS (Fig. 30A). Este hallazgo sugería que la formulación TS+A era capaz de inducir la diferenciación de una proporción de linfocitos Th hacia una población multifuncional Th1/Th17. En los linfocitos T CD8, se observó un comportamiento similar, pero no significativo en términos estadísticos (Fig. 30B). En ningún caso se observaron diferencias entre el grupo A y el grupo SS.

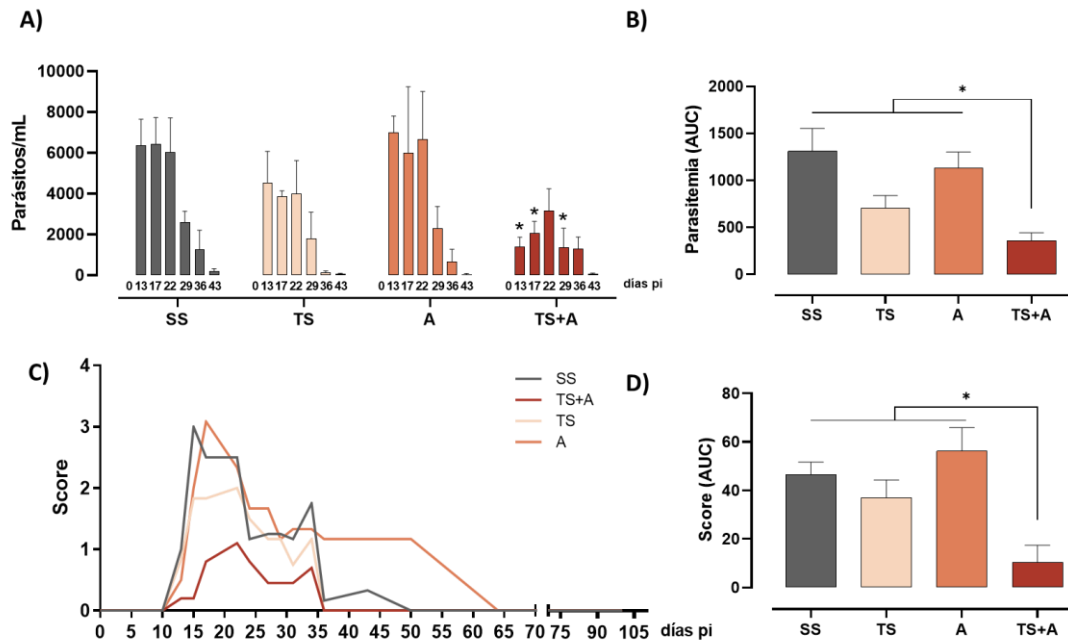
Globalmente, estos resultados indican que la formulación TS+A induce una respuesta humoral y celular de tipo mixta, tanto a nivel sistémico como de mucosas.

#### 4.4.2 Evaluación de la eficacia protectora en el contexto de la infección oral

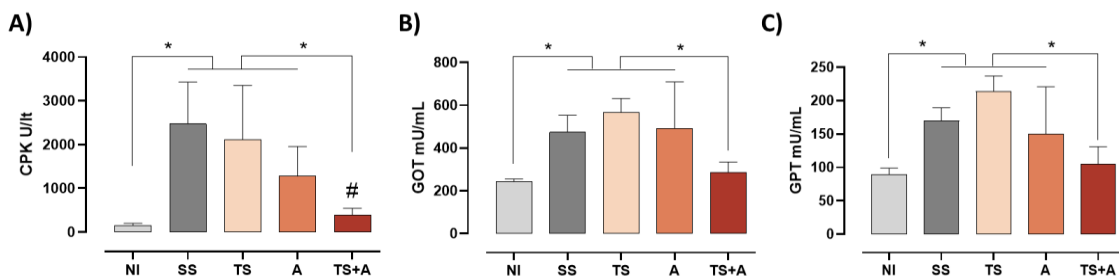
Posteriormente se analizó si las formulaciones vacunales basadas en el fragmento N-terminal, adyuvadas o no con di-AMP-c y administradas por vía intranasal eran capaces de controlar la infección oral causada por *T. cruzi*.

Como puede observarse en la Fig. 31A, en los grupos SS, TS y A, los valores máximos de parasitemia se registraron entre los días 13 y 22 pi, y disminuyeron progresivamente hasta desaparecer por completo luego de los 43 días pi. En el grupo TS+A, si bien la presencia de parásitos en sangre fue evidente, la concentración de los mismos estuvo significativamente más reducida que en el resto de los grupos, particularmente a los 13, 17 y 29 días pi (Fig. 31A). El mejor control de la infección aguda que evidenciaron los animales inmunizados con TS+A se refleja claramente en el análisis del AUC, que permite estimar la magnitud global de la infección en cada uno de los grupos inmunizados (Fig. 31B). En cuanto al estado clínico de los animales, como se puede observar en la Fig. 31C los signos clínicos comenzaron a aparecer alrededor del día 10 y desaparecen tras 60 días pi. Durante la fase aguda, todos los grupos presentaron algún signo clínico, sin embargo, los animales inmunizados con TS+A exhibieron una reducción significativa de la morbilidad respecto a los que recibieron las demás formulaciones, mientras que los signos clínicos revierten tras 36 días pi (Fig. 31D).

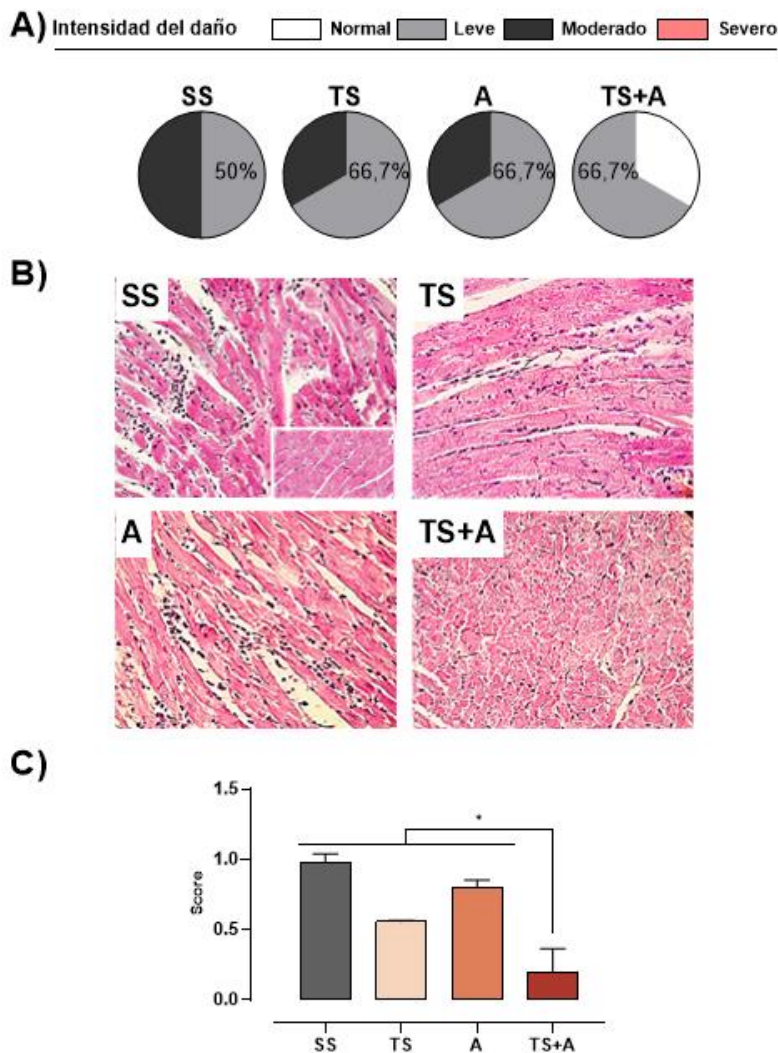
La infección causó una elevación de las enzimas CK, GOT y GPT durante el pico de parasitemia en los grupos SS; TS y A, mientras que los niveles en el grupo TS+A eran significativamente más bajos (Fig. 32). Llamativamente los niveles de las enzimas GOT y GPT en los animales TS+A no diferían de los observados en el grupo control NI, mientras que CK mostró solo un leve incremento. Estos resultados señalaban que el daño cardíaco, muscular y hepático al momento del pico de parasitemia en el grupo TS+A era muy bajo.



**Figura 31: Parasitemia y score clínico en animales inmunizados y desafiados por vía oral.** Los animales ( $n=5-7$ /grupo) se infectaron por vía oral con 2500 tripomastigotes (cepa Tulahuen) luego de 15 días de finalizada la inmunización. **A)** La parasitemia se determinó a los 13, 22, 29, 36 y 43 días post-infección (dpi) por microscopía directa. **B)** La magnitud global de la infección se estimó como el área bajo la curva (AUC) de los valores de parasitemia obtenidos desde el día 0 al día 43 pi. **C)** La evolución clínica de los animales infectados se registró diariamente. Se desarrolló un score basado en puntajes para clasificar la gravedad de los signos de la enfermedad, como se indica a continuación: ausencia de signos (0), piloerección (1), postura encorvada (1,5), afectación ocular (2), disminución de la actividad locomotora (2.5) y diarrea (3). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. **D)** El grado global de afectación clínica se estimó como el área bajo la curva (AUC) de los scores clínicos registrados durante la infección.



**Figura 32: Cuantificación de enzimas de daño cardíaco, muscular y hepático en la fase aguda de la infección.** Niveles de enzimas plasmáticas al día 17 pi: **A)** Creatina Kinasa (CK), **B)** Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y **C)** Glutamato piruvato transaminasa (GPT). NI: animales no inmunizados y no infectados. Datos correspondientes a una sola ronda experimental. \* $p<0.05$ ; #  $p<0.05$  versus NI

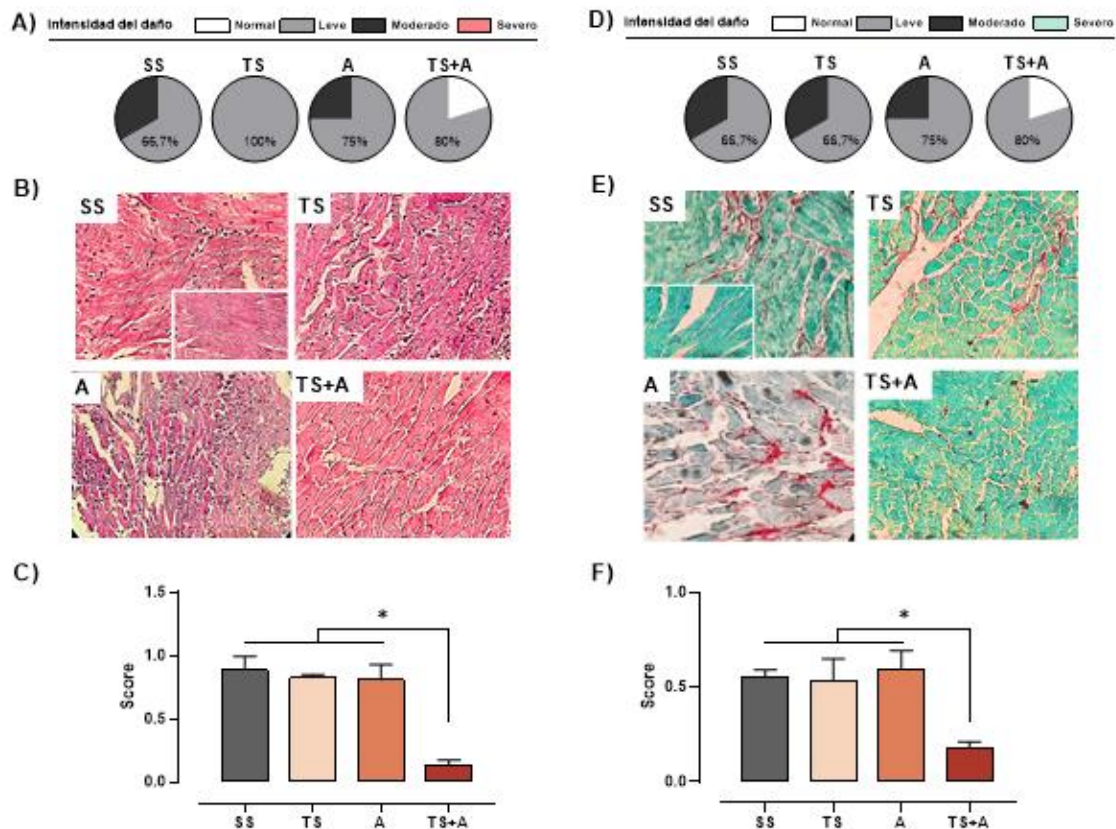


**Figura 33: Evaluación de la miocarditis aguda en animales vacunados e infectados por vía oral.**

Secciones histológicas de 5  $\mu$ m de tejido cardíaco obtenido al día 17 pi se tiñeron con hematoxilina/eosina. Las intensidades de los infiltrados se clasificaron como leves, moderados o severos. **A)** Proporción relativa de cada tipo de infiltrado inflamatorio/grupo. **B)**

Imágenes representativas de los hallazgos histológicos en el tejido cardíaco de los animales inmunizados e infectados por vía oral. La imagen más pequeña inserta en la fotografía correspondiente al grupo SS muestra un tejido normal, procedente de un animal no infectado y no inmunizado (Aumento 40X). **C)** Estimación del daño tisular en función del número e intensidad de los infiltrados inflamatorios. \*= $p < 0,05$ .

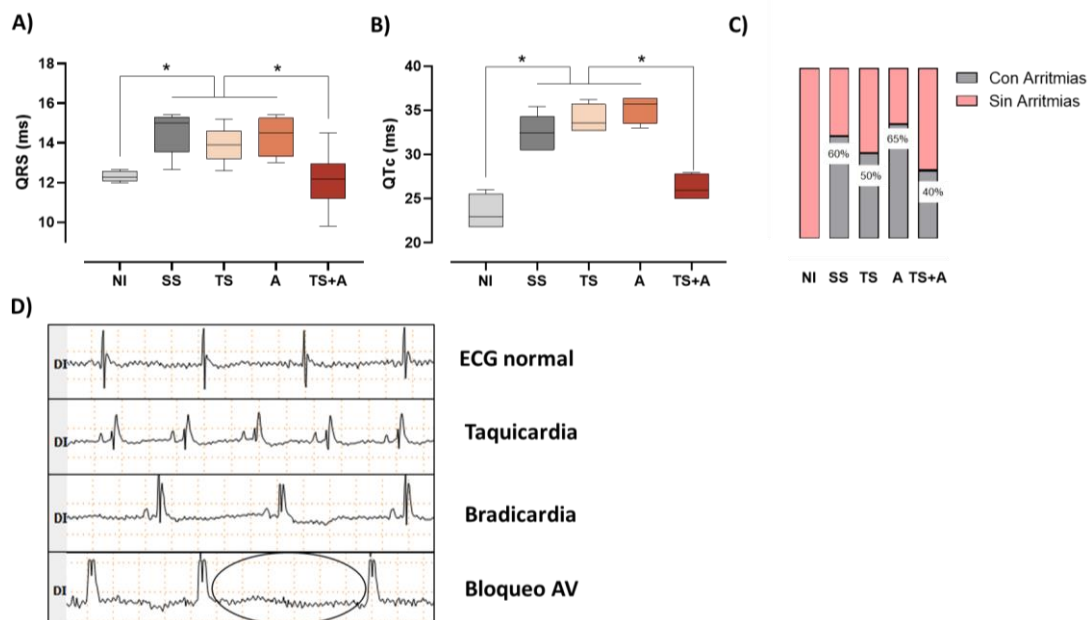
Los estudios histopatológicos indicaron que los animales vacunados con TS+A presentaron al día 17 pi una miocarditis aguda leve, con menor proporción de focos inflamatorios y de menor tamaño en comparación con los demás grupos (Fig. 33A-B), lo que se reflejó en un menor score de daño tisular (Fig. 33C). Durante el período crónico los hallazgos fueron similares (Fig. 34).



**Fig. 34. Evaluación de la miocarditis crónica en animales vacunados e infectados por vía oral.** Secciones histológicas de 5  $\mu$ m de tejido cardíaco obtenido al día 17 pi, se tiñeron con hematoxilina/eosina y rojo de picrosirius. Los infiltrados y la fibrosis se clasificaron como leves, moderados o severos. **A)** Proporción relativa de cada tipo de infiltrado inflamatorio/grupo. **B)** Imágenes representativas de los hallazgos histológicos en el tejido cardíaco de los animales inmunizados e infectados por vía oral: infiltrados inflamatorios (a la izquierda) y fibrosis (derecha). Las imágenes más pequeñas insertadas en las fotografías del grupo SS muestran un tejido normal, proveniente de un animal no infectado y no inmunizado (Aumento 40X). **C)** Estimación del daño tisular en función del número e intensidad de los infiltrados inflamatorios.  $*=p < 0,05$ .

La evaluación de la función cardíaca en la fase crónica de la infección, mostró un incremento en la magnitud del complejo QRS y en la longitud del intervalo QTc en los animales SS, TS y A en comparación con los que habían recibido TS+A y con el grupo NI. Ambos parámetros parecían estar preservados en el grupo TS+A, ya que no presentaban diferencias significativas con los valores registrados en el grupo NI.

Por otra parte, la proporción de animales que presentaron arritmias varió entre grupos. Entre el 50% y 65% de los animales SS, TS y A presentaron alteraciones en el ritmo, mientras que los del grupo TS+A la proporción fue del 40%.



**Figura 32: Evaluación de los ECG realizados en la fase crónica de la infección. A)** Complejo QRS expresado en milisegundos. **B)** Intervalo QT corregido según la frecuencia cardíaca aplicando la fórmula descrita en Mitchell et al., 1998, (Mitchell et al., 1998) expresados en milisegundos **C)** Porcentaje de animales con arritmias registrados en cada grupo. **D)** Imágenes representativas de algunas de las alteraciones registradas. Resultados correspondientes a 3-5 animales/grupo, AV: atrioventricular. \* $p < 0,05$ . Datos representativos de dos vueltas experimentales.

## 4.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARCIALES

A diferencia del capítulo anterior, aquí utilizamos un antígeno recombinante correspondiente a la región N-terminal del dominio catalítico de la TS, el que se formuló junto a di-AMP-c para ser administrada por vía intranasal. Posteriormente se evaluó su inmunogenicidad mucosal y sistémica, así como también su capacidad de evitar la diseminación del parásito y atenuar la patología aguda y crónica luego de la infección oral. Como se comentó anteriormente, una respuesta protectora contra *T. cruzi* requiere mecanismos tanto humorales como celulares y el fragmento seleccionado muestra epítopos fuertes capaces de desencadenar ambas respuestas; entre ellos el TSKb20/IYNVGQVSI, también presente en el fragmento C-terminal.

Las propiedades adyuvantes del di-AMP-c a nivel de la mucosa nasal son evidentes, ya que sólo cuando el fragmento está acompañado del dinucleótido cíclico se produce un incremento significativo en la producción de Igs específicas o bien de la respuesta celular. De manera similar que lo observado con el fragmento C-terminal, la formulación basada en el fragmento N-terminal del dominio catalítico de la TS+A gatilló un incremento en los niveles de anticuerpos específicos, tanto circulantes como en lavado nasal que se asociaron más tarde con el grado de protección. Asimismo, la producción sistémica de IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>1</sub>, indicaría el establecimiento de un perfil mixto Th1/Th2.

Los niveles de IgA en heces no fueron buenos indicadores de protección mucosal. Si bien no es posible descartar la posibilidad de que las IgA presentes en heces puedan haber sido degradadas al momento de la recolección (notar que no se determinaron los niveles de IgA totales), es altamente probable que la cantidad de IgA específica estuviera por debajo de nuestro límite de detección. Sin embargo, pudo comprobarse que TS+A gatillaba una mayor secreción de IgA específica en el sitio de la inmunización. Esto podría tener ciertas implicancias en el control temprano de la infección oral, ya que es probable que la saliva, la orofaringe y el paladar -que ha sido descrito como la vía de ingreso de los parásitos cuando estos son depositados en la cavidad bucal (Silva-dos-Santos et al., 2017) estén enriquecidos en IgA específica e impidan que los parásitos accedan a la superficie epitelial, estrategia que también ha sido explotada contra otros patógenos (Kobuchi et al., 2019; Russell et al., 1996; Sakaue et al., 2003; Yan, 2013)

Numerosos informes indican que el di-AMP-c es muy eficaz como inmunopotenciador a nivel mucosal y que desencadena una respuesta inmune vigorosa y con un perfil mixto Th1/Th2/Th17 (Ebensen et al., 2011). Las evidencias obtenidas en este estudio, indican que la administración nasal de TS+A generó una respuesta mixta Th1/Th17 local y sistémica, caracterizada por la presencia de IFN- $\gamma$  e IL-17A en NALT (ARNm) y en plasma (proteína). Estos hallazgos se vieron reforzados por el enriquecimiento en

linfocitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> observado tras la re-estimulación *ex vivo* con el fragmento N-terminal. Coincidentemente, la inmunización intranasal de una vacuna formulada con Tc52 (antígeno no relacionado con la familia de la TS) y di-AMP-c también indujo la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-17A en linfocitos T tras la re-estimulación *ex vivo* (Cai et al., 2021). Se ha reportado que el epítipo p7, restringido por MHC-II y localizado en la región N-terminal de la TS, está asociado a la inducción de linfocitos Th1 y Th17 en el contexto de la infección por *T. cruzi* (Acevedo et al., 2018). Sin embargo, este epítipo no está presente en el fragmento utilizado en este estudio, ya que p7 se localiza entre los aminoácidos 23 a 43, mientras que nuestro fragmento lo hace entre el 63 y el 346, lo cual sugiere que el di-AMP-c es el que dirige este tipo de respuesta, independientemente de la antigenicidad del fragmento. Además, es posible que la producción sistémica y mucosal de IL-17 está en parte mediada por linfocitos B específicos de TS, tal como ha demostrado Bermejo et al en el contexto de la infección por *T. cruzi* (Bermejo et al., 2013). Futuros estudios que utilicen los distintos fragmentos recombinantes de TS adyuvados con di-AMP-c permitirán valorar el papel relativo de las poblaciones Th17 y B productoras de IL-17 en el contexto vacunal.

La IL-17 desempeña un papel importante en la resistencia a *T. cruzi* durante la fase aguda, mientras que como contracara, estaría involucrada en la mayor morbilidad y mortalidad por infección (algo similar a lo que ocurre con el TNF- $\alpha$ ), lo cual sugiere que su producción debería estar finamente regulada para evitar la inmunopatología (da Matta Guedes et al., 2010). En el contexto de la infección por *T. cruzi*, parte está contra-regulación estaría dada por IL-12 y no por IFN- $\gamma$ , de manera tal que el balance Th1/Th17 no sería influenciado por T-bet, factor de transcripción maestro inducible por IFN- $\gamma$  que promueve la diferenciación hacia el perfil Th1 (Cobb et al., 2010; Cobb and Smeltz, 2012).

Por otra parte, la TS activa, en su forma nativa, es capaz de sesgar el balance entre los perfiles Th1/Th2 a favor de este último, ya que reduce la producción de IL-2, IL-13 e

IFN- $\gamma$  e incrementa la de IL-4, mecanismo en parte involucrado en la evasión de la respuesta inmune (Ruiz Díaz et al., 2015). Es probable que el antígeno SAPA esté involucrado en este tipo de respuesta. En nuestro estudio, la sola administración del fragmento recombinante de TS que carece del dominio SAPA, no logró incrementar significativamente los niveles de IL-4 en NALT, pero si lo hizo TS+A en plasma, lo cual refuerza la noción del establecimiento de un patrón Th1/Th2/Th17 mixto tras la inmunización con antígenos acompañados por di-AMP-c, tal como se ha observado en otras vacunas para *T. cruzi* (Sanchez-Alberti et al., 2020; Sanchez Alberti et al., 2017).

El mejor control del parásito desencadenado por TS+A tuvo un efecto favorable no sólo sobre las manifestaciones clínicas de la enfermedad, sino también sobre la prevención del daño tisular agudo, a juzgar por los niveles prácticamente basales de CK, GOT y GPT y la escasa miocarditis observada. El efecto protector, también se extendió a la fase crónica de la enfermedad, ya que los animales inmunizados con TS+A presentaron menor proporción de alteraciones histológicas y eléctricas.

Si bien la miocarditis murina no refleja exactamente los hallazgos de la MCC humana, se ha demostrado que los ratones BALB/c infectados con Tulahuén presentan alteraciones electrocardiográficas, y que en particular, la prolongación del intervalo QTc es un claro indicador de daño histológico (Eickhoff et al., 2010), lo que justificó el uso del ECG para determinar en qué medida las formulaciones vacunales evitan o atenúan el desarrollo de MCC. Tal como estaba descrito, los animales SS, TS y A presentaron alteraciones en el complejo QRS y el intervalo QTc, mientras que los animales inmunizados con TS+A, mostraron valores cercanos a los de los NI. Asimismo, la menor proporción de animales que presentaron arritmias indicó que la inmunización con TS+A logra atenuar las alteraciones eléctricas de conducción y repolarización, particularmente del intervalo QTc. Un intervalo QTc prolongado implica que la repolarización ventricular es anormal, y esto podría deberse tanto a la disfunción autonómica cardíaca tan

frecuente en la MCC, o bien al proceso inflamatorio en sí mismo, que lleva a fibrosis y a dilatación miocárdica.

La cepa infectiva utilizada en este estudio, Tulahuén, es predominantemente reticulotrópica, pero también miotrópica y pertenece al DTU VI. Este linaje se ha asociado en América del Sur al desarrollo de miocarditis, junto a la DTU V (Guhl and Ramírez, 2013; Zingales et al., 2009), y en nuestro país ambas son cepas muy prevalentes (Burgos et al., 2010). Si bien su uso en este estudio se justificaba en base al daño cardíaco inducido por esta cepa tras la infección oral (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015), es aún necesario ampliar estos estudios de protección vacunal a otras cepas o DTUs que se han asociado más frecuentemente a los brotes de infección oral, como las incluidas en la DTU I, e incluso utilizar tripomastigotes metacíclicos. En una etapa posterior, se deberá incluso valorar la protección ejercida por la inmunización intranasal contra desafíos sistémicos que reflejen adecuadamente la infección vectorial (por ejemplo, subcutáneo o intradermal).

*Los resultados que se detallan en este capítulo indican que una vacuna experimental contra T. cruzi basada en un fragmento recombinante correspondiente al extremo N-terminal del dominio catalítico de la TS, adyuvada por di-AMP-c (TS+A) y administrada por vía intranasal proporcionaría protección local y sistémica contra la infección aguda causada por vía oral. Asimismo, la administración de esta formulación atenuó las lesiones tisulares durante la fase crónica de la infección experimental, hecho que se asoció a una disminución de fenómenos eléctricos anormales.*

## 5. CAPÍTULO 3

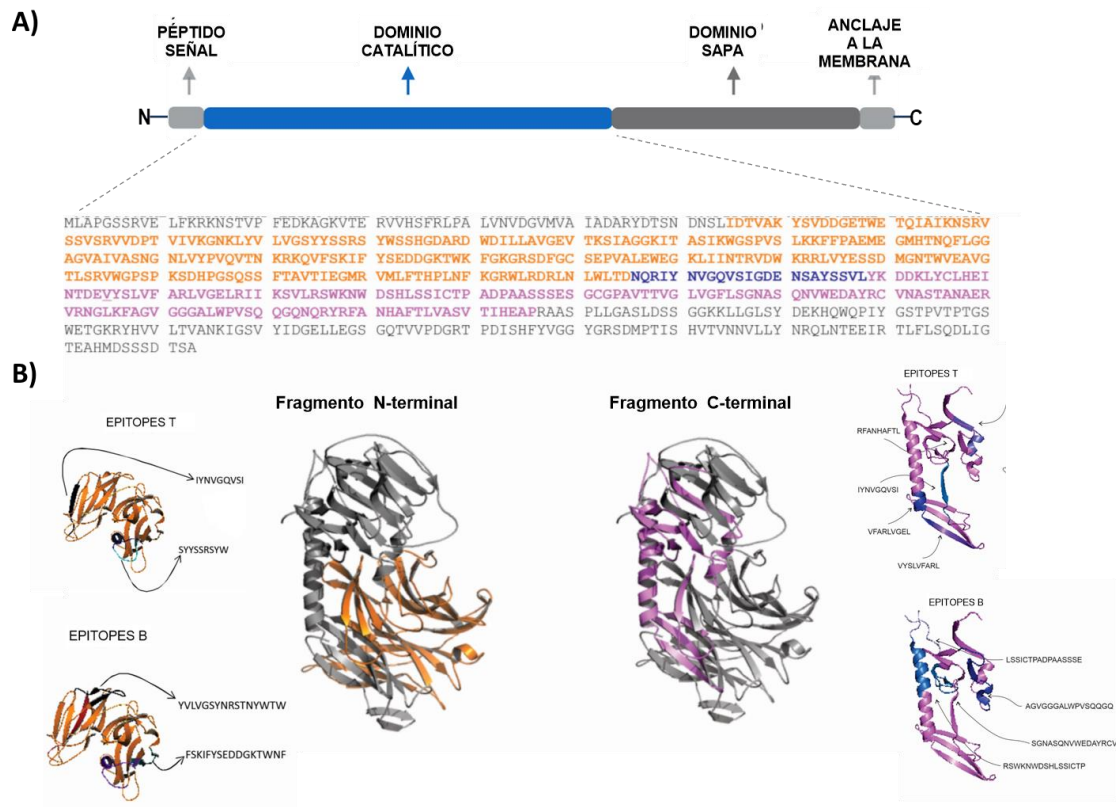
### *Evaluación preclínica de la inmunogenicidad de una formulación vacunal basada en los antígenos C-terminal y N-terminal del dominio catalítico de la Transialidasa administrada por vía nasal*

#### 5.1 INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas recombinantes a bajo costo ha hecho más factible la producción y la evaluación de la inmunogenicidad y eficacia de una importante variedad de antígenos de *T. cruzi* como posibles candidatos vacunales (Gupta et al., 2019). Es importante destacar que los sistemas de expresión de proteínas recombinantes en bacterias mejoran cuando el tamaño de las secuencias de ADN es menor a 1000 pares de bases (aproximadamente 333 aminoácidos) (Makino et al., 2011). En los capítulos precedentes, demostramos que dos fragmentos correspondientes al dominio catalítico de la TS, denominados C-terminal (de 190 aminoácidos de longitud) y N-terminal (de 290 aminoácidos de longitud), expresados en distintos sistemas bacterianos y adyuvados con di-AMP-c, desencadenaron una evidente respuesta humoral y celular específica tras ser administrados por vía intranasal. En cuanto a su efectividad, ambas formulaciones lograron buenos niveles de protección tras la infección oral con el parásito.

Estos fragmentos se solapan en una secuencia de 23 aminoácidos y ambos poseen el TSKb20/IYNVGQVSI. En el presente estudio decidimos ampliar la oferta de epítomos de la TS y formulamos una nueva vacuna compuesta por dos los fragmentos antigénicos

correspondientes a la región N-terminal y C-terminal del dominio catalítico de la TS y combinados con di-AMP-c.



**Figura 33: Selección del antígeno.** A) Esquema representativo de la secuencia completa de la proteína TS-GI. El fragmento N-terminal (en naranja) y el fragmento C-terminal (lila) comparten 23 aminoácidos (en azul). B) Modelado de la estructura del fragmento recombinante de TS-GI visualizado utilizando el sistema de gráficos moleculares PyMol v1.3 (<http://www.pymol.org>).

## 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Evaluar la inmunogenicidad de una formulación vacunal que resulta de la combinación de dos fragmentos recombinantes que cubren la región del dominio catalítico de la TS con el adyuvante di-AMP-c, administrada a nivel de mucosa nasal.*

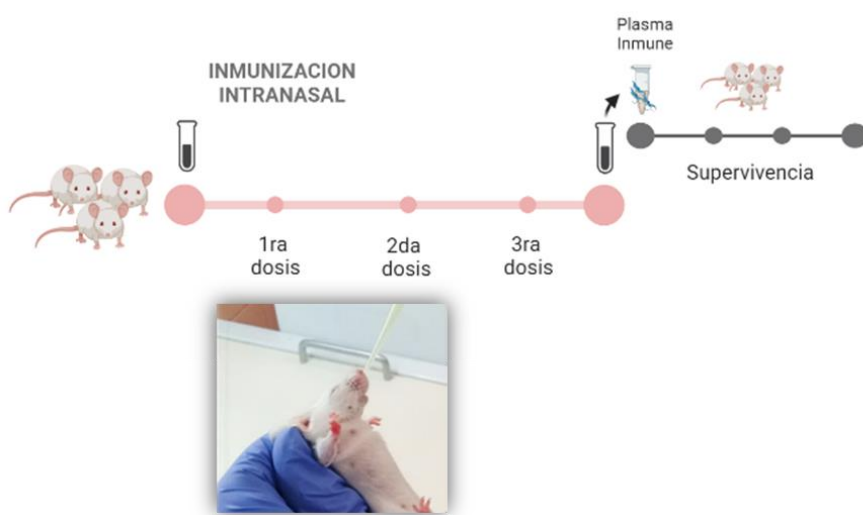
## 5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.3.1 Animales y parásitos

Se utilizaron ratones BALB/c hembras (6-8 semanas de edad) y ratones lactantes, los que se mantuvieron en las instalaciones del Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos (CIPReB-FCM-UNR). Los protocolos para estudios en animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (Res. Nro. 6698/2014 y Nro: 2958/2018). En los ensayos *ex vivo* se utilizaron tripomastigotes metacíclicos recombinantes Dm28c (DTU I) de *T. cruzi* que expresan  $\beta$ -gal. En los desafíos *in vivo* se utilizó la cepa Tulahuén (DTU VI).

### 5.3.2 Diseño experimental

Dado que la nueva formulación vacunal combinaba los dos fragmentos utilizados anteriormente en los Capítulos 1 y 2, se la denominó “doble antígeno” (TSdA). Los animales fueron inmunizados por vía intranasal con 3 dosis, administradas en intervalos de 15 días. La cantidad total de proteína se mantuvo en 10  $\mu$ g/dosis. El volumen de cada dosis fue de 20  $\mu$ L (10  $\mu$ L/fosa nasal), como se esquematiza en la Fig. 34.



**Figura 34: Esquema experimental de trabajo.** Administración intranasal de TSdA, (combinación de los fragmentos N-terminal y C-terminal del dominio catalítico de la TS), adyuvada o no con di-AMP-c, y posterior estimación de la inmunogenicidad y de la capacidad neutralizante del suero inmune.

Los grupos de trabajo fueron los siguientes:

- a) **Grupo SS**: animales a los que se le administró solución salina;
- b) **Grupo TSdA**: animales a los que se le administró 5 µg de cada fragmento recombinante de la TS diluido en el vehículo, sin adyuvante;
- c) **Grupos TSdA+A**: animales a los que se le administró 5 µg de cada fragmento recombinante de la TS más 5 µg de di-AMP-c;
- d) **Grupo A**: 5 µg de di-AMP-c.

### 5.3.3 Evaluación de la inmunogenicidad

Se utilizaron 4–7 animales/grupo. Antes de comenzar con el esquema de inmunización se recogieron muestras de sangre de la vena facial y heces, como así también 15 días luego de la segunda y tercera dosis. Quince días luego de la última dosis de inmunización, se obtuvo sangre por punción cardíaca, NALT, lavados nasales, ganglios linfáticos cervicales y el bazo de cada animal para la realización de qPCR y ensayos *ex vivo*.

#### 5.3.3.1 Determinación de los niveles de anticuerpos específicos en plasma, lavado nasal y muestras fecales

La evaluación de los niveles de anticuerpos específicos para TSdA en plasma, lavado nasal y muestras fecales se realizó siguiendo el mismo protocolo informado en el Capítulo 2, sección. 4.3.6.1.

### 5.3.3.2 Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada

La DHT se realizó mediante la inoculación intradérmica de TSdA (2,5 µg de cada fragmento) en la almohadilla plantar trasera de cada ratón 15 días después de la última inmunización. El grosor de la almohadilla plantar se determinó a las 0, 24, 48 y 72 h luego del desafío.

### 5.3.3.3 Estimulación *ex vivo* y citometría de flujo

Los bazos y los ganglios cervicales se homogeneizaron y las células obtenidas se cultivaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 48 pocillos (GBO), en medio DMEM completo solo o estimulado con TSdA (10 µg/pocillo). Luego de 60 h de cultivo, las células se incubaron con anticuerpos anti-FcγII/III-R y se marcaron con anti-CD4/Percp, anti-CD8/PE y anti-B220/APC-Cy7. Luego de permeabilizar las células, se incubaron con anti-Ki67/FITC (todos de BD Pharmingen) para determinar la proliferación celular. Se adquirió un mínimo de  $1 \times 10^5$  eventos/muestra en un citómetro BD FACSAriaII. Para el análisis de las muestras se utilizó el software FlowJo (Beckton-Dickinson, USA).

### 5.3.3.4 Aislamiento de NALT y determinación del perfil de citocinas por RT-qPCR

La remoción del NALT, la posterior extracción de ARN y la RT-qPCR se realizó siguiendo el mismo protocolo enunciado en el Capítulo 2, sección 4.3.6.6. Los cebadores se diseñaron en nuestro laboratorio y se sintetizaron en Eurofins-Genomics, USA.

Los mismos se detallan a continuación:

**IFN- $\gamma$**  Fwd: AGACAATCAGGCCATCAGCAAC  
Rev: CTCATTGAATGCTTGGCGCTG

**IL-17A** Fwd: CAAAGCTCAGCGTGTCCAAA  
Rev: CTTCCCAGATCACAGAGGGATA

**IL-4** Fwd: GCCAAACGTCCTCACAGCAA  
Rev: TCTGCAGCTCCATGAGAACA

**IFN- $\beta$**  Fwd: TGGGAGATGTCCTCAACTGC  
Rev: CCAGGCGTAGCTGTTGTACT

**TGF- $\beta$**  Fwd: TGACGTCACTGGAGTTGTACGG  
Rev: GTTCATGTCATGGATGGTGC

**IL-6** Fwd: GAGGATACCACTCCCAACAGACC  
Rev: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA

**GAPDH** Fwd: AGCAATGCATCCTGCACCACCA  
Rev: ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA

#### 5.3.4 Evaluación *ex-vivo* e *in-vivo* de la capacidad neutralizante del plasma inmune

La línea Dm28c/pLac de *T. cruzi* se obtuvo por transfección de la cepa Dm28c (DTU I) con el plásmido pLacZ (Dm28c/pLacZ) (Alonso et al., 2021). En base al protocolo de Antonoglou *et al*, los parásitos recombinantes fueron incubados en plasma inmune diluido 1/10 durante 1 h a 37°C en DMEM o sin plasma (Antonoglou et al., 2020). El plasma inmune se preparó a partir de la mezcla por partes iguales de plasmas procedentes de los animales inmunizados (5 ratones/grupo).

Paralelamente, se sembraron  $5 \times 10^3$  células Vero por pocillo, en placas de 96 pocillos y se incubaron o.n. a 37°C. Luego, se infectaron en una relación 10:1 (*T. cruzi* / Vero) con los parásitos Dm28c/pLac tratados con el suero inmune. Tras 1 h de exposición a

Dm28c/pLac, las células Vero se lavaron para eliminar los parásitos que permanecían en el sobrenadante y se incubaron 72 h. La invasión celular se estimó en función de la actividad  $\beta$ -galactosidasa presente en los amastigotes, tras la hidrólisis del sustrato cromogénico ( $\beta$ -D-galactopiranosido rojo de clorofenol, CPRG), a rojo de clorofenol, y posterior lectura colorimétrica a 595 nm. Como blanco se utilizaron células no infectadas, mientras que células expuestas al parásito en ausencia de plasma inmune se utilizaron para estimar el 100 % de invasión. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:  $\{1 - [(Abs_{595nm} \text{ de las células infectadas con parásitos expuestos al plasma inmune}) / (Abs_{595nm} \text{ de células infectadas con parásitos expuestos al vehículo})]\} \times 100$ .

Para el ensayo *in vivo*, ratones lactantes (5 días de edad) fueron desafiados por vía intraperitoneal con 500 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén, preincubados durante 1 h con los plasmas inmunes detallados previamente. La supervivencia se controló en forma diaria.

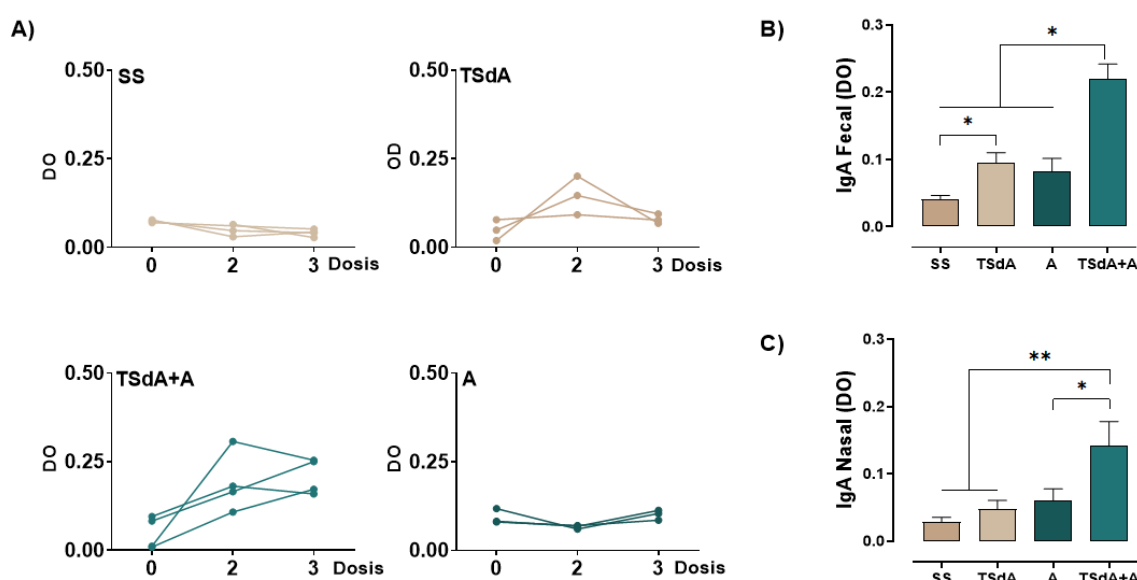
### 5.3.5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas (prueba ANOVA Kruskal-Wallis (para k grupos > 2), seguida de la prueba U de Mann Whitney (para comparaciones entre dos grupos). Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad InStat 4.0 (GraphPad, California, USA). Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando el valor de p fue < 0,05.

## 5.4 RESULTADOS

### 5.4.1 Evaluación de la respuesta a nivel de mucosas

La producción de IgA específicas que bañan la cavidad bucal y el tracto gastrointestinal es un objetivo particularmente importante en el desarrollo de una vacuna mucosal, ya que neutralizarían al parásito que ingresa por vía oral. A fin de evaluar la cinética de la secreción de IgA inducida por las distintas formulaciones, se realizaron determinaciones en heces a distintos tiempos post-inmunización. Los lavados nasales solo se evaluaron post-inmunización.

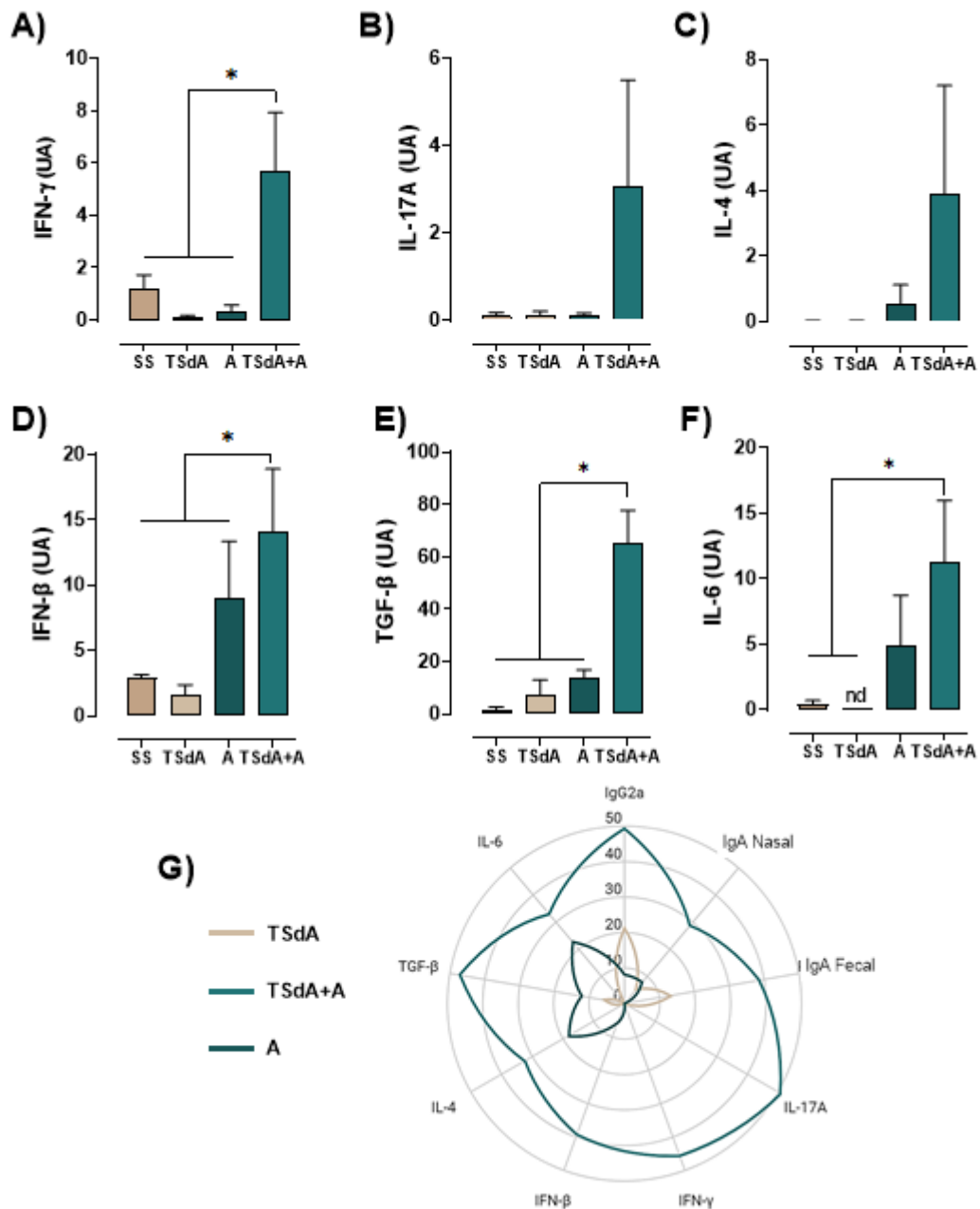


**Figura 35: Anticuerpos IgA específicos en heces y lavados nasales. A)** Cinética de la secreción de IgA específica en heces, en función del número de dosis recibidas (n=3-4). Resultados correspondientes a una ronda experimental. **B)** Niveles de IgA específicas en extractos fecales luego de completar el esquema de inmunización (n=5-6). **C)** Niveles de IgA específicas en lavados nasales en después de completar la inmunización (n=5-6). **B** y **C** corresponden a datos representativos de 2 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,001$ .

En los animales inmunizados con 2 dosis de TSdA+A y TSdA se detectó un incremento de los niveles de IgA específicas presentes en los extractos fecales (Fig. 35A). Una vez finalizado el esquema de inmunización, los niveles de IgA se mantuvieron elevados en

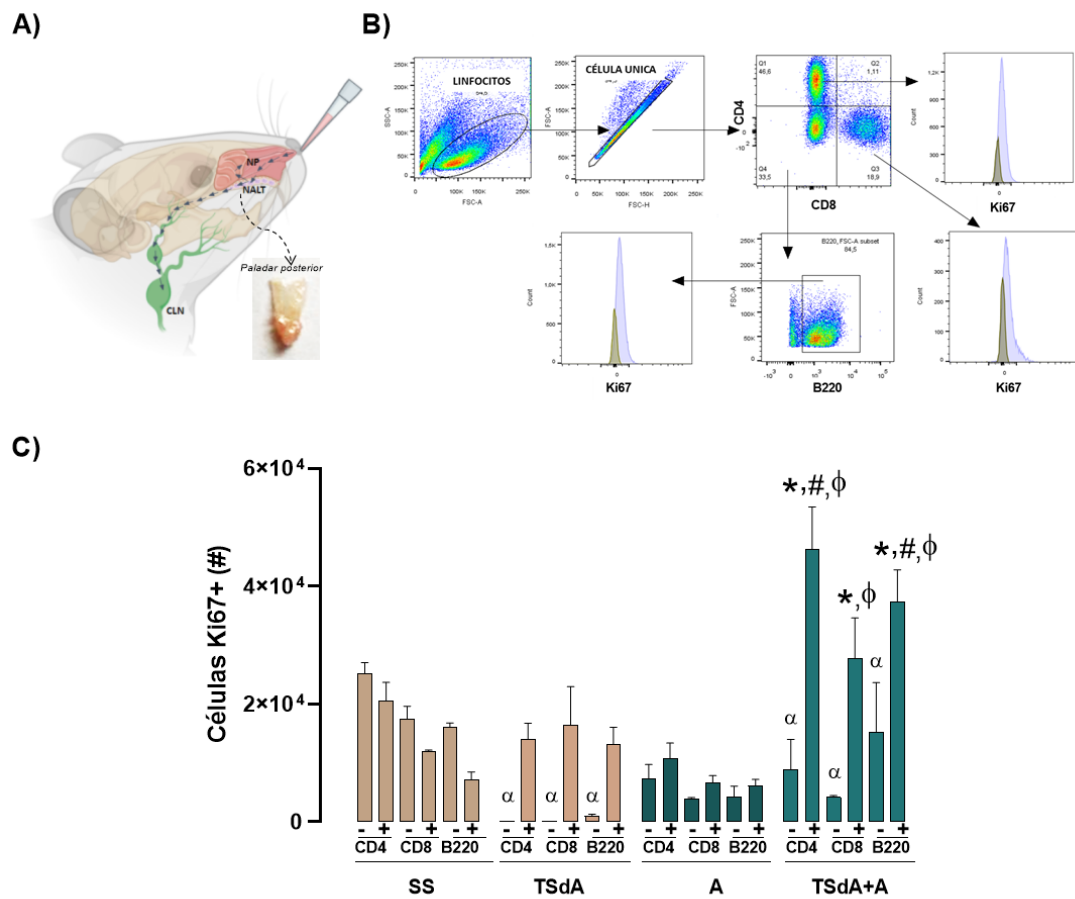
las heces de los animales inmunizados con TSdA+A, mientras que tendieron a disminuir en los que sólo recibieron TSdA, si bien fueron significativamente diferentes del grupo SS (Fig. 35A-B). Un comportamiento similar se observó en lavados nasales (Fig. 35C).

Posteriormente, para determinar si TSdA+A desencadena un perfil de citocinas particular en el NALT que estuviera vinculado a una mejor respuesta inmunogénica, se determinó al igual que en el Capítulo 2, la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17A por RT-qPCR como citocinas prototípicas de los perfiles Th1/Th2/Th17. Dado que di-AMP-c actúa como un ligando exógeno de STING exógeno que lleva a la producción de IFNs de tipo I, se determinó asimismo la expresión de IFN- $\beta$ . Con el propósito de tener un panorama más amplio del perfil de citocinas gatillado por las formulaciones, también se analizó la expresión de TGF- $\beta$  y la IL-6. Tal como se observa en la Fig. 36, los resultados indicaron que en el NALT de los animales inmunizados con TSdA+A se inducía un aumento significativo de la expresión génica de IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , IL-6 y TGF- $\beta$  en comparación con el resto (excepto IL-6, donde la diferencia frente a A no es significativa). Curiosamente, TSdA+A tendió a aumentar la expresión de IL-17A e IL-4 (detectable en  $\approx 50$  % de los ratones/grupo). Evidentemente, la administración de TSdA+A promueve un marcado entorno mixto de citocinas en NALT que difiere marcadamente del perfil inducido por las demás formulaciones y que se asocia a una mayor secreción de IgA específica en la mucosa nasal y digestiva (Fig. 36G), e incluso de IgG<sub>2a</sub> en plasma, como se comentará más adelante.



**Figura 36: Expresión de citocinas en NALT.** Quince días luego de finalizado el esquema de inmunización, se extrajo el NALT y se determinó la expresión de las siguientes citocinas por RT-qPCR: **A)** IFN- $\gamma$ , **B)** IL-17A, **C)** IL-4, **D)** IFN- $\beta$ , **E)** TGF- $\beta$ , y **F)** IL-6. ( $n=5$ ),  $*=p < 0,05$ . **G)** Gráfico de radar que ilustra el cambio de los niveles de distintos parámetros inmunes (anticuerpos y expresión de citocinas) en los animales inmunizados con TScdA+A, TScdA, y A en comparación con el grupo que sólo recibió SS. La magnitud de cada eje representa el valor promedio obtenido entre cada grupo inmunizado y el grupo SS. Por lo tanto, el aumento o la disminución de las áreas del polígono central refleja la mayor o menor contribución de cada parámetro. Datos representativos de 2 rondas experimentales independientes.

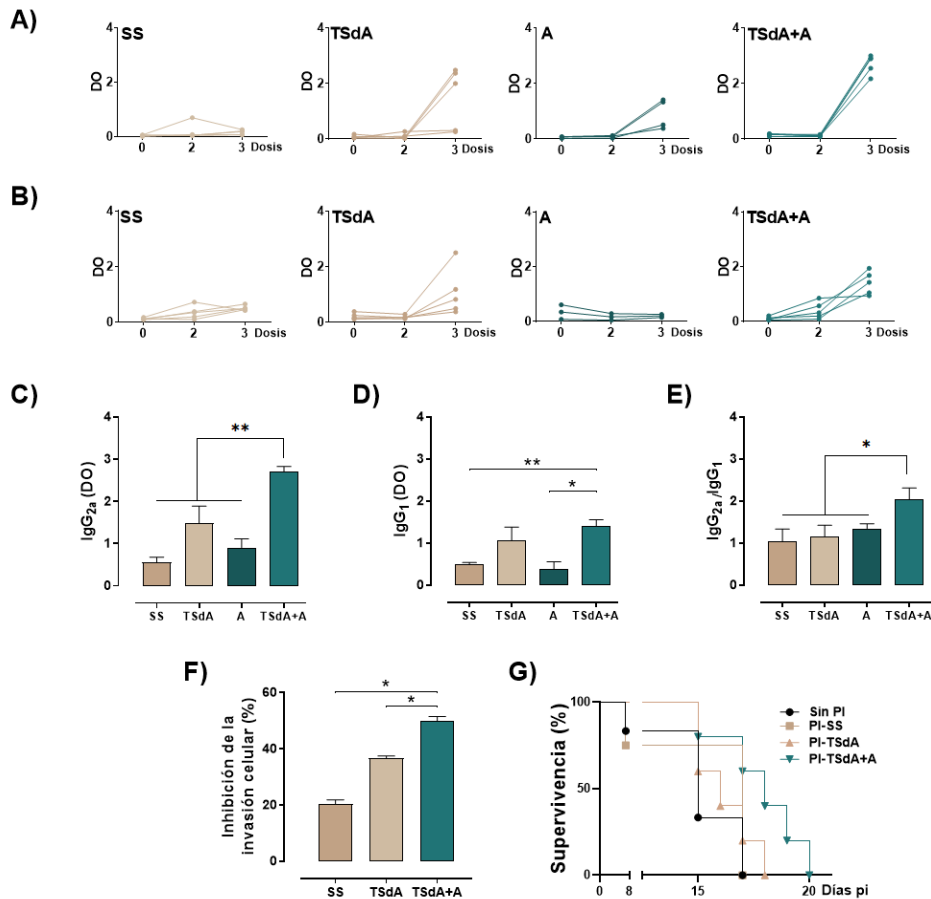
Los ganglios cervicales son sitios efectores del NALT (Lohrberg et al., 2018; Lohrberg and Wilting, 2016). Los antígenos que drenan desde las fosas nasales y las regiones del paladar adyacentes al NALT, llegan a los ganglios cervicales a través de vasos linfáticos (Fig. 37A). La re-estimulación con TSdA *ex vivo* de los linfocitos provenientes de los ganglios cervicales de los animales inmunizados con TSdA+A indujo un claro aumento de la proliferación de los linfocitos T CD4, TCD8 y linfocitos B (Fig. 37B-C).



**Figura 37: Respuesta de la mucosa y de los ganglios linfáticos de drenaje después de la inmunización nasal intranasal con TSdA+A. A)** Esquema del tejido linfoide asociado a la nasofaringe de ratón (NALT), el paladar posterior, los pasajes nasales (NP) y los ganglios linfáticos cervicales (CLN). Las flechas indican las vías de drenaje del flujo linfático. **B)** Estrategia de gating para evaluar la proliferación de linfocitos T y B localizados en los ganglios cervicales mediante la marcación intracelular de Ki67. **C)** Proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y linfocitos B B220<sup>+</sup> expuestos *ex vivo* a TSdA.  $\alpha$  =  $p < 0,05$  versus grupo estimulado con TSdA, \* =  $p < 0,05$  versus Co, # =  $p < 0,05$  versus grupo TSdA,  $\phi$  =  $p < 0,05$  versus grupo c-di-AMP.

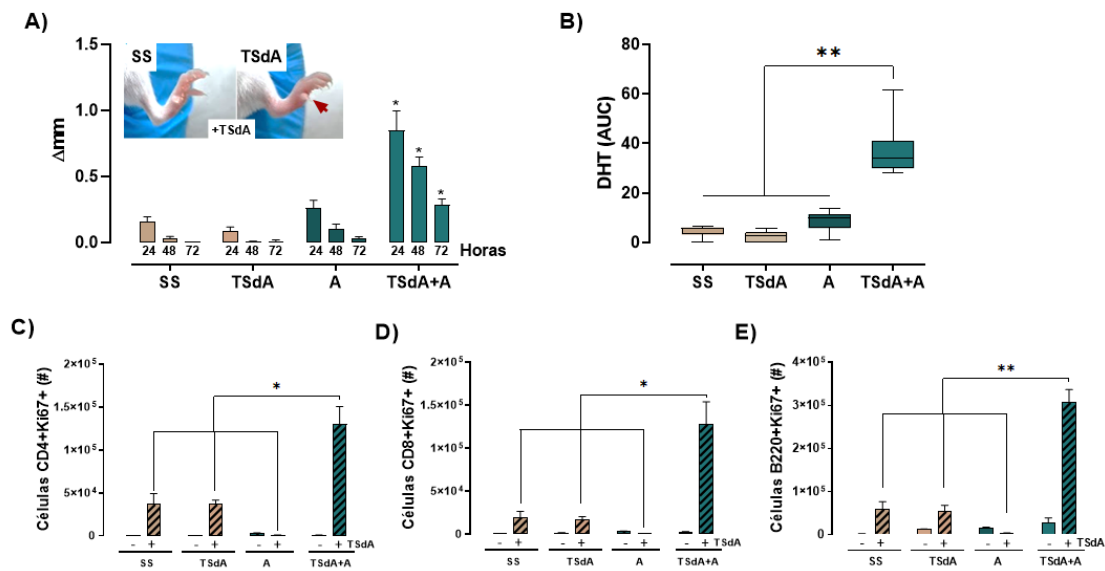
## 5.4.2 Evaluación de la respuesta sistémica

A diferencia de lo que se observó con la IgA específica, la respuesta de IgG<sub>2a</sub> (Fig. 38A) e IgG<sub>1</sub> (Fig. 38B) se hizo evidente después de la tercera dosis, indicando cierto retraso con respecto a la respuesta mucosal. Tras la tercera dosis y tal como se esperaba, TSdA+A provocó una respuesta robusta de IgG<sub>2a</sub> específica en comparación a las demás formulaciones. En cuanto a los anticuerpos IgG<sub>1</sub> específicos sólo alcanzó significación estadística en el grupo TSdA+A cuando se contrastó con los grupos SS o A.



**Figura 38: Respuesta humoral sistémica específica.** Cinética de la secreción de: **A)** IgG<sub>2a</sub> específica y **B)** IgG<sub>1</sub> específica en plasma en función del número de dosis recibidas (n=3-4). Resultados correspondientes a una ronda experimental. Niveles de anticuerpos específicos en plasma tras 15 días de finalizado el esquema vacunal: **C)** IgG<sub>2a</sub> **D)** IgG<sub>1</sub>. **E)** Porcentaje de inhibición de la invasión de células Vero infectadas con parásitos previamente expuestos a plasma inmune (PI). **G)** Mortalidad de ratones lactantes infectados intraperitonealmente con parásitos *Tulahuen* expuestos previamente a PI. El PI fue obtenido a partir de animales inmunizados con TSdA, TSdA+A, o animales tratados con vehículo (Log-rank test,  $p < 0.05$ ).

El balance  $IgG_{2a}/IgG_1$  aumentó en los ratones inmunizados con TSdA+A, lo cual sugería el establecimiento de un ambiente Th1 por sobre un Th2 (Fig. 38A-C). Además, los parásitos expuestos al plasma inmune de animales vacunados con TSdA+A mostraron una capacidad de invasión disminuida ( $\approx 50\%$ ) y aumentaron el tiempo de supervivencia en ratones susceptibles, como se aprecia en la Fig. 38F-G.



**Figura 39.** **A)** Grosor de la almohadilla plantar tras 24, 48 y 72 h luego la administración intradérmica de  $5 \mu g$  de TSdA e imágenes representativas de la inflamación plantar tras 48 horas. Los resultados se expresan como la diferencia entre el valor del control de la almohadilla plantar y el inoculado con TSdA (delta,  $\Delta mm$ ). **B)** La respuesta global de la DHT se calculó como el área bajo la curva (AUC) de 0 a 72 horas luego del desafío con TSdA. Los esplenocitos se re-estimularon ex vivo con TSdA durante 60 h y luego se marcaron intracelularmente con anti-Ki67 para estimar la proliferación específica de: **C)** Células T CD4+Ki67+; **D)** células T CD8+Ki67+; y **E)** células B B220+Ki67+ (en números absolutos = #) Los niveles de significación se definen como: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

En términos de respuesta celular, los animales inmunizados con TSdA respondieron a la inoculación dermoplantar de TSdA con una inflamación, incluso luego de 72 h (Fig. 39A). Asimismo, la respuesta global entre 0-72 h también es evidente al observar el área bajo la curva (Fig. 39B). Además, después de la re-estimulación ex vivo con TSdA, el número absoluto de linfocitos T esplénicos y linfocitos B que expresan Ki67 aumentó notablemente en el grupo TSdA+A (Fig. 39C-E).

En conjunto, estos resultados mostraron que la administración intranasal de TSdA+A provocó una respuesta humoral y celular sistémica robusta contra TSdA, que se asemejó a la respuesta observada previamente para el fragmento C-terminal del dominio catalítico de la TS.

## 5.5 DISCUSIÓN y CONCLUSIONES PARCIALES

En lo que concierne a vacunas experimentales destinadas a prevenir la ECh, el perfil de la respuesta inducido por la inmunización intranasal en el sistema de mucosas y cómo ésta puede dar forma a la respuesta sistémica es un campo de investigación poco explorado. Aquí se amplió la caracterización de perfil de citocinas que se expresan en el NALT tras la inmunización, y se demostró que una vacuna basada en TSdA+A y administrada por vía intranasal induce un patrón mixto de citocinas en la NALT, que está claramente asociado con la inmunogenicidad local y sistémica. Coincidentemente, el aumento de IgA específica en lavados nasales de animales vacunados con TSdA+A se asoció con una mayor expresión en NALT de IL-6 y TGF- $\beta$ , dos citocinas involucradas en el cambio de clase de IgA (Ramsay et al., 1994; Takaki et al., 2017; Tezuka and Ohteki, 2019). Además, la secreción de IgA se relacionó con la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-17A. Si bien, como se mencionó anteriormente, la inmunidad celular protectora sistémica contra el parásito requiere tanto de células Th1 y Th17, su papel combinado en el sitio inductivo de la mucosa es menos conocido. Sin embargo, recientemente se demostró mediante la utilización de ratones IL-17 knockout (KO) que tanto los linfocitos Th17 y como la IL-17A son actores clave en la protección de la mucosa contra la infección gástrica por *T. cruzi* (Cai et al., 2021). TSdA+A indujo en NALT un patrón sesgado Th1/Th17 acompañado de expresión de IL-4 (Th-2) en  $\approx$ 50% de los animales.

Además, la expresión de IFN- $\beta$  gatillada por STING en en el NALT de animales vacunados con TSdA+A y A sugería que también podrían tener lugar otros mecanismos de protección directos e indirectos. En otras palabras, el di-AMP-c puede activar a las células dendríticas del NALT, con el consecuente incremento de las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 y también de las moléculas del MHC-II, favoreciendo la activación de diferentes subpoblaciones Th (Škrnjug et al., 2014b). Este efecto puede ser inducido por la expresión de IFN- $\beta$  por las células dendríticas localizadas en el NALT, ya que cuando el di-AMP-c es administrado por vía intranasal puede modular *in situ* la respuesta innata y adaptativa de las células T y B a través de las vías STING, tal como se ha demostrado en otros modelos (Škrnjug et al., 2014a). Además, se sabe que la administración nasal de IFNs de tipo I aumenta la secreción de IgA específicas, pero también lo hace con IgG<sub>2a</sub> en plasma durante el curso de infecciones respiratorias virales (Staats and Thompson, 2011). Por lo tanto, es concebible que, en el NALT, el eje di-AMP-c/STING/IFN- $\beta$  también contribuya a la inmunogenicidad humoral global provocada por la vacuna TSdA+A.

Los animales vacunados con TSdA+A mostraron una respuesta de IgA más temprana en comparación con la sistémica, en forma similar a lo que se evidencia en infecciones virales de las vías respiratorias (Alu et al., 2022). Por otra parte, la secreción de IgA específica inducida por TSdA+A no se limita a la cavidad nasal, sino también se extiende a una mucosa distal, la del tracto digestivo. Estos resultados indican que los linfocitos B activados en el sitio de inducción (NALT) pueden dar instrucciones para regresar a las estructuras linfoides de la cavidad nasal, pero algunos de ellos también siembran la mucosa intestinal distal, produciendo allí Is IgA específicas. Este hecho es relevante en el contexto de una vacuna mucosal diseñada para prevenir la infección oral, porque la siembra de linfocitos B de memoria o efectores específicos de TSdA en el tracto gastrointestinal evitaría la invasión epitelial del parásito.

Por último, en animales inmunizados con TSdA+A, la proliferación de linfocitos T y B provenientes de los ganglios cervicales y del bazo específicos para TSdA, sumado a la presencia de anticuerpos IgG<sub>2a</sub>, detectados, señalan el establecimiento de una clara respuesta sistémica desencadenada por la inmunización intranasal.

*En general, los resultados que se muestran aquí indican que la formulación TSdA+A administrada por vía nasal desencadena un patrón mixto de citocinas en NALT que se asocia con un perfil inmunogénico claro, siendo un candidato vacunal prometedor contra T. cruzi. Dado que una de las vías naturales de infección parasitaria es la mucosa oral, que está en estrecho contacto con el NALT, esta vacuna proporcionaría una protección tanto local como sistémica óptima frente a la diseminación oral del parásito.*

## 6. CAPÍTULO 4

### *Evaluación in silico de la diversidad de Transialidasas del Grupo I y su potencial aplicación en vacunas*

#### 6.1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas de la familia de la TS son extremadamente heterogéneas. Inicialmente se determinó que esta familia constaba con aproximadamente 1.430 miembros, pero luego este número aumentó a 3.209 (El-Sayed et al., 2005; Weatherly et al., 2016). Como se comentó en la introducción (Fig. 10), esta superfamilia se la subclasifica actualmente en ocho grupos (TS-GI a TS-GVIII), según la similitud de secuencia y las propiedades funcionales, así como la presencia o ausencia de motivos altamente conservados (Freitas et al., 2011).

En la literatura sobre vacunas contra *T. cruzi* se suele utilizar el término “*Transialidasa*” para referirse a diferentes proteínas de esta amplia familia. Esto genera un cierto grado de confusión, dado que las TS reportadas como candidatos vacunales suelen pertenecer a diferentes grupos, por lo que, en muchos casos, el porcentaje de identidad de estas secuencias es baja o nula. Curiosamente, la diversidad de las TS que han sido utilizadas como candidatos vacunales ha sido escasamente analizada, a pesar de que es fundamental para el desarrollo de una vacuna.

Como también se comentó en la introducción, *T. cruzi* presenta una diversidad genética sustancial, lo que ha permitido clasificarlo en 7 linajes o DTUs (DTU I a DTU VI, más DTU VII o TcBat). Hay que considerar que el uso de una TS proveniente de una DTU particular puede ser un inconveniente para lograr la protección contra otras DTU o

aislados que presenten variaciones en las secuencias de estas proteínas. Por lo tanto, la eficacia de una vacuna basada en TS debe idealmente ser efectiva contra una amplia diversidad genética de parásitos.

En este contexto, es importante distinguir entre los conceptos de “inmunogenicidad” y “antigenicidad”. Así, la inmunogenicidad se define como la capacidad que posee un microorganismo o un componente del mismo para inducir una respuesta inmune humoral y celular específica tras su exposición al sistema inmunitario del hospedero. Por otra parte, la antigenicidad es la capacidad de reconocimiento del microorganismo o sus componentes por parte de las moléculas del sistema inmune. En este capítulo y en el caso particular de los epítomos T, la antigenicidad se entiende como la capacidad que presenta una determinada secuencia de unirse a uno o varios alelos del MHC-I o II. Asimismo, la unión péptido antigénico: MHC es una condición necesaria para el posterior reconocimiento del epítomo por los linfocitos T.

Idealmente, los epítomos T presentes en las TS-GI en las vacunas humanas deberían ser lo suficientemente antigénicos (es decir poder ser presentados por los HLA característicos de la población blanco para posteriormente ser reconocidos por los linfocitos T) e inmunogénicos (generar una respuesta de memoria). Es importante notar, que para lograr una buena traslación desde el campo preclínico al clínico, estos epítomos deberían haberse previamente testeado en un modelo con similar antigenicidad e inmunogenicidad (Kiros et al., 2012).

Las TS activas o TS-GI son una de las más utilizadas en el desarrollo de vacunas contra *T. cruzi*, junto a las TS-GII (como ASP-2 y TSA-1). Si bien las TS-GI parecen ser buenos candidatos vacunales debido a su evidente capacidad inmunogénica (da Costa et al., 10 2021), su diversidad antigénica no ha sido analizada en profundidad.

En este capítulo se pretendió profundizar en algunos de estos aspectos a través de distintas herramientas bioinformáticas.

## 6.2 OBJETIVO GENERAL

*Identificar epítomos candidatos de TS-GI con capacidad protectora mediante herramientas bioinformáticas*

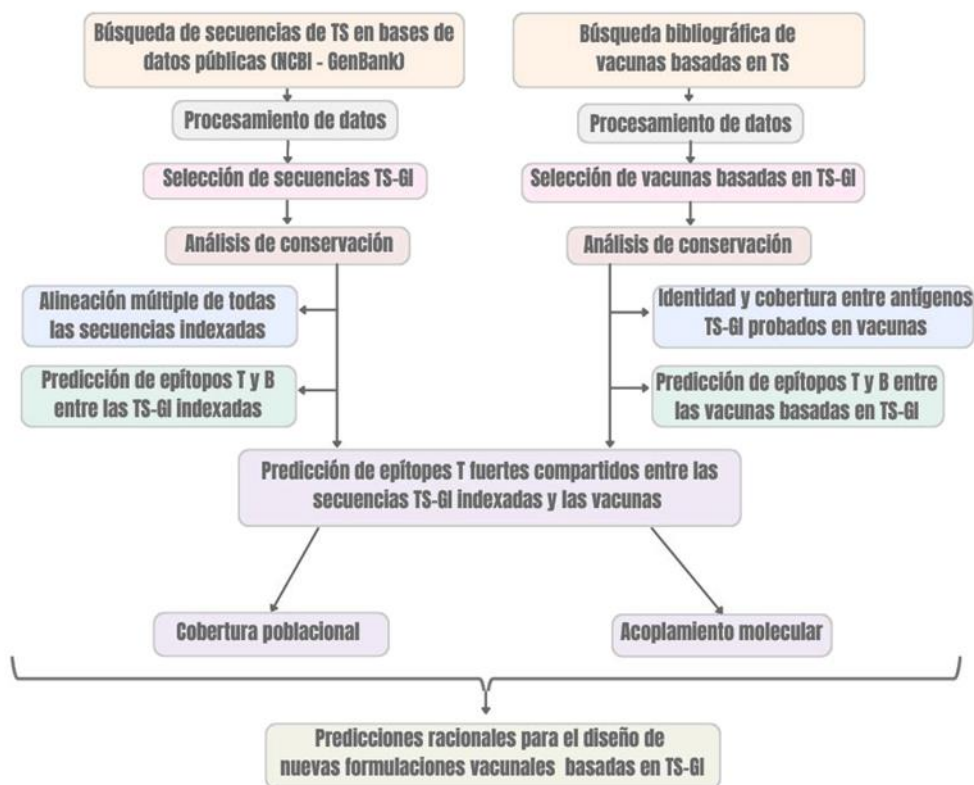
### 6.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Analizar in silico, la heterogeneidad y la antigenicidad de las TS-GI presentes en los distintos linajes de T. cruzi.*
- *Predecir in silico, la heterogeneidad y la antigenicidad de las TS-GI testeadas en vacunas experimentales.*
- *Predecir si los epítomos presentes en las vacunas experimentales pueden proteger contra diferentes cepas de parásitos, y a su vez, a la población humana.*

## 6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.3.1 Flujo de trabajo metodológico

La secuencia de análisis realizada este estudio se ilustra en la Fig. 40. Las herramientas bioinformáticas utilizadas en cada paso se describen a continuación.



**Figura 40: Flujograma adoptado en este estudio.**

### 6.3.2 Genomas y Secuencias

Se obtuvieron todas las secuencias correspondientes a TS-GI indexadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Luego, estas secuencias fueron alineadas utilizando la herramienta de alineamiento BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Esta misma herramienta fue utilizada para identificar secuencias de genomas de *T. cruzi* cargados previamente en NCBI.

Las secuencias de TS-GI se obtuvieron de acuerdo con los siguientes criterios:

- a) Búsqueda de secuencias dentro de genomas indexados en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando la base de datos Assembly (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>). La secuencia XP\_807431.1 trans-sialidasa [*T. cruzi* cepa CL-Brener] se utilizó como referencia para la búsqueda (*search query*). Esta secuencia posee la región SAPA en el extremo C-terminal y el péptido señal en el N-terminal. Se utilizó como criterio de inclusión de las distintas secuencias, la presencia de la región SAPA, motivo únicamente presente en las TS-GI (Campetella et al., 5 2020; Freitas et al., 2011).
- b) Utilizando la misma *search query*, se realizó una búsqueda en BLAST, y se seleccionaron todas aquellas secuencias que presentaban la región SAPA y una cobertura mayor al 80%.
- c) Todas las secuencias obtenidas en los ítems “a” y “b” fueron posteriormente traducidas a proteína. Teniendo en cuenta que la leucina es el primer aminoácido en la secuencias de las TS-GI (Pollevick et al., 1993), se seleccionaron todas las secuencias que comenzaban con leucina y mostraban al menos una repetición SAPA.
- d) Se agregaron al análisis las secuencias EU805797, EU805798, EU805799 y EU805801, las que si bien no presentan SAPA, fueron clonadas, secuenciadas y mostraron actividad en un estudio experimental (Ratier et al., 10 2008).

Las secuencias de nucleótidos se tradujeron utilizando la herramienta de traducción ExpASy (<https://web.expasy.org/translate/>).

Paralelamente, se realizó una extensa búsqueda bibliográfica sobre estudios experimentales que utilizan proteínas de la familia de la TS como inmunógenos en sus formulaciones vacunales. Las búsquedas se realizaron en tres bases de datos que incluyen bibliografía indexada (PubMed, Scopus, Scielo) y una base de datos que permite acceder a textos completos (Google Scholar), utilizando las siguientes palabras clave: Enfermedad de Chagas, Chagas disease, vaccine, vacuna, Trans-sialidase,

Transialidasa, *Trypanosoma cruzi* y SAPA. La búsqueda se realizó en octubre de 2022 y se incluyó toda la bibliografía disponible hasta ese momento. Se detectaron 38 estudios que utilizaron proteínas de la familia de la TS o fragmentos de ellas en las formulaciones vacunales, mientras que 23 de estos estudios utilizan proteínas TS-GI como inmunógenos (60,5% de los estudios). Luego, las 23 TS-GI detectadas se subclasificaron según su grupo de pertenencia (GI a GVIII). Por último, los análisis de secuencia se realizaron sólo en las proteínas o fragmentos clasificados como TS-GI.

### 6.3.3 Análisis de secuencia

Los alineamientos de las secuencias se realizaron con el programa JalView de MUSCLE utilizando la configuración predeterminada. Se utilizó el servidor Logo Plot (<https://weblogo.berkeley.edu/>) para representar la diversidad de aminoácidos. Para caracterizar las secuencias obtenidas a partir de proteínas TS-GI, se utilizó la herramienta ScanProsite del grupo ScanProsite (<https://web.expasy.org/translate/>), tomando en cuenta los criterios descritos por Freitas et al. 2011 (Freitas et al., 2011), es decir, la presencia de la región SAPA repetitiva, la caja ASP y los motivos VLV y FRIP. La identidad y la similitud de las secuencias se analizaron utilizando la herramienta Sequence Identity And Similarity (SIAS, <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

Con el objetivo de identificar epítomos de células T presentes en las secuencia de las TS-GI, que presenten una afinidad de unión elevada al MHC cualquiera sea el hospedero (humano o ratón) se utilizaron los programas NetMHC-4.0 para MHC-I y NetMHCIIpan-4.0 (Andreatta and Nielsen, 2016; Nielsen et al., 2003; Reynisson et al., 2020). Teniendo en cuenta que los ratones BALB/c y C57BL/6 son los principales modelos utilizados en las pruebas de vacunas, los alelos utilizados para la evaluación de la unión de péptidos antigénicos fueron H-2K<sup>b</sup> y H-2K<sup>d</sup> para los epítomos de MHC-I;

y H-2IE<sup>d</sup>, H-2IA<sup>b</sup> y H-2IA<sup>d</sup> para epítomos de MHC-II. El servidor utilizado en este caso fue <https://services.healthtech.dtu.dk/>.

La fuerza de la unión MHC:péptido se calculó para péptidos de 9-mer en el caso de MHC-I y 15-mer para MHC-II. Los epítomos T fuertes se definieron como aquellos que tienen un puntaje de rango percentil <0,5. En una etapa posterior, los epítomos fuertes predichos para el MHC-I murino se compararon con los epítomos fuertes predichos para los supertipos de HLA humanos.

Los epítomos lineales de células B se predijeron utilizando ABC pred ([https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC\\_submission.html](https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)).

#### 6.3.4 Acoplamiento molecular y estimación de la afinidad de unión

El acoplamiento molecular (conocido también como "*molecular docking*") predice la conformación preferida de dos proteínas, al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable (Ciemny et al., 2018). Para la realización del análisis de acoplamiento molecular entre las moléculas del MHC:péptidos antigénicos y la estimación de la afinidad de unión, se contó con la inestimable colaboración del Dr. Fernando Herrera, perteneciente al Área de Modelado Molecular, Departamento de Física, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Para las predicciones conformacionales se utilizó una red neuronal artificial en AlphaFold2 (Mirdita et al., 2022), a través de su interfaz Colab "ColabFold v1.5.2:AlphaFold2 - MMseqs2". Para el MHC-I, sólo se consideraron los dominios extracelulares  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , que contienen el surco de unión al péptido. Los péptidos evaluados poseían secuencias peptídicas de 9-mer. Para las estructuras cristalográficas de las proteínas acopladas, se eligieron plantillas que utilizan la base de datos PDB70. Los mejores 5 resultados se obtuvieron usando Amber en la interfaz de Colab, y se seleccionaron las 5 estructuras MHC-I:péptido más "relajadas" para el cálculo de la

afinidad de unión, mediante el programa PRODIGY17 (Romero-Molina et al., 2022; Vangone and Bonvin, 2017). El complejo con la menor afinidad de unión, para cada complejo MHC-I:péptido, se eligió como representativo del mismo.

## 6.4 RESULTADOS

### 6.4.1 Heterogeneidad y antigenicidad de las secuencias indexadas de TS-GI

En primer lugar, realizó una búsqueda de secuencias de TS indexadas en GenBank seguidas de un alineamiento de las mismas. En la Tabla 1 se detallan las 49 secuencias de TS-GI indexadas, pertenecientes a las DTU I, II, V y VI.

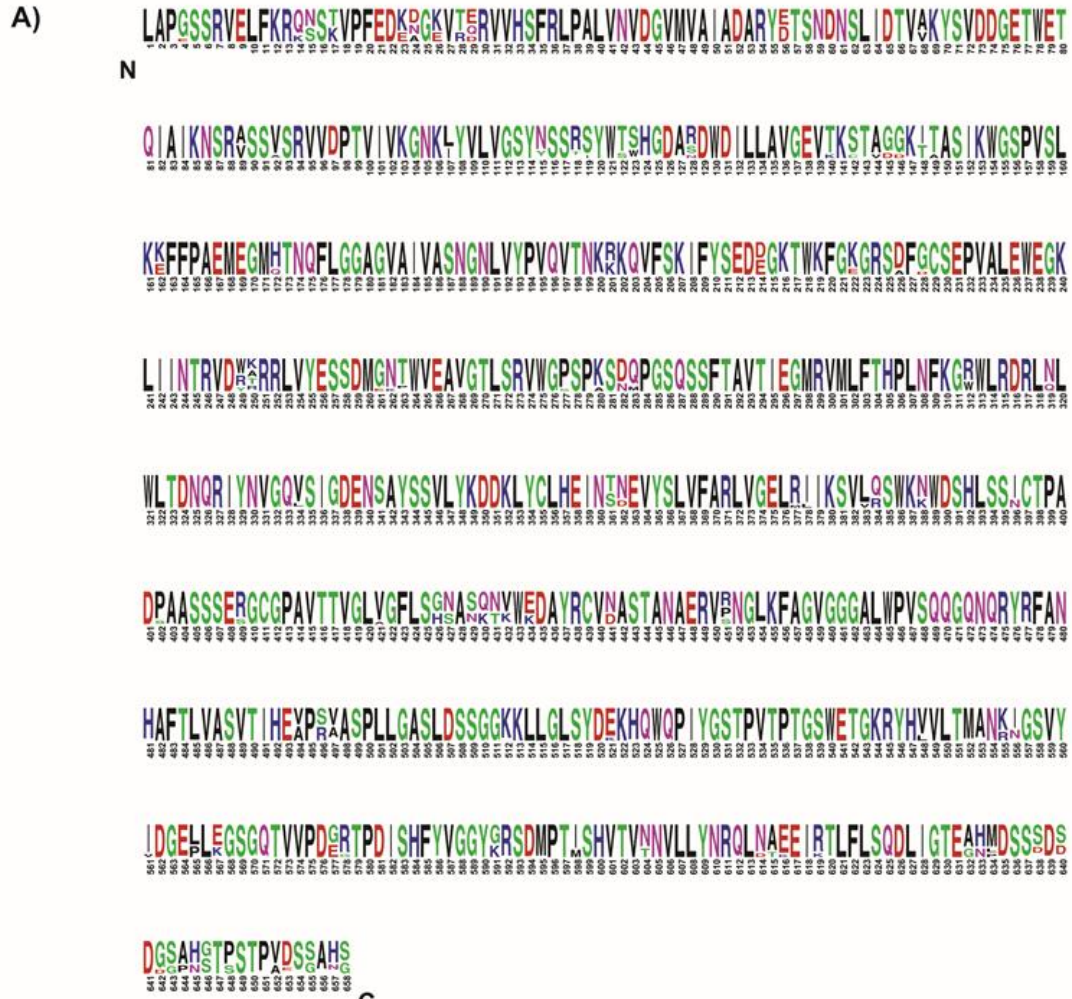
**Tabla 1. Secuencias de TS-GI obtenidas a partir de la base de datos de Genbank**

DTU	Cepa	Número de acceso	Número de secuencias obtenidas	Total
I	Brazil Dm28C JR.cl, Tula	ASM1503362v1 ASM317710v1 A_000331405.1 GCA_000365225.1	5 9 2 1	17
II	Berenice Esmeraldo Y	ASM1335865v1 GCA_000327425.1 ASM1503365v1	2 1 2	5
V	Bug2148 SC43	ASM274941v1 GCA_003177095.1 )	9 3	12
VI	TCC Tulahuen Brener	PRFC00000000.1 AAA99444.1 ASM20906v1 EU805797 EU805798 EU805799 EU805801	5 1 6 1 1 1 1	16

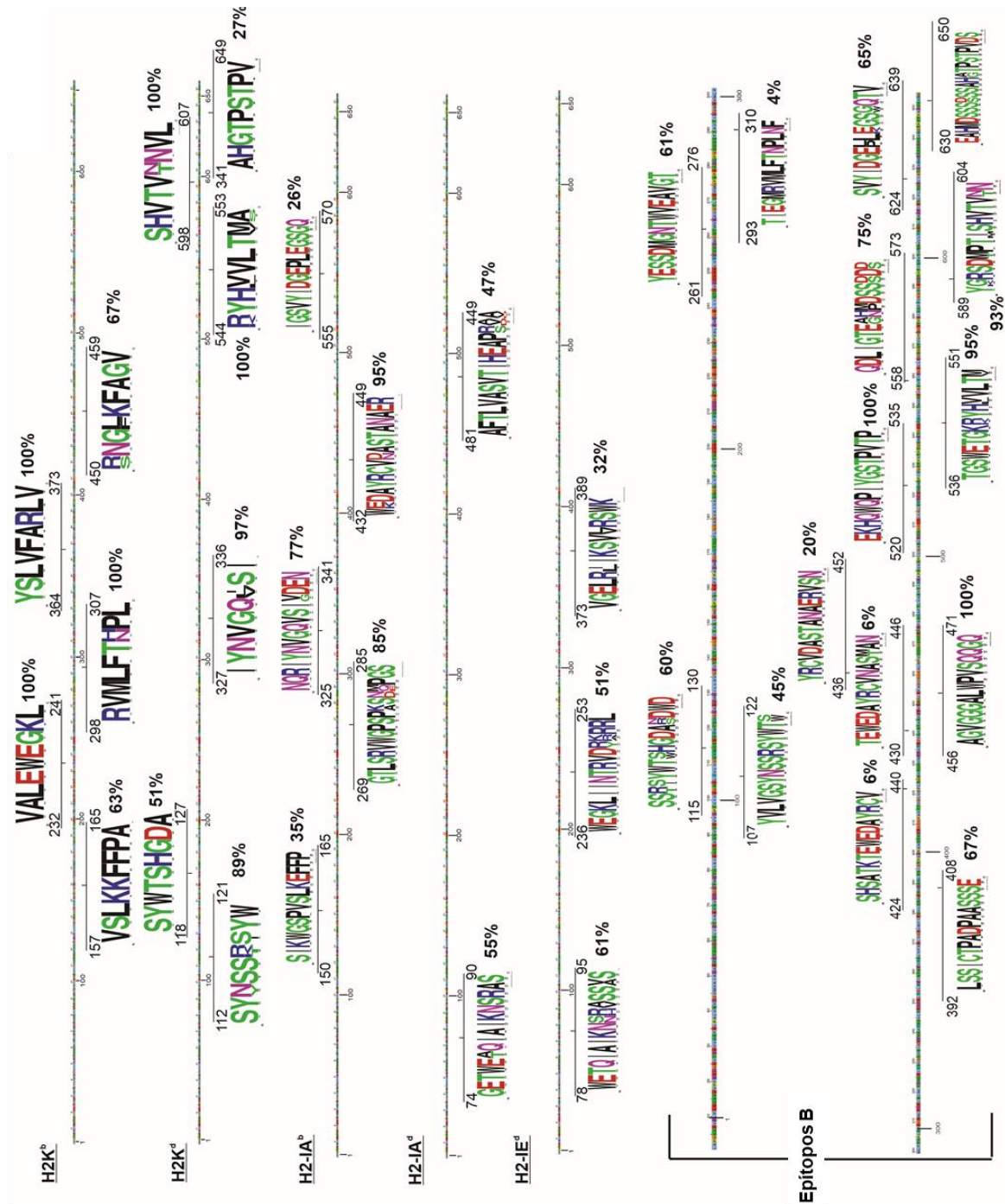
Coincidentemente, estas DTUs están relacionadas con las infecciones en seres humanos. A partir del alineamiento múltiple de las 49 secuencias, se generó un Logo de secuencias (o Logo Plot, Fig. 41A), donde puede apreciarse que la variabilidad de aminoácidos en estas secuencias es baja. En otras palabras, las 49 secuencias están muy conservadas, arrojando una identidad global de  $92,8\pm 3,8\%$  y una similitud global de  $94,1\pm 3,5\%$ , entendiéndose por identidad la coincidencia total entre los aminoácidos presentes en las secuencias, mientras que similitud indica el grado de coincidencia entre las secuencias.

Adicionalmente, se hizo un estudio comparativo para conocer en qué proporción la diversidad de secuencias de las TS-GI indexadas y pertenecientes las DTU I, II, V y VI difieren de la secuencia de referencia descrita por Cremona et al (primera secuencia completa reportada de TS-GI; GENBANK N° AAA99442.1) (Cremona et al., 1995). Como resultado, se observó que la dispersión dentro de cada DTU es similar a la que se obtiene al comparar la totalidad de las secuencias indexadas con la secuencia de referencia de Cremona (Fig. 41B). Estos datos, que indicaron una identidad superior al 90%, confirmaron una baja variabilidad de secuencias al menos entre todas las TS-GI indexadas, a pesar de la diversidad genética de las cepas de *T. cruzi* de las cuales provienen.

Teniendo en cuenta que BALB/c y C57BL/6 son las cepas murinas más utilizadas en los ensayos preclínicos de vacunas, luego se analizó si los epítomos T fuertes se conservan entre las TS-GI. Para este análisis se tuvieron en cuenta los epítomos T restringidos por H-2K<sup>d</sup>, H-2K<sup>b</sup> (MHC-I) y H-2IE<sup>d</sup>, H-2IA<sup>d</sup> y H-2IA<sup>b</sup> (MHC-II).



**Figura 41:** **A)** El Logo Plot muestra el grado de conservación de los residuos en las 49 secuencias de las TS-GI obtenidas del GenBank o disponibles en diferentes genomas de *T. cruzi* en comparación con una secuencia de referencia (GENBANK N° AAA99444.1.) y traducidas a proteína. **B)** Porcentaje de identidad de las 49 secuencias indexadas en GenBank a octubre de 2022 y clasificadas según su DTU (I, II, V, o VI).  $\Sigma$ 49 seq.: suma de las 49 secuencias indexadas mencionadas previamente. Los datos corresponden a 17 secuencias de la DTU I, 5 secuencias de la DTU II, 12 secuencias de la DTU V y 16 secuencias de la DTU VI.



**Figura 42. Predicción de epítomos fuertes en las TS-GI indexadas.** Se consideraron epítomos T con una fuerte afinidad predicha por los H-2K<sup>b</sup> y H-2K<sup>d</sup> (MHC-I) y H-2-IA<sup>b</sup>, H-2-IA<sup>c</sup> y H-2-IE<sup>c</sup> (MHC-II) murinos. Las familias de epítomos se definieron como regiones donde se predicen epítomos fuertes a pesar de existir algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos. Se consideraron longitudes de cobertura de de 9-mers (para epítomos individuales) o 11-mers (en el caso de familias) para MHC-I y 15-mers (para epítomos individuales) o 20-mers (en el caso de familias) para MHC-II. También se consideraron epítomos lineales de células B.

En este análisis no solo consideramos los epítomos idénticos, sino también las familias de epítomos, que definimos como regiones donde se predicen epítomos fuertes a pesar existir algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos. Este criterio nos permitió determinar si alguna variante de un epítomo podría ser igualmente reconocida por el mismo MHC. Se realizó un análisis similar para los epítomos B. Así, se determinó el porcentaje de familias de epítomos T y B conservadas en las TS-GI de diferentes DTU. Como puede observarse en la Fig. 42, varios epítomos T fuertes restringidos por H-2K<sup>b</sup>, H-2K<sup>d</sup>, H-2IE<sup>d</sup>, H-2IA<sup>b</sup>, H-2IA<sup>d</sup> y también epítomos lineales B se conservan en el conjunto de secuencias representativas indexadas, llegando incluso al 100% de conservación en algunos casos.

#### 6.4.2 Heterogeneidad y antigenicidad de las secuencias de TS-GI utilizadas en vacunas experimentales

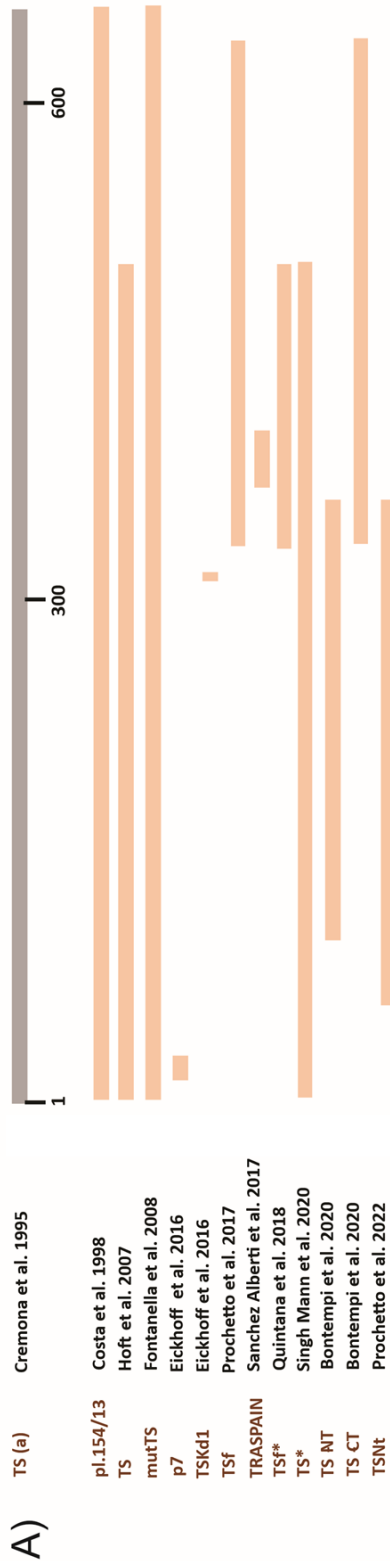
Las consultas en las bases de datos permitieron determinar las diferencias que existían entre las 23 vacunas experimentales que utilizan TS-GI. En algunos de estos estudios se utilizó la misma secuencia, pero en diferentes plataformas. Los datos de las vacunas que emplean TS-GI se recopilan en la Tabla 2.

**Tabla 2: Vacunas experimentales que utilizan TS-GI**

Grupo	Nombre	Plataforma	GenBank	Referencia
TS-GI	TS	Plásmido 154/13 - ADN TS (péptido señal + sitio catalítico)	D50685.1	Costa et al., 1998
	TS	pcDNA3-TS (proteína entera), p154/13 (péptido señal + sitio catalítico), pD154/13 (péptido señal + parte del sitio catalítico)	D50685.1	Fujimura et al., 2001
	TS	p154/13, pcDNA3-TS o S fragmento recombinante de la TS	D50685.1	Vasconcelos et., al 2003
	TS iTS	pcDNA3-TS, p154/13 o p-target-iTS	D50685. L38456.1	Hoft et al., 2007
	Wt-TS OCH1-TS Mut-TS	Wt (TS activa), OCH1 (TS hiperglicosilada y activa), o Mut-TS (mutante inactiva)	L26499.1	Fontanella et al., 2008
	rTS	rTS	D50685.1	Giddings et al., 2010
	TS	pcDNA3-TS+pIL-15, pcDNA+pTS o pIL-15+pTS	D50685.1	Eickhoff et al ., 2011
	mTS	mTS (péptido señal + sitio catalítico)	CAC34453.1	Bontempi et al., 2015
	p7+TSKd1	dendríticas pulsadas con peptides p7 y TSKd1	D50685.1	Eickhoff et al., 2016
	TS	FRA, Tc3, Tc6, CPX, TXN, TS, and CZ	CAC34453.1	Bontempi et a., l 2017
	TScf	fragmento de la TS	AJ276679.1	Prochetto et al., 2017
	TS	fragmento de la TS	PBJ79959.1	Quintana et al., 2018
	NT-TS CT-TS	fragmento de laTS +CZ+ pUS2000 or pUS977	AJ276679.1	Bontempi et al., 2020
TS Nt	fragmento de la TS	MZ215730.1	Prochetto et al., 2022	

	TScf	fragmento de la TS	PBJ79959.1	Pacini et al., 2022
<b>TS-GI + otros antígenos</b>	TS / ASP-2	p154/13 / plgSPclone9	D50685.1 AY186572.1	Vasconcelos et., al 2004
	TS / ASP-2	rAdTS /rAdASP2	D50685.1 AY186572.1	Machado et al., 2006
	TS / ASP-2	p154/13 / plgSPclone9	D50685.1 AY186572.1	Haolla et al., 2009
	TS / ASP-2	rAdVax: rAdASP2+rAdTS	D50685.1 AY186572.1	Pereira et al., 2015
	Traspaina	Traspaina	AF265226.1 XP_816523.1 AY186572.1	Sanchez Alberti., et al 2017
	Traspaina	pcDNA3.1/Traspaina	AF265226.1 XP_816523.1 AY186572.1	Sanchez Alberti., et al 2020
	TS / ASP-2	ASP-2, furin 2A, TS/ ChAdOx1 /MVA	U77951 L38457	Mann et al., 2020
	TSA-1 / Tc24 / ASP-2 / Tc- 52	pcDNA3.1 (TSA-1 + Tc24); plgSPclone9 + p154/13 (ASP-2-like clone 9 SPclone9 + TS); Tc52 cDNA	M58466 U70035 AY186572 D50685	Sanchez- Burgos et al., 2007

A continuación, todas las secuencias incluida la de Cremona et al (Cremona et al., 1995) se compararon entre sí y se realizaron alineamientos múltiples para evaluar el porcentaje de identidad y la cobertura. Como se muestra en la Fig. 43A-B, en los 23 estudios se probaron 12 segmentos diferentes de TS-GI. La cobertura de los fragmentos varió sustancialmente (0%-100%), si bien comparten una alta identidad con la secuencia de Cremona et al (Cremona et al., 1995), que varía desde el 85,9% al 100%, excepto para el péptido p7, que mostró sólo una identidad del 16,7% (Eickhoff et al., 2016). La identidad entre otras secuencias también difirió considerablemente (Figura 43B). En



**B)**

References	Identidad (%)												
	TS (a)	pl.154/13	TS	mutTS	TSKd1	p7	TScf	TRASPAIN	TSf	TS	TS-NT	TS-CT	TSNt
TS (a)	98.2	97.5	98.2	93.9	100	16.7	85.9	100	91.8	98.2	88.7	85.9	89.4
pl.154/13	99		98	93.5	100	16.7	86.6	100	92.4	98	88.7	86.6	89.8
TS	77	73		93.8	100	16.7	86.6	100	91.2	100	89.1	86.6	90.1
mutTS	100	94	100		100	16.7	84.9	96	100	93.8	86.7	84.8	88
TSKd1	100	100	100	100		0	0	0	100	100	66.7	0	66.7
p7	100	100	100	100	0		0	0	0	16.7	22.2	0	22.2
TScf	45	42	32	45	0	0		88	88	86.6	90.9	100	90.9
TRASPAIN	3	3	5	3	0	0	8		96	100	0	88	0
TSf	26	25	34	26	100	0	54	100		91.2	82.6	88	82.6
TS	77	73	100	77	100	100	56	100	100		89.1	86.6	90.1
TS-NT	38	36	49	38	100	0	3	0	13	49		90.9	100
TS-CT	45	42	32	45	0	0	99	100	92	32	4		90.9
TSNt	44	41	56	44	100	0	3	0	13	56	100	3	
<b>Cobertura (%)</b>													

**Figura 43. Cobertura e identidad entre las secuencias TS-GI utilizadas en vacunas experimentales. A) Porcentaje de cobertura de las secuencias de TS-GI evaluadas en vacunas. Secuencia de referencia: GENBANK N° AAA99442.1. B) Porcentaje de identidad entre las diferentes secuencias TS-GI utilizadas en vacunas. En casos donde la misma secuencia se evaluó en varios estudios, solo se menciona el primer estudio publicado.**

otras palabras, la antigenicidad de las vacunas basadas en TS-GI no es comparable debido a su bajo porcentaje de cobertura de secuencia.

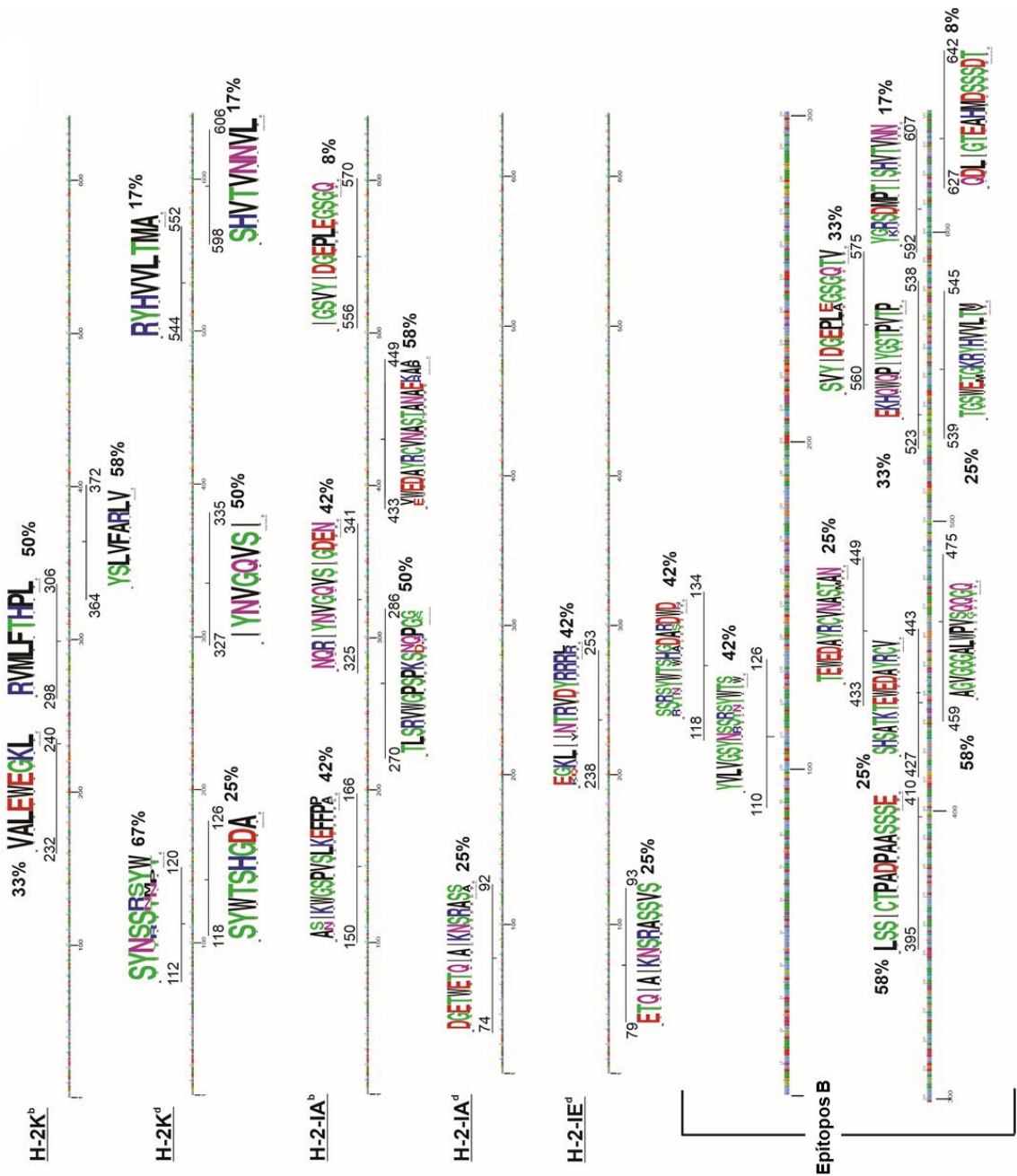
De la misma manera que se realizó previamente para las secuencias indexadas de TS-GI, también se analizó la influencia de la diversidad de secuencias utilizadas en las vacunas sobre la antigenicidad. En este caso, el análisis se realizó independientemente del acervo genético murino en el que se probaron originalmente.

Tal como se describe en la Fig. 44, se detectaron 3 epítomos T fuertes en el haplotipo murino H-2K<sup>b</sup>: El epítomo VYSLFARL es el más representado en las vacunas (58%), mientras que los 2 restantes estuvieron moderados presentes en las formulaciones vacunales (50% y 33%, respectivamente). Asimismo, las predicciones indicaron 5 epítomos T fuertes en el haplotipo murino H-2K<sup>d</sup>. El epítomo SINSSRSYW fue el más distintivo (67%), mientras que las demás tuvieron una representación diversa entre las vacunas (17%-50%). Los datos asimismo confirman que el epítomo IYNVGQVSI (también llamado TSKd14/ TSKd1 por otros autores) es un epítomo fuerte (Eickhoff et al., 2016; Rosenberg et al., 2010). Esta secuencia ha demostrado ser altamente inmunogénica e inductora de IFN- $\gamma$  pero estuvo moderadamente representada (50%) en vacunas experimentales (Fig. 44).

Aunque los epítomos MHC-II en las TS están menos descritos en la bibliografía, se los evaluó igualmente debido a su papel como promotores de respuestas celulares y humorales que involucran la activación de los linfocitos T CD4 (Limon-Flores et al., 2010). Las predicciones mostraron que están moderada o pobremente representados en las secuencias de las vacunas experimentales, a excepción de uno para H-2IA<sup>b</sup> (58%). Además, algunos aminoácidos de esta familia mostraron variabilidad (Fig. 44).

Por último, también se detectaron 10 epítomos lineales B fuertes de diversas longitudes, la mayoría de ellos en la región C-terminal (Fig. 44). Aún así, solo 3 de ellos están

medianamente representados en las formulaciones vacunales (58% y 42% respectivamente).



**Figura 44. Predicción de epítomos fuertes en las secuencias de TS-GI utilizadas en vacunas.** En este análisis se consideraron epítomos con una fuerte afinidad por H-2K<sup>b</sup> y H-2K<sup>d</sup> (MHC-I) y H-2-IA<sup>b</sup>, H-2-IA<sup>d</sup> y H-2-IE<sup>d</sup> (MHC-II) murinos. La familia de epítomos de células T se definió cuando los epítomos fuertes predichos de diferentes secuencias de TS-GI utilizados en vacunas se superponen parcialmente en la misma región de la proteína, cubriendo longitudes de hasta 11 mers de péptido para MHC-I y 20 mers de péptido para MHC-II. También se consideraron epítomos lineales de células B.

### 6.4.3 Cobertura de las secuencias de TS-GI

Al comparar los epítomos fuertes T que se encontraron entre las secuencias indexadas con los presentes en las vacunas, se observó que la mayoría de las familias de epítomos conservados y restringidos por H-2 están presentes en diferentes los diferentes linajes de *T. cruzi* y también están disponibles en las vacunas. Resultados similares se hallaron para los para los epítomos B.

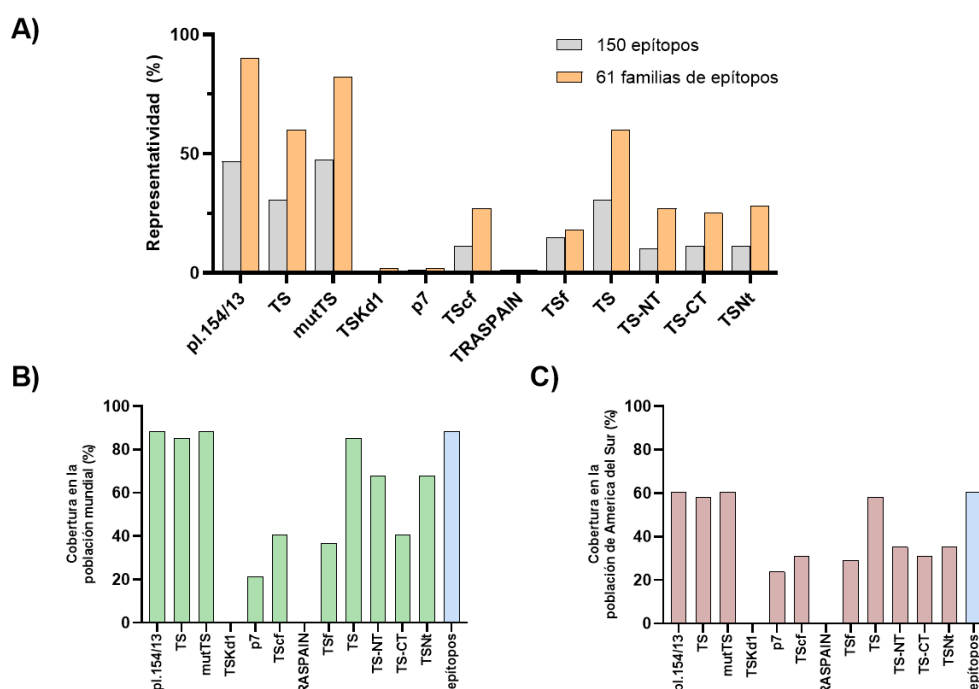
Entonces, una pregunta que surgió de esta observación fue si los epítomos presentes en las vacunas experimentales son suficientes para proteger contra diferentes cepas de parásitos y a su vez otorgar protección a la población humana.

Los supertipos del HLA son un conjunto de alelos que comparten residuos específicos en las posiciones de anclaje de los péptidos, y por lo tanto, se considera que todos los alelos HLA que están agrupados dentro de un supertipo, reconocerán péptidos similares. Su uso es cada vez más frecuente para evaluar vacunas basadas en péptidos, ya que disminuye la complejidad del análisis que representa el elevado grado de polimorfismo del HLA humano (Wang and Claesson, 2021). En base a lo anterior, se llevó a cabo una predicción del potencial número de epítomos T fuertes restringidos por los supertipos HLA-I en las 49 secuencias indexadas. Los resultados de las predicciones arrojaron 150 epítomos T fuertes restringidos por distintos supertipos de HLA-I y 61 familias de epítomos (Tabla 3). Sin embargo, de estos 150 epítomos T, menos de la mitad están representados en las vacunas, con frecuencias que varían entre 0,7%-47,3%. No obstante, si se considera la frecuencia de las familias de epítomos T fuertes presentes en las vacunas, la representatividad de los mismos asciende al 90% (Fig. 45A).

Los análisis de cobertura poblacional se utilizan para predecir la fracción de individuos que responderán a un determinado conjunto de epítomos según las frecuencias genotípicas de HLA. En función de esto, y utilizando los 150 epítomos T fuertes listados en la Tabla 3, se predijo tanto la cobertura de la población mundial como la de América del Sur (por ser la ECh endémica en la región), las que alcanzaron valores del 88,4% y el 60,5% respectivamente (Fig. 45B-C). Como era de esperar, las frecuencias más altas se observaron cuando las vacunas presentaban secuencias completas o casi completas

de las TS-GI, las frecuencias medias cuando los fragmentos utilizados eran longitud intermedia y las frecuencias más bajas (0-2%) cuando sólo estaban presentes pocos o un sólo epítipo.

Por otra parte, si el mismo análisis se realiza con la totalidad de las secuencias indexadas, la cobertura poblacional no muestra un cambio notable (Fig. 45B-C). Esto sugiere que la adición de nuevos epítomos T derivados de las secuencias indexadas a las vacunas no aumentaría significativamente la cobertura de la población, al menos en lo que concierne a los HLA-I.



**Figura 45. Frecuencia de epítomos T fuertes restringidos por supertipos HLA-I y cobertura poblacional.** **A)** Frecuencia de epítomos T fuertes (en gris) o sus familias (en naranja) restringidos por los supertipo HLA-I, presentes en secuencias las vacunas probadas experimentalmente, considerando como 100 % los 150 epítomos T fuertes hallados en las secuencias indexadas o sus 61 familias. **B)** Fracción de individuos de la población mundial que responderían a los epítomos T fuertes presentes en las vacunas y a los 150 epítomos T fuertes predichos en las secuencias indexadas de TS-GI **C)** Fracción de individuos de la población de América del Sur que responderán a los epítomos T fuertes presentes en las vacunas y a los 150 epítomos T fuertes predichos en las secuencias indexadas de TS-GI.

**Tabla 3: Epítomos T fuertes y familias de epítomos T fuertes en las secuencias TS-GI indexadas.** Epítomos T fuertes (n=150) presentes en las 49 secuencias TS-GI indexadas, agrupados en familias (n=61). Se indica la posición del primer aminoácido del epítomo/familia de epítomos en la secuencia de referencia de Cremona (Cremona et al., 1995)

Posición	Supertipos HLA-I											
	HLA-A*				HLA-B*				HLA-C*			
	01:01	02:01	03:01	24:02	26:01	07:02	08:01	15:01	27:05	39:01	40:01	58:01
358					NTKEVYSLV NTNEVYSLV							
362 372				VYSLVFARL							GELMIKSV	
373						ELMIKSVL ELRIKSVL						
376												IISKVLQSW
405											SERGCGPAV SESGCGPAV	
410						GPAVTTVGL				GPAVTTVGL		
414					TTVGLVGL TTVGLAGFL							
423												SGNASQNVW
427								SQNVWEDAY				
435									YRCVNASTA			
454						FAGVGGGAL						
456												AGVGGGALW
472									QRYRFANHA QRYRFANRA			
473					RYRFANHAF RYHFANHAF RYRFANYAF							
475					RFANHAFTL HFANHAFTL RFANRAFTL RFANHAFTV RFANYAFTL							
479									HAFTLVASV YAFTLVASV			
481												FTLVASVTI FTVVASVTI
492						APSVASPLL APRAASPLL VPSVASPLL VPRDASPLL APRDATPLL				APSVASPLL		
515												LSYDEKHQW LSYDKKHQW LSYDKKNQW
524						QPIYGSTPV QPIYGSKPV				QPIYGSTPV		
526					IYGSTPVT IYGSKPVT							
530						TPVTPTGSW KPVTPGSW						
540							TGKRYHVVL TGKRYHVVL MGKRYHVVL TGKRYHLVL					
544									YHVLTMAN YHVLTVAN			
545					HLVLTMANK HVVLTMANK HVVLTVANK HVVLTMSNK							
549							TMANKIGSV TMANRNGSV					
550					MANKIGSVY MSNKIGSVY MANKMGSVY			MANKIGSVY MANRNGSVY				MANKIGSVY MANRNGSVY MSNKIGSVY MANKMGSVY
576	RTPDISHFY GTPDISHFY					RTPDISHFY GTPDISHFY						
580	ISHFYVGGY ISHFYVGGY					ISHFYVGGY ISHFYVGGY						
597									SHVTVNNVL SHVTVTNVL HVTVTNVL			
599	VTVNNVLLY VTVTNVL					VTVNNVLLY VTVTNVL						VTVNNVLLY VTVTNVL
613												AEEIKTLFL AEEIKTLFL TEEIKTLFL
620		FLSQDLIGT										
624					DUGTEAHM							

**Tabla 3: (Continuación): Epítotos T fuertes y familias de epítotos T fuertes en las secuencias TS-GI indexadas.**

Posición	Supertipos HLA-I											
	HLA-A*					HLA-B*						
	01:01	02:01	03:01	24:02	26:01	07:02	08:01	15:01	27:05	39:01	40:01	58:01
1						APGSSRVEL APESSRVEL						
3			GSSRVELFK									
8			ELFKRQSSK									
25	VTDRVVHSF VRQRVVHSF											VTDRVVHSF VTERVVHSF
30									VHSFRLPAL			
33									FRLPALVNV FRFPALVNV FRLPTLVNV			
37								ALNVVDGVM				
40									NVDGVMVAI			
45	MVAIADARY				MVAIADARY							
53									YETSNDNSL YETSSENSL	YETSNDNSL YETSSENSL		
54					ETSNDNSLI ETSSENSLI SLIDTVAKY SLIDTVVKY			SLIDTVAKY SLIDTVVKY				
60												
68												YSVDDGETW NSSKSYWTW
91									SRVVDPTVI SRVVVPTVI			
104			KLYVLVGSY KIYVLVGSY					KLYVLVGSY KIYVLVGSY GSYNSRSRY GSYNSSTIY GSYSSRSY				
110												
150									IKWGSPVSL			
156							VSLKFFPPA SLKFFPPAE					
172									NQFLGGAGV			
174		FLGGAGVAI							FLGGAGVAI			
183	VASNGNLVY							VASNGNLVY				VASNGNLVY
198									KRKQVFSKI			
200								KQVFSKIFY KQIFSIFY KQVFSNIFY				
225									FGCSEPVAL FDCSEPVAL			
227												CSEPALEW
233											LEWEGKLII	
240			IINTRVDRK IINTRVDWK									
254												ESSDMGNTW ESSDMGNSW
255	SSDMGNTWV SSDMGNSWV											
261				TWVEAVGTL TWVEAIGTL SWLEAVGTL								
264					EAVGTLSRV EAIGTLSRV							
285												OSSFVAVTI
288					FTAVTIEGM VTIEGMRVM							
297		RVMLFTHPL RVMLFTNPL				RVMLFTHPL RVMLFTNPL	RVMLFTHPL RVMLFTNPL			RVMLFTHPL		RVMLFTHPL
299							MLFTHPLNF MLFTHPLNF	MLFTHPLNF MLFTHPLNF				
310				RWLRDRLNL LWLTDNQRI								
318												
326				IYNVGQVSI IYNVGQISI IYNVGQLSI								
333					SIGDENSAY							
337									ENSAYSSVL			
338	NSAYSSVLY NAAYSSVLY				NSAYSSVLY NAAYSSVLY							
339			SAYSSVLYK									
346									YKDDKLYCL			
355								HEINTNEVY HEINXNEVY			HEINTNEVY HEINSNEVY HEINXNEVY HEINTDEVY	

#### 6.4.4 Identificación de epítomos T compartidos entre HLA-I y H-2K

Teniendo en cuenta que las vacunas deben probarse inicialmente en modelos animales, los antígenos utilizados en las formulaciones deben ser no sólo inmunogénicos en las

especies animales utilizadas y sino también deberían serlo en seres humanos. El ratón (*Mus musculus*) suele ser el modelo más utilizado en las primeras etapas de la evaluación preclínica, lo cual implica que el diseño racional de una vacuna debería tener en cuenta los epítomos compartidos entre ratones y humanos.

Por este motivo, luego se realizó un análisis bioinformático a fin de predecir que epítomos T fuertes presentes en las secuencias indexadas se comparten entre ratones y humanos. En la Fig. 46A se muestra una lista de estos epítomos/familia de epítomos que podrían ser reconocidos tanto por humanos como por ratones. Nuevamente, estas predicciones se realizaron considerando únicamente los supertipos de HLA-I humanos, mientras que para los MHC murinos se consideraron únicamente los haplotipos murinos H-2<sup>d</sup> y H-2<sup>b</sup>, por ser principales acervos genéticos utilizados en los ensayos preclínicos de vacunas.

En particular, como se muestra en la Fig. 46A, 8 epítomos podrían ser reconocidos de forma cruzada entre MHC humanos y murinos. Varios de los HLA-I son incluso muy prevalentes en la población de América del Sur, como HLA-A\*24:02, HLA-A\*02:01 o HLA-A\*01:01. Estos resultados indican que tanto BALB/c como C57BL/6 (y las demás cepas relacionadas) son de utilidad para evaluar las vacunas basadas en TS-GI destinadas a su uso en la población endémica.

Paralelamente, se realizó un análisis similar, pero teniendo en cuenta sólo los fragmentos TS-GI utilizados en vacunas (Fig. 46B). Para este análisis, se seleccionaron los epítomos T fuertes más representados en las vacunas (representación >50%) y, posteriormente, se evaluó si estos epítomos podían ser reconocidos por los supertipos HLA-I. Curiosamente, las predicciones mostraron que 7 de los epítomos T fuertes más representados en las vacunas, son reconocidos de forma cruzada por los supertipos HLA-I y por H-2K<sup>b</sup> o H-2K<sup>d</sup>.

Llamativamente, entre estos epítomos que pueden ser reconocidos en forma cruzada, hay algunos cuya inmunogenicidad ya ha sido confirmada experimentalmente en ratones o en humanos (sombreados en gris en la Fig. 46). Estos son los epítomos H-

2K<sup>d</sup> IYNVGQVSI (TSKd14/TSKd1), y el H-2K<sup>b</sup> VYSLVFARL, ambos reconocidos de forma cruzada por HLA-A\*24:02.

Epítomos presentes en las secuencias indexadas			Epítomos presentes en las vacunas		
H-2	EPÍTOPO	Supertipo HLA-I	H-2	EPÍTOPO	Supertipo HLA-I
H-2K <sup>d</sup>		HLA-A*24:02	H-2K <sup>d</sup>		HLA-A*24:02
H-2K <sup>d</sup>		HLA-A*01:01 HLA-A*26:01 HLA-B*39:01 HLA-B*58:01	H-2K <sup>d</sup>		HLA-A*01:01 HLA-A*26:01 HLA-B*39:01 HLA-B*58:01
H-2K <sup>d</sup>		HLA-B*15:01	H-2K <sup>d</sup>		HLA-B*15:01
H-2K <sup>d</sup>		HLA-B*27:05 HLA-B*39:01	H-2K <sup>d</sup>		HLA-B*27:05 HLA-B*39:01
H-2K <sup>b</sup>		HLA-A*24:02	H-2K <sup>b</sup>		HLA-A*24:02
H-2K <sup>b</sup>		HLA-A*02:01 HLA-B*07:02 HLA-B*08:01 HLA-B*15:01 HLA-B*39:01	H-2K <sup>b</sup>		HLA-A*02:01 HLA-B*07:02 HLA-B*08:01 HLA-B*15:01 HLA-B*39:01
H-2K <sup>b</sup>		HLA-B*40:01	H-2K <sup>b</sup>		HLA-B*40:01
H-2K <sup>b</sup>		HLA-B*08:01			

**Figura 46. Epítomos MHC-I que podrían ser reconocidos simultáneamente por algunos alelos H-2K y supertipos HLA-I. A) Epítomos o familias de epítomos T fuertes predichos en las 49 secuencias indexadas de TS-GI que podrían ser reconocidos simultáneamente por alelos H-2K y supertipos HLA-I. B) Epítomos o familias de epítomos T fuertes representados en al menos el 50% de las vacunas y que podrían ser reconocidos simultáneamente por alelos H-2K y supertipos HLA-I. En la columna central se muestra el Logo Plot de la familia de epítomos. En la primera columna se indica el alelo murino H-2K, mientras que en la tercera columna se indica el supertipo HLA-I. Las cuadrículas sombreadas indican epítomos cuya inmunogenicidad ha sido previamente reportada en ratones y/o humanos.**

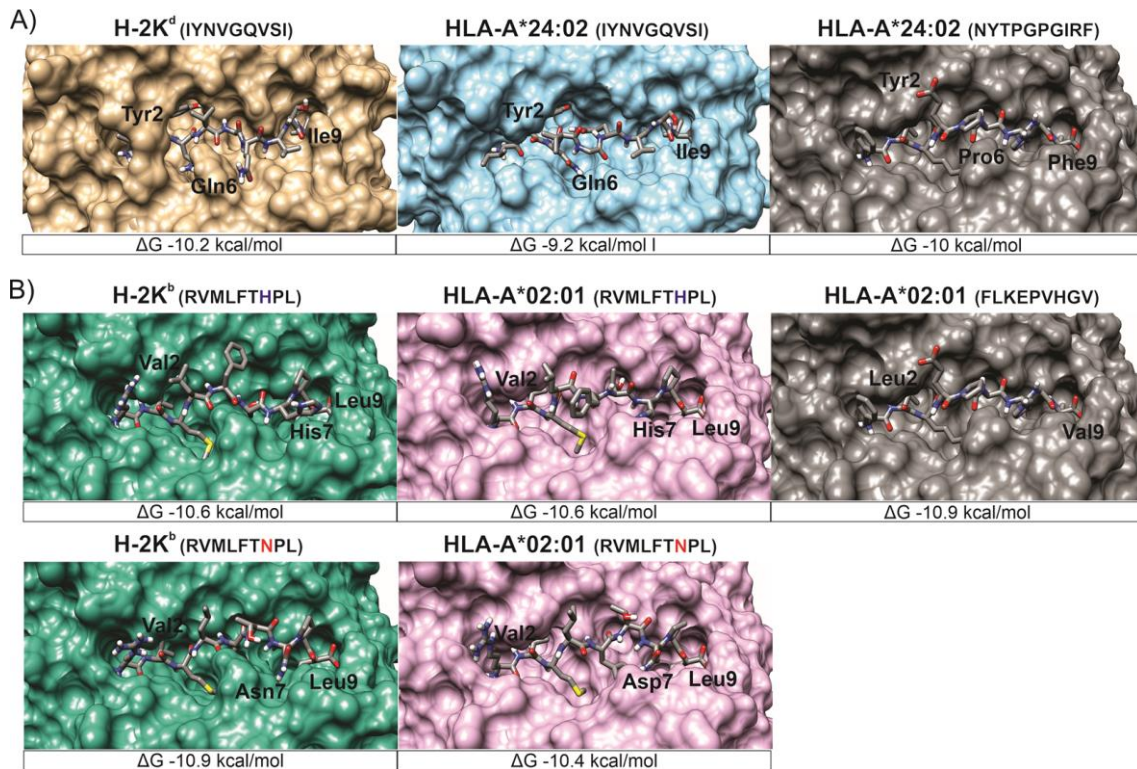
El epítopo IYNVGQVSI (TSKd14/TSKd1) sólo ha sido probado experimentalmente en modelo murino (Eickhoff et al., 2011, 2016; Freire-de-Lima et al., 2010; Rodrigues et al., 1999; Tzelepis et al., 2008). Por otra parte, ratones transgénicos que expresan un HLA humano, al ser expuestos al epítopo VYSLVFARL secretan IFN- $\gamma$  (Eickhoff et al., 2015). Curiosamente, el haplotipo HLA\*02:01, que es muy frecuente en América del Sur, está representado tanto en las secuencias indexadas como en las vacunas y uniría al epítopo

RVMLFT(H:N)PL. Sin embargo, este epítipo y el resto que se muestran en la Fig. 46 aún no se han probado experimentalmente.

Por último y para reforzar aún más las predicciones anteriores, se analizó mediante acoplamiento molecular el reconocimiento cruzado de 2 de estos epítipos. El primero, IYNVGQVSI, se seleccionó porque, a pesar de que las predicciones indicaban que era un epítipo compartido y ser inmunogénico en ratones, no estaba probado en seres humanos (Fig. 46A). El segundo, RVMLFT(H:N)PL fue seleccionado por estar restringido por un supertipo predominante en América del Sur (HLA\*02:01).

El análisis de acoplamiento molecular permite, además, determinar en qué medida las variaciones de aminoácidos en la familia de epítipos modificarían la unión al MHC. El péptido NYTPGPGIRF HIV-RT, se utilizó como control ya que es conocido por su fuerte unión a HLA-A\*02:01. El mismo presentó una fuerza de unión de -10,0 kcal/mol. A su vez, las predicciones indicaron que la fuerza de unión para el complejo IYNVGQVSI:H-2K<sup>d</sup> fue -10,2 kcal/mol y para el complejo IYNVGQVSI:HLA\*24:02 fue de -9,2 kcal/mol (Fig. 47A). En otras palabras, dado que las predicciones indican que la afinidad de unión es similar estos epítipos, puede inferirse que tanto el HLA\*24:02 humano como el H-2K<sup>d</sup> murino tienen una fuerte capacidad de unión al epítipo IYNVGQVSI.

La Fig. 47B muestra que la fuerza de unión del RVMLFT(H:N)PL al HLA-A\*02:01 humano es idéntica a la del H-2K<sup>b</sup> murino. Además, la variación de un aminoácido no parece alterar la fuerza de unión al MHC-I en ambas especies, ya que los valores de fuerza de unión son similares entre sí y similares al valor obtenido con el epítipo FLKEPVHGV HIV-1 utilizado como control.



**Figura 47. Modelado molecular de epítomos T con alelos HLA-I y H-2K.**

Vista superior del complejo péptido:MHC, mostrando la superficie del HLA-I humano o H-2K murino y el péptido unido. La energía de unión o de enlace se informa como  $\Delta G$  (kcal/mol). **A)** Patrón de unión del epítomo IYNVGQVSI a H-2K<sup>d</sup> (en beige) y al haplotipo HLA\*02:01 (en celeste). El péptido HIV-RT se utilizó como control de unión a HLA-A\*02:01 (en gris). **B)** Patrón de unión de la familia de epítomos RVMLFT(H:N)PL con el alelo H-2K<sup>b</sup> (en turquesa) y el alelo HLA-A\*02:01 (en rosa). La variación en un aminoácido se indica en rojo. El epítomo FLKEPVHGV HIV-1 se utilizó como control para la familia de epítomos (en gris).

### 6.4.5 Diseño racional de una nueva formulación

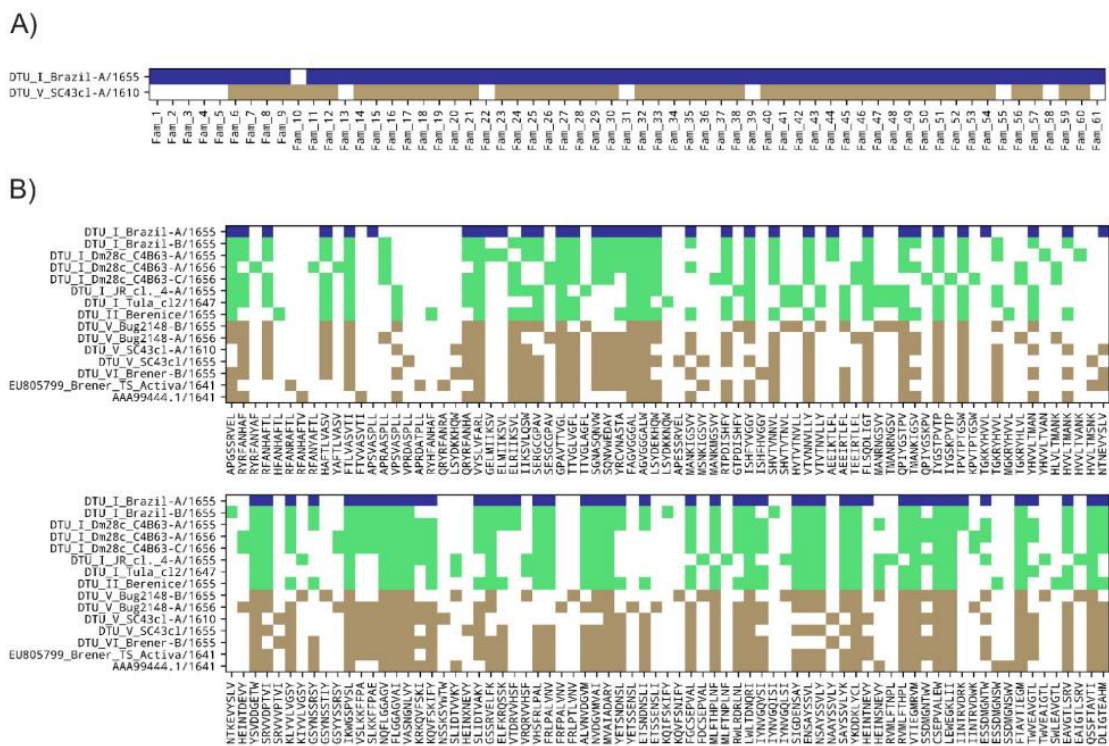
Hasta aquí podemos concluir que:

- Las 49 secuencias indexadas de TS-GI, en donde están representadas todas las DTU que causan la ECh humana presentan un elevado grado de identidad.
- Existe un elevado grado de conservación de los epítomos T y B entre los diferentes linajes de parásitos.
- La variación de aminoácidos en algunos epítomos T fuertes de la TS-GI no modificaría la fuerza de unión a MHC específicos compartidos por humanos y ratones.

En función de esto, se proponen diferentes enfoques para el desarrollo futuro de una formulación racional.

Como primer enfoque, se propone el uso de secuencias TS-GI que incluyan representantes de cada familia de epítomos T fuertes.

Si sólo se usará la secuencia DTU\_I\_Brazil-A/1655, es decir la más completa en términos de epítomos T fuertes, la formulación final incorporaría un total de 81 epítomos y se cubrirían 60 de las 61 familias (secuencia en azul, Fig. 48A). El total de las familias de epítomos se lograría incluyendo sólo dos secuencias (DTU\_I\_Brazil-A/1655 y DTI\_V\_SC43cl-A/1610) (Fig. 48A).



**Figura 48: Posibles combinaciones de secuencias indexadas de TS-GI para incrementar la antigenicidad de las vacunas. A)** Las secuencias DTU\_I\_Brazil-A/1655 (en celeste) y DTU\_V\_SC43cl-A/1610 (en beige) incluyen todos los epítomos T fuertes restringidos por supertipos HLA-I representativos de cada familia. Sólo la secuencia DTU\_I\_Brazil-A/1655 (en celeste), se cubren 87 epítomos T fuertes y 60 de 61 familias de epítomos. **B)** La combinación de un mínimo de 15 proteínas indexadas en una formulación de vacuna cubre los 150 epítomos T fuertes predichos en las secuencias indexadas. El uso de 8 secuencias (en azul y verde), incorporaría un total de 123 epítomos T fuertes.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, aunque las variaciones de aminoácidos en los epítomos no alterarían la fuerza de unión al MHC-I, pueden modificar el reconocimiento del receptor de células T. Por lo tanto, un enfoque adicional sería incorporar todos los epítomos T fuertes documentados en las 49 secuencias indexadas.

Y esto se lograría con la incorporación de un mínimo de 15 de estas proteínas TS-GI a la formulación vacunal (Fig. 48B). Además, usando sólo 8 secuencias, se pueden incorporar un total de 128 epítomos T (secuencias en azul y verde, Fig. 48B).

## 6.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo evaluamos si las vacunas formuladas con fragmentos de las proteínas TS-GI podrían potencialmente proteger contra diferentes linajes o DTUs de *T. cruzi*. La variabilidad entre las secuencias fue muy baja, a pesar de la diversidad genética de los distintos linajes o DTUs de *T. cruzi*.

Muchos representantes de la superfamilia de la TS están involucrados en los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria (Bivona et al., 2020; Tarleton, 2015). Sin embargo, estos estudios se refieren globalmente a la superfamilia de la TS y no particularmente al grupo de las TS-GI, si bien se conoce que la región SAPA genera anticuerpos no protectores (Leguizamón et al., 1994).

Se ha reportado que las TS-GI están codificadas por un número variable de genes, que van desde unas pocas a varias decenas de copias, dependiendo de la cepa (Burgos et al., 2013). Si bien no se dispone de estudios sistemáticos sobre la variabilidad de los genes de las TS-GI entre todos los linajes de *T. cruzi*, se ha reportado que existe una variabilidad prácticamente inexistente entre las cepas RA y Tul2 de *T. cruzi* (Cremona et al., 1995; Pollevick et al., 1993). Recientemente, se compararon los genomas de dos cepas de *T. cruzi* (mediante secuenciación de última generación y ensamblaje). Los resultados indicaron que los genes que codifican para las TS-GI de las cepas Brasil (DTU I) e Y (DTU II) tenían un porcentaje de identidad cercano al 90% (Wang et al., 2021). Otro estudio, realizado sobre el genoma de CL, se localizaron 16 genes que codificaban para TS-GI, con un elevado grado de identidad entre ellos (86,9%-100%)

(Freitas et al., 2011). En el presente estudio, se amplió el número de secuencias analizadas y se confirmó que la identidad entre ellas es de alrededor del 92%. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las proteínas TS-GI están muy conservadas, es posible pensar que sería posible utilizar una sola secuencia como inmunógeno vacunal. Asimismo, verificamos que las familias de epítomos T y B fuertes se conservan en las diferentes secuencias indexadas. Globalmente, estos hallazgos denotan el gran potencial que tendrían estas secuencias para proteger contra diferentes linajes o DTUs de *T. cruzi* y estimulan futuros estudios a nivel preclínico para confirmar la eficacia contra distintos DTUs que tendría una vacuna formulada con una sola secuencia representativa (por ejemplo, la DTU\_I\_Brazil-A/1655).

En otra serie de análisis mostramos que las TS-GI utilizadas en vacunas hasta octubre de 2022, presentaban variaciones considerables en términos de cobertura, pero no de identidad. De hecho, en la secuencia completa utilizada como referencia (Cremona et al., 1995), hay epítomos T y B que se conservan en los fragmentos utilizados en las vacunas, pero que sin embargo están poco representados debido a la diversidad de cobertura que presentan estas secuencias y no permiten identificar cuál de los inmunógenos utilizados sería el más favorable para su uso en vacunas humanas.

Aunque se determinó que las familias de epítomos T están conservados, la predicción de los epítomos T en H-2K<sup>b</sup> y H-3K<sup>d</sup> no es coincidente, lo que dificulta aún más la comparación de la eficacia vacunal entre los antígenos TS-GI, y deja en evidencia que el hallazgo de epítomos fuertes depende del haplotipo murino en el que se haya analizado. De hecho, se encontró un mayor número de epítomos T fuertes en el haplotipo H-2K<sup>d</sup> (BALB/c) que en el haplotipo H-2K<sup>b</sup> (C57BL/6). Las consecuencias funcionales de estas diferencias aún no se comprenden bien. Sin embargo, los estudios disponibles en ambos haplotipos sugieren que distintos mecanismos funcionales, como por ejemplo como la respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos podrían verse muy afectados por el acervo genético en los animales inmunizados con TS-GI (Bontempi et al., 2015; Fontanella et al., 2008)

La secuencia inmunodominante IYNVGQVS (H-2K<sup>d</sup>) aparece entre los epítomos T fuertes detectados. Se ha reportado que usando sólo este epítomo, se puede inducir una inmunidad potencialmente protectora contra *T. cruzi* en ratones BALB/c (Eickhoff et al., 2016), y de hecho la respuesta contra este fragmento en el haplotipo H-2K<sup>d</sup> se lo utiliza como un correlato de respuesta específica de células T CD8<sup>+</sup> tras la vacunación (Eickhoff et al., 2016; Hoft et al., 2007). También se ha demostrado que el agotamiento de las células T CD8<sup>+</sup> TSKd14-específicas no tiene mayores consecuencias en términos de protección, ya que puede compensarse con linfocitos T dirigidos hacia otros epítomos subdominantes (Rosenberg et al., 2010). Y si bien este epítomo no parece ser importante en el haplotipo H-2K<sup>b</sup>, muestra una elevada fuerza de unión al supertipo HLA-A\*24:02, lo que respalda su potencial uso en el diseño de vacunas humanas. Sin embargo, sorprendentemente, ningún estudio ha demostrado aún su inmunogenicidad en humanos. Con respecto a los epítomos de células B, las predicciones indican que muchos de ellos están muy conservados. Cabe recordar que ninguno de los péptidos TS-GI utilizados en las formulaciones vacunales reportadas en la Tabla 3 incluye la región SAPA; lo cual evita la acción distractora este epítomo de células B inmunodominante (Leguizamón et al., 1994).

Dado que, por simplicidad, las predicciones que arrojaron 150 epítomos T fuertes entre las secuencias indexadas, se realizaron sólo considerando los supertipos HLA-I es posible que el número real sea aún mayor. A partir de estos 150 epítomos fuertes se definieron 61 familias, cuya representación en las vacunas que utilizan fragmentos completos de la TS-GI ronda el 90%. Estos estudios incluso indican que agregar a las vacunas epítomos T fuertes presentes en las secuencias indexadas no aumenta significativamente la cobertura en la población. Estos resultados están de acuerdo con la predicción de que los epítomos HLA-I presentes en las DTU, pero que carecen de secuencias vacunales, no aumentan la cobertura de la población mundial y sudamericana. En conjunto, estos resultados refuerzan el concepto de que el uso de secuencias que incluyan epítomos representativos de la mayoría de las familias,

garantizarían una alta protección vacunal. Sin embargo, hay que notar que cuando se analizó la cobertura en América del Sur tanto de las secuencias indexadas como de las vacunas, esta rondó el 60%. Esta situación podría superarse con el agregado a la formulación vacunal de otros antígenos de *T. cruzi*, que no pertenezcan a la familia de la TS-GI.

Las predicciones que evalúan de epítomos compartidos entre humanos y especies animales que se utilizan en las pruebas preclínicas son extremadamente relevantes, ya que permiten detectar elementos de confusión, como por ejemplo la especificidad del MHC. En este sentido, el análisis bioinformático puede ayudar a evitar importantes esfuerzos preclínicos. Este tipo de análisis mostró que algunos epítomos T fuertes presentes tanto en las 49 secuencias indexadas como en las vacunas, son compartidos tanto por los haplotipos murinos como por algunos supertipos HLA-I humanos. Y entre estos últimos hay algunos supertipos que son predominantes en América Latina, donde la ECh es endémica. Estos resultados sugieren que es probable que muchas vacunas preclínicas evaluadas hasta el momento puedan proteger a los humanos. Sin embargo, la falta de bases de datos suficientemente completas que indiquen que epítomos de *T. cruzi* han sido validados experimentalmente en humanos impone una seria limitación para el desarrollo de vacunas basadas en epítomos. A pesar de eso, el epítomo de células T CD8<sup>+</sup> VYSLVFARL restringido al supertipo HLA-A\*02 derivado de GI-TS se identificó previamente en individuos con enfermedad de Chagas (Wang et al., 2021), mientras que el IYNVGQVSI (TSKd14/TSKd1) se validó en BALB/c (Fontanella et al., 2008; Hoft et al., 2007; Vasconcelos et al., 2003). Sin embargo, los análisis de acoplamiento molecular del complejo IYNVGQVSI:HLA-A\*0201 indica que este podría ser inmunogénico en humanos. Por otra parte, se determinó que las variaciones de aminoácidos en una familia de epítomos compartidos no influenciarían la fuerza de unión al MHC-I. En conjunto, esto sugiere que algunos epítomos T fuertes testeados en modelos animales podrían representar una promesa razonable como parte de las formulaciones para posibles vacunas de uso humanos.

Como corolario de este estudio, se demostró que utilizando distintas secuencias indexadas se puede alcanzar una buena cobertura de epítomos o familias de epítomos. Estas formulaciones cubrirían diferentes epítomos T capaces de unirse con gran parte de los HLA-I presentes en la población, pero no garantizan el reconocimiento del complejo péptido:HLA por parte del receptor de células T (TCR). Son necesarios nuevos estudios futuros para determinar si las familias de epítomos aquí definidas serían reconocidas por un solo TCR o si bien habría cierto grado de promiscuidad (Bhattacharya et al., 2007; Ebrahimi et al., 2019). Asimismo, no debe olvidarse la contribución que tienen los epítomos B y la respuesta que generan. Dada la participación crítica que tienen las TS-GI nativas en la evasión de la respuesta del hospedero, anticuerpos desarrollados contra estos antígenos representativos permitirían incluso una protección cruzada contra diferentes linajes del parásito. Y aunque en este trabajo no se evaluó si algunos epítomos HLA-II también se hayan compartidos entre humanos y haplotipos murinos, el análisis de los epítomos de MHC-II de ratones que se muestran en las Fig. 42 y la Fig. 44 sugiere que una mezcla de secuencias también garantizaría una cobertura total de la población.

*Los principales resultados de este estudio indican que las secuencias de las proteínas TS-GI están muy conservadas. También evidencian que mediante el empleo de secuencias de proteínas completas se lograría una amplia protección en las poblaciones humanas. En conjunto, refuerzan la noción de que las TS-GI son candidatos vacunales prometedores.*

## 7. CONCLUSIÓN FINAL Y PERSPECTIVAS

Los estudios *in vivo* de inmunogenicidad y eficacia revelaron que distintos fragmentos de TS-GI formulados con di-AMP-c y administrados a ratones de forma intranasal, desencadenaron respuestas humorales y celulares específicas con un patrón mixto Th1/Th2/Th17, y a la vez, controlaron la parasitemia, y atenuaron la morbilidad y daño tisular agudo y crónico.

Por otra parte, los análisis *in silico* de antigenicidad permitieron predecir que debido a la alta homología entre secuencias que presentan las TS-GI reportadas, de usarse como candidato vacunal una proveniente de una especie en particular, es probable que genere una respuesta protectora adecuada contra cepas de otras especies. Asimismo, las predicciones indican que la cobertura de las vacunas que se han probado hasta el momento cubren a un porcentaje importante de la población. También revelan que ciertos epítomos T fuertes de la TS-GI son compartidos entre humanos y ratones, y que el potencial inmunogénico de tales epítomos podría utilizarse para mejorar y facilitar el desarrollo de nuevas vacunas basadas en TS-GI.

La integración de los estudios *in vivo* e *in silico*, permite concebir que, de las 3 formulaciones utilizadas para inmunizar en este estudio, quizás la más promisoría sería la TSdA, debido a su mayor cobertura antigénica. Lamentablemente, aún no se ha podido avanzar en los ensayos de eficacia, pero a juzgar por los resultados aquí reportados, es altamente probable que la utilización de la formulación TSdA+A sea la que otorgue un mayor nivel de protección en BALB/c. Resta aún evaluar la capacidad de TSdA+A de proteger contra otros linajes de *T. cruzi*, teniendo en cuenta incluso, que las proteínas recombinantes que la componen proceden de distintas cepas (fragmento N-terminal: cepa CL-Brener, DTU VI; y fragmento C-terminal: cepa Y, DTU II). Esta formulación podría ser incluso comparada con otra, también adyuvada con di-AMP-c, y que contuviera la secuencia DTU\_I\_Brazil-A/1655, ya que es la más completa en términos de epítomos o familias de epítomos T fuertes.

Por otra parte, como resultado de los estudios de antigenicidad y conservación de epítomos en el haplotipo H-2K<sup>b</sup> también fue evidente que la secuencia C-terminal posee un mayor número de epítomos B que la secuencia N-terminal. Es posible que estos epítomos B estén relacionados con el mejor balance IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub> detectado en las dos formulaciones que contienen el fragmento C-terminal.

Por último, y como perspectiva a corto plazo proponemos comprobar *in vitro* la antigenicidad de los epítomos compartidos entre los supertipos HLA-I y los haplotipos H-2K, mediante la estimulación de linfocitos murinos y humanos con dichos péptidos y posterior determinación de la producción de IFN- $\gamma$ .

Si bien aún se requieren más estudios para determinar cuál o cuáles secuencias son las más antigénicas e inmunogénicas *in vivo*, así como también si la vía de inmunización mucosal es la más adecuada para ofrecer un buen grado de protección contra este tipo de patógeno; en conjunto, los resultados de este trabajo refuerzan la noción de que las TS-GI son candidatos vacunales prometedores.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsohn, I.A., 1998. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 117–121.  
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x1998000100015>
- Abrahamsohn, I.A., Da Silva, A.P.G., Coffman, R.L., 2000. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68, 1975–1979. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.1975-1979.2000>
- Acevedo, G.R., Girard, M.C., Gómez, K.A., 2018. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Front. Immunol.* 9, 1929.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>
- Alberti, A.S., Bivona, A.E., Matos, M.N., Cerny, N., Schulze, K., Weißmann, S., Ebensen, T., González, G., Morales, C., Cardoso, A.C., Cazorla, S.I., Guzmán, C.A., Malchiodi, E.L., 2020. Mucosal Heterologous Prime/Boost Vaccination Induces Polyfunctional Systemic Immunity, Improving Protection Against *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in immunology*.  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00128>
- Alberti, L.A.G., Macedo, A.M., Chiari, E., Andrews, N.W., Andrade, L.O., 2010. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect.* 12, 784–789.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.015>
- Algoritmos\_d\_diag\_y\_trat\_IP\_VIH\_Sifilis\_VHB\_y\_Chagas\_en\_pliego.pdf, n.d.
- Alonso, V.L., Manarin, R., Perdomo, V., Gulin, E., Serra, E., Cribb, P., 2021. In Vitro Drug Screening Against All Life Cycle Stages of *Trypanosoma cruzi* Using Parasites Expressing  $\beta$ -galactosidase. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/63210>
- Alu, A., Chen, L., Lei, H., Wei, Y., Tian, X., Wei, X., 2022. Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed. *EBioMedicine* 76.  
<https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2022.103841>
- Andreatta, M., Nielsen, M., 2016. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics* 32, 511–517.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv639>
- Andrews, N.W., 1990. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 71, 241–244. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90027-a](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90027-a)
- Andrews, N.W., Whitlow, M.B., 1989. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 249–256.  
[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90086-8)
- Anunziato, F., Romagnani, S., 2009. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res. Ther.* 11, 257. <https://doi.org/10.1186/ar2843>
- Antonoglou, M.B., Sánchez Alberti, A., Redolfi, D.M., Bivona, A.E., Fernández Lynch, M.J., Noli Truant, S., Sarratea, M.B., Iannantuono López, L.V., Malchiodi, E.L., Fernández, M.M., 2020. Heterologous Chimeric Construct Comprising a Modified Bacterial Superantigen and a Cruzipain Domain Confers Protection Against *Trypanosoma cruzi* Infection. *Front. Immunol.* 11, 1279.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01279>
- Araujo, F.G., Morein, B., 1991. Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigens incorporated into iscoms protects against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* 59, 2909–2914. <https://doi.org/10.1128/iai.59.9.2909-2914.1991>
- Araujo Furlan, C.L., Tosello Boari, J., Rodriguez, C., Canale, F.P., Fiocca Vernengo, F., Boccardo, S., Beccaria, C.G., Adoue, V., Joffre, O., Gruppi, A., Montes, C.L., Acosta Rodriguez, E.V., 2018. Limited Foxp3+ Regulatory T Cells Response During Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Is Required to Allow the Emergence of Robust Parasite-Specific CD8+ T Cell Immunity. *Front. Immunol.* 9, 2555.

- <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02555>
- Araujo, P.F., Almeida, A.B., Pimentel, C.F., Silva, A.R., Sousa, A., Valente, S.A., Valente, V.C., Britto, M.M., Rosa, A.C., Alves, R.M., Hagström, L., Teixeira, A.R., 2017. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 437–446. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160538>
- Asanuma, H., Thompson, A.H., Iwasaki, T., Sato, Y., Inaba, Y., Aizawa, C., Kurata, T., Tamura, S., 1997. Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *J. Immunol. Methods* 202, 123–131. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00243-8](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00243-8)
- Atwood, J.A., 2005. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science* 309, 473–476. <https://doi.org/10.1126/science.1110289>
- Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Sher, A., 2006. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology* 177, 3515–3519. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3515>
- Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación [WWW Document], n.d. URL <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/carta-de-derechos-en-chagas> (accessed 6.9.23).
- Barbosa, R.P.A., Filho, B.G., Santos, L.I. dos, Junior, P.A.S., Marques, P.E., Pereira, R.V.S., Cara, D.C., Bruña-Romero, O., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., Machado, A.V., 2013. Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061795>
- Barnabé, C., Mobarec, H.I., Jurado, M.R., Cortez, J.A., Brenière, S.F., 2016. Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. *Infect. Genet. Evol.* 39, 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.029>
- Barreto-de-Albuquerque, J., Silva-dos-Santos, D., Pérez, A.R., Berbert, L.R., de Santana-van-Vliet, E., Farias-de-Oliveira, D.A., Moreira, O.C., Roggero, E., de Carvalho-Pinto, C.E., Jurberg, J., Cotta-de-Almeida, V., Bottasso, O., Savino, W., de Meis, J., 2015. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: New disease form from an old infection? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003849>
- Basso, B., Marini, V., 2015. Experimental Chagas disease in Balb/c mice previously vaccinated with *T. rangeli*. II. The innate immune response shows immunological memory: reality or fiction? *Immunobiology* 220, 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.10.003>
- Beloscar, J., 2013. Aportes al conocimiento de la enfermedad de Chagas: una contribución desde la investigación clínica y básica regional. *Corpus*.
- Benchimol Barbosa, P.R., 2006. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int. J. Cardiol.* 112, 132–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.11.087>
- Bermejo, D.A., Amezcua Vesely, M.C., Khan, M., Acosta Rodríguez, E.V., Montes, C.L., Merino, M.C., Toellner, K.M., Mohr, E., Taylor, D., Cunningham, A.F., Gruppi, A., 2011. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology* 132, 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03347.x>
- Bermejo, D.A., Jackson, S.W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodríguez, E.V., Amezcua-Vesely, M.C., Sather, B.D., Singh, A.K., Khim, S., Mucci, J., Liggitt, D., Campetella, O., Oukka, M., Gruppi, A., Rawlings, D.J., 2013. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR $\gamma$ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat. Immunol.* 14, 514–

522. <https://doi.org/10.1038/ni.2569>
- Beule, A.G., 2010. [Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses]. *Laryngorhinootologie*. 89 Suppl 1, S15–34. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1246124>
- Bhatia, V., Garg, N., 2005. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Rev. Vaccines* 4, 867–880. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.6.867>
- Bhattacharya, T., Daniels, M., Heckerman, D., Foley, B., Frahm, N., Kadie, C., Carlson, J., Yusim, K., McMahon, B., Gaschen, B., Mallal, S., Mullins, J.I., Nickle, D.C., Herbeck, J., Rousseau, C., Learn, G.H., Miura, T., Brander, C., Walker, B., Korber, B., 2007. Founder effects in the assessment of HIV polymorphisms and HLA allele associations. *Science* 315, 1583–1586. <https://doi.org/10.1126/science.1131528>
- Bivona, A.E., Alberti, A.S., Cerny, N., Trinitario, S.N., Malchiodi, E.L., 2020. Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-mediated control. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1866, 165658. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165658>
- Black, C.M., Israelski, D.M., Suzuki, Y., Remington, J.S., 1989. Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. *Immunology* 68, 570–574.
- Blättner, S., Das, S., Paprotka, K., Eilers, U., Krischke, M., Kretschmer, D., Remmele, C.W., Dittrich, M., Müller, T., Schuelein-Voelk, C., Hertlein, T., Mueller, M.J., Huettel, B., Reinhardt, R., Ohlsen, K., Rudel, T., Fraunholz, M.J., 2016. *Staphylococcus aureus* Exploits a Non-ribosomal Cyclic Dipeptide to Modulate Survival within Epithelial Cells and Phagocytes. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005857>
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today* 15, 22–28. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(98\)01362-3](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(98)01362-3)
- Bonney, K.M., Luthringer, D.J., Kim, S.A., Garg, N.J., Engman, D.M., 2019. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu. Rev. Pathol.* 14, 421–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>
- Bontempi, I.A., Vicco, M.H., Cabrera, G., Villar, S.R., González, F.B., Roggero, E.A., Ameloot, P., Callewaert, N., Pérez, A.R., Marcipar, I.S., 2015. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine* 33, 1274–1283. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.044>
- Bontempi, I., Leal, K., Prochetto, E., Díaz, G., Cabrera, G., Bortolotti, A., Morbidoni, H.R., Borsuk, S., Dellagostin, O., Marcipar, I., 2020. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG is a promising platform to develop vaccines against *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 201, 306–316. <https://doi.org/10.1111/cei.13469>
- Bouladoux, N., Hall, J.A., Grainger, J.R., dos Santos, L.M., Kann, M.G., Nagarajan, V., Verthelyi, D., Belkaid, Y., 2012. Regulatory role of suppressive motifs from commensal DNA. *Mucosal Immunol.* 5, 623–634. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.36>
- Breganó, J.W., Picão, R.C., Graça, V.K., Menolli, R.A., Itow Jankevicius, S., Pinge Filho, P., Jankevicius, J.V., 2003. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00256-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00256-6)
- Brenière, S.F., Waleckx, E., Barnabé, C., 2016. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004792. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>
- Brisse, S., Barnabé, C., Tibayrenc, M., 2000a. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* 30, 35–44. [173](https://doi.org/10.1016/s0020-</a></p></div><div data-bbox=)

7519(99)00168-x

- Brisse, S., Dujardin, J.C., Tibayrenc, M., 2000b. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 95–105. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(00\)00302-9](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(00)00302-9)
- Buckner, F.S., 2011. Experimental Chemotherapy and Approaches to Drug Discovery for *Trypanosoma cruzi* Infection, in: *Advances in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00005-8>
- Burdette, D.L., Monroe, K.M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J.S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Vance, R.E., 2011. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478, 515–518. <https://doi.org/10.1038/nature10429>
- Burgos, J.M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H.M.S., Seidenstein, M.E., Piccinalli, R., Freitas, J.M., Levin, M.J., Macchi, L., Macedo, A.M., Freilij, H., Schijman, A.G., 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 37, 1319–1327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.015>
- Burgos, J.M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura, C., Bruses, B., Favaloro, L., Leguizamon, M.S., Lucero, R.H., Laguens, R., Levin, M.J., Favaloro, R., Schijman, A.G., 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 51, 485–495. <https://doi.org/10.1086/655680>
- Burgos, J.M., Risso, M.G., Brenière, S.F., Barnabé, C., Campetella, O., Leguizamón, M.S., 3 2013. Differential distribution of genes encoding the virulence factor trans-sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete typing units. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0058967>
- Buscaglia, C.A., Alfonso, J., Campetella, O., Frasch, A.C.C., 3 1999. Tandem Amino Acid Repeats From *Trypanosoma cruzi* Shed Antigens Increase the Half-Life of Proteins in Blood. *Blood* 93, 2025–2032. [https://doi.org/10.1182/BLOOD.V93.6.2025.406K19\\_2025\\_2032](https://doi.org/10.1182/BLOOD.V93.6.2025.406K19_2025_2032)
- Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Frasch, A.C.C., Di Noia, J.M., 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 229–236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1351>
- Bustamante, J., Tarleton, R., 2015. Reaching for the Holy Grail: insights from infection/cure models on the prospects for vaccines for *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 445–451. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140440>
- Cai, C.W., Blase, J.R., Zhang, X., Eickhoff, C.S., Hoft, D.F., 2016. Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005902>
- Cai, C.W., Eickhoff, C.S., Meza, K.A., Blase, J.R., Audette, R.E., Chan, D.H., Bockerstett, K.A., DiPaolo, R.J., Hoft, D.F., 2021. Th17 Cells Provide Mucosal Protection against Gastric *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infect. Immun.* 89. <https://doi.org/10.1128/IAI.00738-20>
- Camargo, M.M., Andrade, a. C., Almeida, I.C., Travassos, L.R., Gazzinelli, R.T., Almeida, C., Pereira, M.E.S., Ferguson, M.A.J., Travassos, L.R., Gazzinelli, R.T., Almeida, I.C., Pereira, M.E.S., Ferguson, M.A.J., Travassos, L.R., Gazzinelli, R.T., 1997. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J. Immunol.* 159, 6131–6139.
- Campetella, O., Buscaglia, C.A., Mucci, J., Leguizamón, M.S., 5 2020. Parasite-host glycan interactions during *Trypanosoma cruzi* infection: trans-Sialidase rides the show. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165692>
- Cardillo, F., Postol, E., Nihei, J., Aroeira, L.S., Nomizo, A., Mengel, J., 2007. B cells

- modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 122, 584–595.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02677.x>
- Cardoni, R.L., Antúnez, M.I., Abrami, A.A., 1999. [TH1 response in the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*]. *Medicina* 59 Suppl 2, 84–90.
- Carlier, Y., Truyens, C., 2015. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop.* 151, 103–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>
- Carod-Artal, F.J., Gascon, J., 2010. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol.* 9, 533–542. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70042-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70042-9)
- Carrasco, H.J., Segovia, M., Llewellyn, M.S., Morocoima, A., Urdaneta-Morales, S., Martínez, C., Martínez, C.E., Garcia, C., Rodríguez, M., Espinosa, R., de Noya, B.A., Díaz-Bello, Z., Herrera, L., Fitzpatrick, S., Yeo, M., Miles, M.A., Feliciangeli, M.D., 2012. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1707.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001707>
- Cazorla, S.I., Frank, F.M., Becker, P.D., Arnaiz, M., Mirkin, G.A., Corral, R.S., Guzmán, C.A., Malchiodi, E.L., 2010. Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Infect. Dis.* 202, 136–144.  
<https://doi.org/10.1086/652872>
- Cazorla, S.I., Frank, F.M., Malchiodi, E.L., 2009. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Rev. Vaccines* 8, 921–935.  
<https://doi.org/10.1586/erv.09.45>
- CDC-Centers for Disease Control, Prevention, 2009. CDC - Chagas Disease - Epidemiology & Risk Factors.
- Cestari, I., Evans-Osses, I., Schlapbach, L.J., de Messias-Reason, I., Ramirez, M.I., 2013. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. *Mol. Immunol.* 53, 328–334.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.015>
- Chagas disease [WWW Document], n.d. . PAHO. Pan American Health Organization. URL <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease> (accessed 6.9.23).
- Chen, X., Andreana, P.R., Wang, P.G., 1999. Carbohydrates in transplantation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 650–658. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)00022-8](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)00022-8)
- Chessler, A.-D.C., Unnikrishnan, M., Bei, A.K., Daily, J.P., Burleigh, B.A., 2009. *Trypanosoma cruzi* Triggers an Early Type I IFN Response In Vivo at the Site of Intra-dermal Infection. *The Journal of Immunology.*  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800621>
- Cho, S.H., Oh, S.Y., Zhu, Z., Lee, J., Lane, A.P., 2012. Spontaneous eosinophilic nasal inflammation in a genetically-mutant mouse: comparative study with an allergic inflammation model. *PLoS One* 7, e35114.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035114>
- Choudhuri, S., Garg, N.J., 2020. PARP1-cGAS-NF-κB pathway of proinflammatory macrophage activation by extracellular vesicles released during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease. *PLoS Pathog.* 16, e1008474.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008474>
- Ciemny, M., Kurcinski, M., Kamel, K., Kolinski, A., Alam, N., Schueler-Furman, O., Kmiecik, S., 2018. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. *Drug Discov. Today* 23, 1530–1537. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>
- Cisney, E.D., Fernandez, S., Hall, S.I., Krietz, G.A., Ulrich, R.G., 2012. Examining the role of nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) in mouse responses to vaccines. *J. Vis. Exp.* 3960. <https://doi.org/10.3791/3960>
- Clem, A.S., 2011. Fundamentals of vaccine immunology. *J. Glob. Infect. Dis.* 3, 73–78.  
<https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>

- Cobb, D., Hambright, D., Smeltz, R.B., 2010. T-bet-independent effects of IL-12 family cytokines on regulation of Th17 responses to experimental *T. cruzi* infection. *J. Leukoc. Biol.* 88, 965–971. <https://doi.org/10.1189/jlb.0410238>
- Cobb, D., Smeltz, R.B., 2012. Regulation of proinflammatory Th17 responses during *Trypanosoma cruzi* infection by IL-12 family cytokines. *J. Immunol.* 188, 3766–3773. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103478>
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
- Colli, W., Alves, M.J.M., 1999. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 37–49. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700004>
- Combs, T.P., Nagajyothi, Mukherjee, S., De Almeida, C.J.G., Jelicks, L.A., Schubert, W., Lin, Y., Jayabalan, D.S., Zhao, D., Braunstein, V.L., Landskroner-Eiger, S., Cordero, A., Factor, S.M., Weiss, L.M., Lisanti, M.P., Tanowitz, H.B., Scherer, P.E., 2005. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M412802200>
- Corr, S.C., Gahan, C.C.G.M., Hill, C., 2008. M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00359.x>
- Corthésy, B., 2013. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front. Immunol.* 4, 185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00185>
- Costa, F., Franchin, G., Pereira-Chiocola, V.L., Ribeirão, M., Schenkman, S., Rodrigues, M.M., 1998. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* 16, 768–774. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00277-6)
- Coura, J.R., 2006. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39 Suppl 3, 113–117.
- Coura, J.R., Borges-Pereira, J., 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica.* <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.008>
- Coura, J.R., Dias, J.C., 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 Suppl , 31–40. <https://doi.org/S0074-02762009000900006> [pii]
- Cremona, M.L., Sánchez, D.O., Frasch, A.C.C., Campetella, O., 1995. A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. *Gene* 160, 123–128. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00175-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00175-6)
- Cribb, P., Perdomo, V., Alonso, V.L., Manarin, R., Barrios-Payán, J., Marquina-Castillo, B., Tavernelli, L., Hernández-Pando, R., 2017. *Trypanosoma cruzi* High Mobility Group B (TcHMGB) can act as an inflammatory mediator on mammalian cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005350. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005350>
- Cross, G.A., Takle, G.B., 1993. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 385–411. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.002125>
- Cummings, K.L., Tarleton, R.L., 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00093-8)
- Cunha-Neto, E., Coelho, V., Guilherme, L., Fiorelli, A., Stolf, N., Kalil, J., 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J. Clin. Invest.* 98, 1709–1712. <https://doi.org/10.1172/JCI118969>
- da Costa, K.M., da Fonseca, L.M., dos Reis, J.S., da Costa Santos, M.A.R., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., Freire-de-Lima, L., 2021. *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase as a Potential Vaccine Target Against Chagas Disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.768450>
- da Matta Guedes, P.M., Gutierrez, F.R.S., Maia, F.L., Milanezi, C.M., Silva, G.K.,

- Pavanelli, W.R., Silva, J.S., 2010. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e604. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000604>
- Daniel, C., Roussel, Y., Kleerebezem, M., Pot, B., 2011. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends in Biotechnology.* <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.002>
- De Alba-Alvarado, M., Bucio-Torres, M.I., Zenteno, E., Sampedro-Carrillo, E., Hernández-Lopez, M., Reynoso-Ducoing, O., Torres-Gutiérrez, E., Guevara-Gomez, Y., Guerrero-Alquicira, R., Cabrera-Bravo, M., Salazar-Schettino, P.M., 2020. Response to Infection by *Trypanosoma cruzi* in a Murine Model. *Front Vet Sci* 7, 568745. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.568745>
- de Andrade, L.A., 1996. [Early onset Parkinson's disease. Critical review of the literature]. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54, 691–704. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x1996000400024>
- de Araújo, F.F., Vitelli-Avelar, D.M., Teixeira-Carvalho, A., Antas, P.R., Assis Silva Gomes, J., Sathler-Avelar, R., Otávio Costa Rocha, M., Elói-Santos, S.M., Pinho, R.T., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2011. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e992. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000992>
- De Bona, E., Lidani, K.C.F., Bavia, L., Omidian, Z., Gremski, L.H., Sandri, T.L., de Messias Reason, I.J., 2018. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Front. Immunol.* 9, 1842. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>
- de Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, V.F., Teixeira, S.M.R., Chiari, E., Junqueira, A.C.V., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R., Pena, S.D.J., 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2, e24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020024>
- de Noya, B.A., González, O.N., 2015. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop.* 151, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.004>
- de Pinho, R.T., da Silva, W.S., de Castro Côrtes, L.M., da Silva Vasconcelos Sousa, P., de Araujo Soares, R.O., Alves, C.R., 2014. Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Exp. Parasitol.* 147, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.09.003>
- de Salud. Argentina, M., n.d. Guía Vectorial de Chagas.
- Dias, J.P., Bastos, C., Araújo, E., Mascarenhas, A.V., Martins Netto, E., Grassi, F., Silva, M., Tatto, E., Mendonça, J., Araújo, R.F., Shikanai-Yasuda, M.A., Aras, R., 2008. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 296–300. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000300014>
- Díaz-ungría, C., Maldonado Alvarez, C., 1970. Diagnosis of trypanosomiasis. *Rev. Iber. Parasitol.* 30, 659–675.
- Dinatale, B., Balbi, C.B., González, F.B., Pérez, A.R., Pacini, M.F., 2021. Desarrollo preclínico de vacunas profilácticas contra la Enfermedad de Chagas basadas en Transialidasa 1, 23–38. <https://doi.org/10.35305/fcm.v1i.17>
- Durante, I.M., La Spina, P.E., Carmona, S.J., Agüero, F., Buscaglia, C.A., 2017. High-resolution profiling of linear B-cell epitopes from mucin-associated surface proteins (MASPs) of *Trypanosoma cruzi* during human infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005986>
- Duthie, M.S., Kahn, M., White, M., Kapur, R.P., Kahn, S.J., 2005. Both CD1d antigen presentation and interleukin-12 are required to activate natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 73, 1890–1894. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1890-1894.2005>
- Ebensen, T., Libanova, R., Schulze, K., Yevsa, T., Morr, M., Guzm??n, C.A., 2011.

- Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: Strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant. *Vaccine* 29, 5210–5220. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.026>
- Ebrahimi, S., Mohabatkar, H., Behbahani, M., 2019. Predicting Promiscuous T Cell Epitopes for Designing a Vaccine Against *Streptococcus pyogenes*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 187, 90–100. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2804-5>
- Eickhoff, C.S., Lawrence, C.T., Sagartz, J.E., Bryant, L.A., Labovitz, A.J., Gala, S.S., Hoft, D.F., 2010. ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *J. Parasitol.* 96, 758–764. <https://doi.org/10.1645/GE-2396.1>
- Eickhoff, C.S., Van Aartsen, D., Terry, F.E., Meymandi, S.K., Traina, M.M., Hernandez, S., Martin, W.D., Moise, L., Groot, A.S.D., Hoft, D.F., 2015. An immunoinformatic approach for identification of *Trypanosoma cruzi* HLA-A2-restricted CD8(+) T cell epitopes. *Hum. Vaccin. Immunother.* 11, 2322–2328. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1061160>
- Eickhoff, C.S., Vasconcelos, J.R., Sullivan, N.L., Blazevic, A., Bruna-Romero, O., Rodrigues, M.M., Hoft, D.F., 3 2011. Co-Administration of a Plasmid DNA Encoding IL-15 Improves Long-Term Protection of a Genetic Vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000983>
- Eickhoff, C.S., Zhang, X., Vasconcelos, J.R., Motz, R.G., Sullivan, N.L., O'Shea, K., Pozzi, N., Gohara, D.W., Blase, J.R., Cera, E.D., Hoft, D.F., 9 2016. Costimulatory Effects of an Immunodominant Parasite Antigen Paradoxically Prevent Induction of Optimal CD8 T Cell Protective Immunity. *PLoS Pathog.* 12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005896>
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409–415. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- Enriquez, G.F., Bua, J., Orozco, M.M., Wirth, S., Schijman, A.G., Gürtler, R.E., Cardinal, M.V., 2014. High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. *Infect. Genet. Evol.* 25, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.002>
- E Olaf Weber, K.S. (Ed.), n.d. Chagas Disease. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7>
- Erdmann, H., Roßnagel, C., Böhme, J., Iwakura, Y., Jacobs, T., Schaible, U.E., Hölscher, C., 2013. IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment. *Immunobiology* 218, 910–923. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.10.005>
- Erdmann, H., Steeg, C., Koch-Nolte, F., Fleischer, B., Jacobs, T., 2009. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell. Microbiol.* 11, 1600–1611. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01350.x>

- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I.R., 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01604-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01604-0)
- Fainboim, L., Geffner, J., 2005. *Introducción a la inmunología humana*. Ed. Médica Panamericana.
- Fan, D., Takawale, A., Lee, J., Kassiri, Z., 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, 15. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-15>
- Fernandes, M.C., Andrews, N.W., 2012. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 734–747. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>
- Fernandez-Gomez, R., Esteban, S., Gomez-Corvera, R., Zoulika, K., Ouaisi, A., 1998. *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J. Immunol.* 160, 3471–3479.
- Filigheddu, M.T., Górgolas, M., Ramos, J.M., 2017. Orally-transmitted Chagas disease. *Med. Clin.* 148, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>
- Flávia Nardy, A., Freire-de-Lima, C.G., Morrot, A., 2015. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol Res* 2015, 178947. <https://doi.org/10.1155/2015/178947>
- Fonseca, S.G., Moins-Teisserenc, H., Clave, E., Ianni, B., Nunes, V.L., Mady, C., Iwai, L.K., Sette, A., Sidney, J., Marin, M.L.C., Goldberg, A.C., Guilherme, L., Charron, D., Toubert, A., Kalil, J., Cunha-Neto, E., 2005. Identification of multiple HLA-A\*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes Infect.* 7, 688–697. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2005.01.001>
- Fontanella, G.H., Vusser, K.D., Laroy, W., Daurelio, L., Nocito, A.L., Revelli, S., Contreras, R., 2008. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: A vaccine candidate. *Vaccine* 26, 2322–2334. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.060>
- Fralish, B.H., Tarleton, R.L., 2003. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 21, 3070–3080. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00121-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00121-x)
- Frasch, A.C.C., 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01698-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01698-7)
- Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., de Mello, F.G., DosReis, G.A., Lopes, M.F., 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199–203. <https://doi.org/10.1038/35003208>
- Freire-de-Lima, L., Alisson-Silva, F., Carvalho, S.T., Takiya, C.M., Rodrigues, M.M., DosReis, G.A., Mendonça-Previato, L., Previato, J.O., Todeschini, A.R., 4 2010. *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8+ T cell responses. *The Journal of biological chemistry*. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.096305>
- Freire-De-Lima, L., Fonseca, L.M., Oeltmann, T., Mendonça-Previato, L., Previato, J.O., 2015. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology*. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv057>
- Freitas, A.A., Rocha, B., 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 83–111. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.83>
- Freitas, L.M., dos Santos, S.L., Rodrigues-Luiz, G.F., Mendes, T.A.O., Rodrigues, T.S., Gazzinelli, R.T., Teixeira, S.M.R., Fujiwara, R.T., Bartholomeu, D.C., 2011. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS*

- One 6. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0025914>
- Freudenberg, M. a., Galanos, C., 1990. Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int. Rev. Immunol.* 6, 207–221. <https://doi.org/10.3109/08830189009056632>
- Frevert, U., Schenkman, S., Nussenzweig, V., 1992. Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 60, 2349–2360. <https://doi.org/10.1128/iai.60.6.2349-2360.1992>
- Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Sekine, S., Kataoka, K., Markham, J.D., Irwin, A.R., Moon, G.H., Tokuhara, Y., Fujihashi, K., Davydova, J., Yamamoto, M., Gilbert, R.S., Fujihashi, K., 2012. Notch-ligand expression by NALT dendritic cells regulates mucosal Th1- and Th2-type responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.046>
- Gao, W., Pereira, M.A., 2001. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: Role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.* 31, 1503–1512. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200105\)31:5<1503::AID-IMMU1503>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200105)31:5<1503::AID-IMMU1503>3.0.CO;2-W)
- García, G.A., Arnaiz, M.R., Laucella, S.A., Esteva, M.I., Ainciart, N., Riarte, A., Garavaglia, P.A., Fichera, L.E., Ruiz, A.M., 6 2006. Immunological and pathological responses in BALB/c mice induced by genetic administration of Tc13 Tul antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182005009753>
- Gazzinelli, R.T., Ropert, C., Campos, M.A., 2004. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00174.x>
- Giddings, O.K., Eickhoff, C.S., Sullivan, N.L., Hoft, D.F., 2010. Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/IAI.00278-09>
- Gironès, N.Ú., Fresno, M., 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: Autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol.* [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00006-5)
- Godsel, L.M., Engman, D.M., 1999. Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism. *EMBO J.* 18, 2057–2065. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2057>
- Gomes, Y.M., Abath, F.G., Nakazawa, M., Minoprio, P., Vouldoukis, I., Monjour, L., 1999. Partial protection of mice against *Trypanosoma cruzi* after immunizing with the TcY 72 antigenic preparation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 167–172. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000200007>
- González, F.B., Villar, S.R., Fernández Bussy, R., Martin, G.H., Pérol, L., Manarin, R., Spinelli, S.V., Pilon, C., Cohen, J.L., Bottasso, O.A., Piaggio, E., Pérez, A.R., 2015. Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled *T. cruzi* infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3(+) T cells. *Brain Behav. Immun.* 45, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.016>
- Graefe, S.E.B., Jacobs, T., Gaworski, I., Klauenberg, U., Steeg, C., Fleischer, B., 2003. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. *Microbes Infect.* 5, 833–839. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00176-X)
- Grauert, M.R., Houdayer, M., Hontebeyrie-Joskowicz, M., 1993. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.* 93, 85–92.
- Green, S.J., Crawford, R.M., Hockmeyer, J.T., Meltzer, M.S., Nacy, C.A., 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 145, 4290–4297.

- Guedes, P.M.M., Veloso, V.M., Talvani, A., Diniz, L.F., Caldas, I.S., Do-Valle-Matta, M.A., Santiago-Silva, J., Chiari, E., Galvão, L.M.C., Silva, J.S., Bahia, M.T., 2010. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 106–113. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2010.06.010>
- Guhl, F., 2009. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Rev. Ordem Med.* 20, 228–234. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v20i3.139>
- Guhl, F., Ramírez, J.D., 2013. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infect. Genet. Evol.* 20, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.028>
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B.C., n.d. Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology* 77. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_4)
- Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J., Peterson, A.T., 2012. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J. Trop. Med.* 2012, 705326. <https://doi.org/10.1155/2012/705326>
- Gutierrez, F.R.S., Guedes, P.M.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x>
- Hall, B.F., Webster, P., Ma, a. K., Joiner, K. a., Andrews, N.W., 1992. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J. Exp. Med.* 176, 313–325. <https://doi.org/10.1084/jem.176.2.313>
- Heritage, P.L., Underdown, B.J., Arsenault, A.L., Snider, D.P., McDermott, M.R., 1997. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 1256–1262. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.4.97-03017>
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., Fresno, M., 2020. *Trypanosoma Cruzi* Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. *Genes* 11. <https://doi.org/10.3390/genes11101196>
- Higuchi, M. de L., Gutierrez, P.S., Aiello, V.D., Palomino, S., Bocchi, E., Kalil, J., Bellotti, G., Pileggi, F., 1993. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 423, 157–160. <https://doi.org/10.1007/BF01614765>
- Hiroi, T., Iwatani, K., Iijima, H., Kodama, S., Yanagita, M., Kiyono, H., 1998. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur. J. Immunol.* 28, 3346–3353. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3346::AID-IMMU3346>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3346::AID-IMMU3346>3.0.CO;2-P)
- Hoft, D.F., 1996. Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 360–364. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.360>
- Hoft, D.F., Eickhoff, C.S., 2005. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4934-4940.2005>
- Hoft, D.F., Eickhoff, C.S., Giddings, O.K., Vasconcelos, J.R.C., Rodrigues, M.M., 2007. 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. *The Journal of Immunology* 179, 6889–6900. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6889>
- Hoft, D.F., Schnapp, A.R., Eickhoff, C.S., Roodman, S.T., 2000. Involvement of CD4+ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68, 197–204.

- <https://doi.org/10.1128/IAI.68.1.197-204.2000>
- Hölscher, C., Köhler, G., Müller, U., Mossmann, H., Schaub, G.A., Brombacher, F., 1998. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* 66, 1208–1215.
- Hölscher, C., Mohrs, M., Dai, W.J., Köhler, G., Ryffel, B., Schaub, G.A., Mossmann, H., Brombacher, F., 2000. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect. Immun.* 68, 4075–4083. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4075-4083.2000>
- Hunter, C.A., Ellis-Neyes, L.A., Slifer, T., Kanaly, S., Grünig, G., Fort, M., Rennick, D., Araujo, F.G., 1997. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 158, 3311–3316.
- Jones, E.M., Colley, D.G., Tostes, S., Lopes, E.R., Vnencak-Jones, C.L., McCurley, T.L., 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 348–357. <https://doi.org/10.1038/2091178c0>
- Julio R. Alfred Cassab, Francois Noireau, Germán Guillén, n.d. Enfermedad de Chagas.
- Kawasaki, Y., Suzuki, J., Sakai, N., Isome, M., Nozawa, R., Tanji, M., Suzuki, H., 2004. Evaluation of T helper-1/-2 balance on the basis of IgG subclasses and serum cytokines in children with glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 44, 42–49. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.03.029>
- Kemmerling, U., Osuna, A., Schijman, A.G., Truyens, C., 2019. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Review About the Interactions Between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses. *Front. Microbiol.* 10, 1854. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>
- Kipnis, T.L., David, J.R., Alper, C.A., Sher, A., da Silva, W.D., 1981. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 602–605. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.602>
- Kiros, T.G., Levast, B., Auray, G., Strom, S., van Kessel, J., Gerdt, V., 2012. The Importance of Animal Models in the Development of Vaccines, in: Baschieri, S. (Ed.), *Innovation in Vaccinology: From Design, through to Delivery and Testing*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 251–264. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4543-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4543-8_11)
- Kobuchi, K., Kataoka, K., Taguchi, Y., Miyake, T., Umeda, M., 2019. Nasal double DNA adjuvant induces salivary FimA-specific secretory IgA antibodies in young and aging mice and blocks *Porphyromonas gingivalis* binding to a salivary protein. *BMC Oral Health* 19, 188. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0886-2>
- Krautz, G.M., Peterson, J.D., Godsel, L.M., Krettli, A.U., Engman, D.M., 1998. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 137–143. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.137>
- Kumar, S., Tarleton, R.L., 2001. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 166, 4596–4603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4596>
- Kumar, S., Tarleton, R.L., 1998. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 20, 207–216. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00154.x>
- Langermans, J.A.M., Vanderhulst, M.E.B., Nibbering, P.H., Hiemstra, P.S., Fransen, L., Vanfurth, R., 1992. IFN-GAMMA-INDUCED L-ARGININE-DEPENDENT TOXOPLASMASTIC ACTIVITY IN MURINE PERITONEAL-MACROPHAGES IS MEDIATED BY ENDOGENOUS TUMOR-NECROSIS-FACTOR-ALPHA. *Mian Yi Xue Za Zhi* 148, 568–574.
- Lannes-Vieira, J., 2022. Multi-therapeutic strategy targeting parasite and inflammation-related alterations to improve prognosis of chronic Chagas cardiomyopathy: a

- hypothesis-based approach. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 117, e220019. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220019>
- Lantos, A.B., Carlevaro, G., Araoz, B., Ruiz Diaz, P., Camara, M. de L.M., Buscaglia, C.A., Bossi, M., Yu, H., Chen, X., Bertozzi, C.R., Mucci, J., Campetella, O., 2016. Sialic Acid Glycobiology Unveils Trypanosoma cruzi Trypomastigote Membrane Physiology. *PLoS Pathog.* 12, e1005559. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005559>
- Leguizamón, M.S., Campetella, O.E., González Cappa, S.M., Frasch, A.C., 1994. Mice infected with Trypanosoma cruzi produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. *Infect. Immun.* 62, 3441–3446. <https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3441-3446.1994>
- Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S.C., Freitas, D.A., Miyoshi, A., Bermúdez-Humarán, L.G., Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Leclercq, S., Gabriel, J.E., Guimaraes, V.D., Oliveira, M.N., Charlier, C., Gautier, M., Langella, P., 2005. Protein secretion in Lactococcus lactis : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb. Cell Fact.* 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-2>
- Lesénéchal, M., Becquart, L., Lacoux, X., Ladavière, L., Baida, R.C.P., Paranhos-Baccalà, G., Da Silveira, J.F., 2005. Mapping of B-cell epitopes in a Trypanosoma cruzi immunodominant antigen expressed in natural infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.2.329-333.2005>
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P.A., Trejo-Varón, J.A., Carranza, J.C., Pinto, C.M., Serrano, M.G., Buck, G.A., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., 2015. Genetic diversity of Trypanosoma cruzi in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 151, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>
- Limon-Flores, A.Y., Cervera-Cetina, R., Tzec-Arjona, J.L., Ek-Macias, L., Sánchez-Burgos, G., Ramirez-Sierra, M.J., Cruz-Chan, J.V., VanWynsberghe, N.R., Dumonteil, E., 2010. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of Trypanosoma cruzi infection in mice: Role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine.* <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2010.08.104>
- Lirussi, D., Ebensen, T., Schulze, K., Trittel, S., Duran, V., Liebich, I., Kalinke, U., Guzmán, C.A., 2017. Type I IFN and not TNF, is Essential for Cyclic Di-nucleotide-elicited CTL by a Cytosolic Cross-presentation Pathway. *EBioMedicine* 22, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.016>
- Lohrberg, M., Pabst, R., Wilting, J., 2018. Co-localization of lymphoid aggregates and lymphatic networks in nose- (NALT) and lacrimal duct-associated lymphoid tissue (LDALT) of mice. *BMC Immunol.* 19. <https://doi.org/10.1186/S12865-018-0242-3>
- Lohrberg, M., Wilting, J., 2016. The lymphatic vascular system of the mouse head. *Cell Tissue Res.* 366, 667–677. <https://doi.org/10.1007/S00441-016-2493-8>
- Luquetti, A.O., Tavares, S.B. do N., Siriano, L. da R., Oliveira, R.A. de, Campos, D.E., de Moraes, C.A., de Oliveira, E.C., 2015. Congenital transmission of Trypanosoma cruzi in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 369–376. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140410>
- Lycke, N., 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 592–605. <https://doi.org/10.1038/nri3251>
- Machado, A.V., Cardoso, J.E., Claser, C., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., Bruna-Romero, O., 2006. Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum. Gene Ther.* 17, 898–908. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.898>
- Madhun, A.S., Haaheim, L.R., Nøstbakken, J.K., Ebensen, T., Chichester, J., Yusibov, V., Guzman, C.A., Cox, R.J., 2011. Intranasal c-di-GMP-adjuvanted plant-derived H5 influenza vaccine induces multifunctional Th1 CD4+ cells and strong mucosal and systemic antibody responses in mice. *Vaccine* 29, 4973–4982.

- <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.094>
- Makino, T., Skretas, G., Georgiou, G., 2011. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microb. Cell Fact.* 10, 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-32>
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A.C.V., Veludo, H.H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V.L.B., Teixeira, M.M.G., 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136, 641–655. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005861>
- Marin-Neto, J.A., Cunha-Neto, E., Maciel, B.C., Simões, M.V., 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115, 1109–1123. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>
- Marin Neto, J.A., Simões, M.V., Sarabanda, A.V., 1999. Chagas' heart disease. *Arq. Bras. Cardiol.* 72, 247–280. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x1999000300001>
- Marino, A.P.M.P., Azevedo, M.I.P., Lannes-Vieira, J., 2003. Differential expression of adhesion molecules shaping the T-cell subset prevalence during the early phase of autoimmune and *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 945–952. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000700015>
- Martin, D., Tarleton, R., 2004. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00183.x>
- Martín-Escolano, J., Medina-Carmona, E., Martín-Escolano, R., 2020. Chagas Disease: Current View of an Ancient and Global Chemotherapy Challenge. *ACS Infect Dis* 6, 2830–2843. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00353>
- Matos, M.N., Cazorla, S.I., Schulze, K., Ebensen, T., Guzmán, C.A., Malchiodi, E.L., 2017. Immunization with Tc52 or its amino terminal domain adjuvanted with c-di-AMP induces Th17+Th1 specific immune responses and confers protection against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005300>
- Millar, A.E., Wleklinski-Lee, M., Kahn, S.J., 1999. The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. *J. Immunol.* 162, 6092–6099.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., Steinegger, M., 2022. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* 19, 679–682. <https://doi.org/10.1038/S41592-022-01488-1>
- Mitchell, G.F., Jeron, A., Koren, G., 1998. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am. J. Physiol.* 274, H747–51. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.3.H747>
- Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimano, Y., Iwakura, Y., Yoshida, H., 2010. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900047>
- Montaudouin, C., Anson, M., Hao, Y., Duncker, S.V., Fernandez, T., Gaudin, E., Ehrenstein, M., Kerr, W.G., Colle, J.-H., Bruhns, P., Daëron, M., Freitas, A.A., 2013. Quorum sensing contributes to activated IgM-secreting B cell homeostasis. *J. Immunol.* 190, 106–114. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200907>
- Morello, E., Bermúdez-Humarán, L.G., Llull, D., Solé, V., Miraglio, N., Langella, P., Poquet, I., 2007. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1159/000106082>
- Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Jr, Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S.J., Yusuf, S., BENEFIT Investigators, 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–

1306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>
- Mucci, J., Lantos, A.B., Buscaglia, C.A., Leguizamón, M.S., Campetella, O., 2017. The *Trypanosoma cruzi* Surface, a Nanoscale Patchwork Quilt. *Trends Parasitol.* 33, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.004>
- Müller, U., Sobek, V., Balkow, S., Hölscher, C., Müllbacher, A., Museteanu, C., Mossman, H., Simon, M.M., 2003. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur. J. Immunol.* 33, 70–78. <https://doi.org/10.1002/immu.200390009>
- Nardy, A.F.F.R., Freire-de-Lima, C.G., Pérez, A.R., Morrot, A., 2016. Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the escape from host immune surveillance. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00348>
- Nielsen, M., Lundegaard, C., Worning, P., Lauemøller, S.L., Lamberth, K., Buus, S., Brunak, S., Lund, O., 2003. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.* 12, 1007–1017. <https://doi.org/10.1110/ps.0239403>
- Nizard, M., Diniz, M.O., Roussel, H., Tran, T., Ferreira, L.C., Badoual, C., Tartour, E., 2014. Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10, 2175–2187. <https://doi.org/10.4161/hv.29269>
- Norris, K.A., Galvao, L.M.C., Schrimpf, J.E., Cancado, J.R., Krettli, A.U., 1994. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas' disease. *Infection and Immunity.* <https://doi.org/10.1128/iai.62.9.4072-4074.1994>
- Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Dos Santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., Kastenmayer, R., Hunter, C., Grigg, M.E., Belkaid, Y., 2009. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31, 772–786. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.001>
- Oliveira, A.-C., Peixoto, J.R., de Arruda, L.B., Campos, M.A., Gazzinelli, R.T., Golenbock, D.T., Akira, S., Previato, J.O., Mendonca-Previato, L., Nobrega, A., Bellio, M., 2004. Expression of Functional TLR4 Confers Proinflammatory Responsiveness to *Trypanosoma cruzi* Glycoinositolphospholipids and Higher Resistance to Infection with *T. cruzi*. *The Journal of Immunology* 173, 5688–5696. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5688>
- Ouaisi, A., Guilvard, E., Delneste, Y., Caron, G., Magistrelli, G., Herbault, N., Thieblemont, N., Jeannin, P., 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* 168, 6366–6374. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6366>
- Peñafiel, M.M., Melo, L.P., Trullo, K.E., Melo, C.P., 2014. Manifestaciones bucales de la enfermedad de chagas 27, 99–107.
- Pereira-Chioccola, V.L., Acosta-Serrano, A., Correia de Almeida, I., Ferguson, M. a., Souto-Padron, T., Rodrigues, M.M., Travassos, L.R., Schenkman, S., 2000. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 7, 1299–1307.
- Pereira-Chioccola, V.L., Schenkman, S., Kloetzel, J.K., 1994. Sera from chronic chagasic patients and rodents infected with *Trypanosoma cruzi* inhibit trans-sialidase by recognizing its amino-terminal and catalytic domain. *Infect. Immun.* 62, 2973–2978.
- Pereira, K.S., Schmidt, F.L., Guaraldo, A.M.A., Franco, R.M.B., Dias, V.L., Passos, L.A.C., 2009. Chagas' disease as a foodborne illness. *J. Food Prot.* 72, 441–446. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.2.441>
- Pereira, V.R.A., Lorena, V.M.B., Ver??osa, A.F.A., Silva, E.D., Ferreira, A.G.P.,

- Montarroyos, U.R., Galvão Silva, A.P., Gomes, Y.M., 2003. Antibody Isotype Responses in Balb/c Mice Immunized with the Cytoplasmic Repetitive Antigen and Flagellar Repetitive Antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 823–825. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000600019>
- Pérez, A.R., Roggero, E., Nicora, A., Palazzi, J., Besedovsky, H.O., Del Rey, A., Bottasso, O.A., 2007. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain Behav. Immun.* 21, 890–900. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.02.004>
- Pérez, A.R., Silva-Barbosa, S.D., Berbert, L.R., Revelli, S., Beloscar, J., Savino, W., Bottasso, O., 2011. Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. *J. Neuroimmunol.* 235, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.03.010>
- Petray, P.B., Rottenberg, M.E., Bertot, G., Corral, R.S., Diaz, A., Orn, A., Grinstein, S., 1993. Effect of anti-gamma-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett.* 35, 77–80. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(93\)90151-q](https://doi.org/10.1016/0165-2478(93)90151-q)
- Pierrotti, L.C., Carvalho, N.B., Amorin, J.P., Pascual, J., Kotton, C.N., López-Vélez, R., 2018. Chagas Disease Recommendations for Solid-Organ Transplant Recipients and Donors. *Transplantation* 102, S1–S7. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002019>
- Pinazo, M.J., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gállego, M., Ayala, E., Del Cacho, E., Soy, D., Gascon, J., 2010. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4896–4899. <https://doi.org/10.1128/AAC.00537-10>
- Pinto, L., Schijman, A.G., Alonso-Padilla, J., Lozano, D., Torrico, M.C., Gamba, P., Torrez, M., Lozada, V., Cartagena, K., Sanchez, J., Torrico, F., Gascon, J., 2022. Molecular detection and parasite load of *Trypanosoma cruzi* in digestive tract tissue of Chagas disease patients affected by megacolon. *Acta Trop.* 235, 106632. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106632>
- Pitcovsky, T.A., Buscaglia, C.A., Mucci, J., Campetella, O., 2002. A Functional Network of Intramolecular Cross-Reacting Epitopes Delays the Elicitation of Neutralizing Antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase. *J. Infect. Dis.* 186, 397–404. <https://doi.org/10.1086/341463>
- Pollevick, G.D., Sanchez, D.O., Campetella, O., Trombetta, S., Sousa, M., Henriksson, J., Hellman, U., Pettersson, U., Cazzulo, J.J., Frasch, A.C.C., 1993. Members of the SAPA/trans-sialidase protein family have identical N-terminal sequences and a putative signal peptide. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 171–174. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90018-S](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90018-S)
- Poncini, C.V., Giménez, G., Pontillo, C.A., Alba-Soto, C.D., de Isola, E.L.D., Piazzón, I., Cappa, S.M.G., 2010. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Immunol.* 47, 1981–1988. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.04.016>
- Poncini, C.V., González-Cappa, S.M., 2017. Dual role of monocyte-derived dendritic cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur. J. Immunol.* 47, 1936–1948. <https://doi.org/10.1002/eji.201646830>
- Prata, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 1, 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Prata, A., 1999. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 81–88. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700008>
- Previato, J., Andrade, A.F.B., Pessolani, M.C.V., Mendonça-Previato, L., 1985. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 85–96.

- [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90051-9)
- Prochetto, E., Roldán, C., Bontempi, I.A., Bertona, D., Peverengo, L., Vicco, M.H., Rodeles, L.M., Pérez, A.R., Marcipar, I.S., Cabrera, G., Prochetto, E., Roldán, C., Bontempi, I.A., Bertona, D., Peverengo, L., Vicco, M.H., Rodeles, L.M., Pérez, A.R., Marcipar, I.S., Cabrera, G., 2017. Trans-sialidase-based vaccine candidate protects against *Trypanosoma cruzi* infection, not only inducing an effector immune response but also affecting cells with regulatory/suppressor phenotype. *Oncotarget* 5. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18217>
- Quijano-Hernandez, I., Dumonteil, E., 2011. Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*. <https://doi.org/10.4161/hv.7.11.17016>
- Quintana, I., Espariz, M., Villar, S.R., González, F.B., Pacini, M.F., Cabrera, G., Bontempi, I., Prochetto, E., Stülke, J., Perez, A.R., Marcipar, I., Blancato, V., Magni, C., 9 2018. Genetic Engineering of *Lactococcus lactis* Co-producing Antigen and the Mucosal Adjuvant 3' 5'- cyclic di Adenosine Monophosphate (c-di-AMP) as a Design Strategy to Develop a Mucosal Vaccine Prototype. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02100>
- Ramírez, J.D., Montilla, M., Cucunubá, Z.M., Floréz, A.C., Zambrano, P., Guhl, F., 2013a. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2041. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002041>
- Ramírez, J.D., Turriago, B., Tapia-Calle, G., Guhl, F., 2013b. Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Colombia. *Vet. Parasitol.* 196, 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.054>
- Ramsay, A.J., Husband, A.J., Ramshaw, I.A., Bao, S., Matthaei, K.I., Koehler, G., Kopf, M., 1994. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 264, 561–563. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8160012>
- Rappuoli, R., 2000. Reverse vaccinology. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 445–450. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00119-3)
- Rassi, A., Jr, Rassi, A., Little, W.C., 2000. Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol.* 23, 883–889. <https://doi.org/10.1002/clc.4960231205>
- Rassi, A., Jr, Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2009. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 152–158. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900021>
- Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Ratier, L., Urrutia, M., Paris, G., Zarebski, L., Frasc, A.C., Goldbaum, F.A., 10 2008. Relevance of the diversity among members of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family analyzed with camelids single-domain antibodies. *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0003524>
- Reed, S.G., Brownell, C.E., Russo, D.M., Silva, J.S., Grabstein, K.H., Morrissey, P.J., 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 153, 3135–3140.
- Reynisson, B., Barra, C., Kaabinejadian, S., Hildebrand, W.H., Peters, B., Nielsen, M., 2020. Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. *J. Proteome Res.* 19, 2304–2315. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00874>
- Rezende-Oliveira, K., Sarmiento, R.R., Rodrigues, V., Jr, 2012. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 45–50. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000100009>
- Riese, P., Sakthivel, P., Trittel, S., Guzmán, C. a., 2014. Intranasal formulations: promising strategy to deliver vaccines. *Expert Opin. Drug Deliv.* 1–16.

- <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.931936>
- Ries, J., Komarek, A., Gottschalk, J., Brand, B., Amsler, L., Jutzi, M., Frey, B.M., 2016. A Case of Possible Chagas Transmission by Blood Transfusion in Switzerland. *Transfus. Med. Hemother.* 43, 415–417. <https://doi.org/10.1159/000446264>
- Risso, M.G., Pitcovsky, T.A., Caccuri, R.L., Campetella, O., Leguizamón, M.S., 2007. Immune system pathogenesis is prevented by the neutralization of the systemic trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* during severe infections. *Parasitology* 134, 503. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001752>
- Rodrigues, M.M., Oliveira, A.C., Bellio, M., 2012. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J. Parasitol. Res.* 2012, 507874. <https://doi.org/10.1155/2012/507874>
- Rodrigues, M.M., Ribeiro, M., Pereira-Chiocola, V., Renia, L., Costa, F., 1999. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.3855-3863.1999>
- Roggero, E., Perez, A., Tamae-Kakazu, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Wietzerbin, J., Serra, E., Revelli, S., Bottasso, O., 2002. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 421–428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01874.x>
- Roggero, E., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Perez, A., Velikovsky, A., Revelli, S., Bottasso, O., 2004. Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.02.003>
- Romero-Molina, S., Ruiz-Blanco, Y.B., Mieres-Perez, J., Harms, M., Münch, J., Ehrmann, M., Sanchez-Garcia, E., 8 2022. PPI-Affinity: A Web Tool for the Prediction and Optimization of Protein-Peptide and Protein-Protein Binding Affinity. *Journal of proteome research.* <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.2C00020>
- Rosenberg, C.S., Martin, D.L., Tarleton, R.L., 7 2010. CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. *J. Immunol.* 185, 560–568. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1000432>
- Rubin-de-Celis, S.S.C., Uemura, H., Yoshida, N., Schenkman, S., 2006. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell. Microbiol.* 8, 1888–1898. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00755.x>
- Rueda, K., Trujillo, J.E., Carranza, J.C., Vallejo, G.A., 2014. [Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* : a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries]. *Biomedica* 34, 631–641. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572014000400017>
- Ruiz, A.M., Esteva, M., Cabeza Meckert, P., Laguens, R.P., Segura, E.L., 1985. Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 42, 299–309.
- Ruiz Díaz, P., Mucci, J., Meira, M.A., Bogliotti, Y., Musikant, D., Leguizamón, M.S., Campetella, O., 2015. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase prevents elicitation of Th1 cell response via interleukin 10 and downregulates Th1 effector cells. *Infect. Immun.* 83, 2099–2108. <https://doi.org/10.1128/IAI.00031-15>
- Russell, M.W., Moldoveanu, Z., White, P.L., Sibert, G.J., Mestecky, J., Michalek S, M., 1996. Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the Cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* 64, 1272–1283. <https://doi.org/10.1128/iai.64.4.1272->

1283.1996

- Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J., Kiyono, H., 2003. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. *J. Immunol.* 170, 495–502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.495>
- Salazar-Schettino, P.M., Cabrera-Bravo, M., Vazquez-Antona, C., Zenteno, E., Alba-Alvarado, M.D., Gutierrez, E.T., Gomez, Y.G., Perera-Salazar, M.G., Torre, G.G. de la, Bucio-Torres, M.I., 2016. Chagas Disease in Mexico: Report of 14 Cases of Chagasic Cardiomyopathy in Children. *Tohoku J. Exp. Med.* 240, 243–249. <https://doi.org/10.1620/tjem.240.243>
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K., Ahmed, R., 2010. From vaccines to memory and back. *Immunity* 33, 451–463. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.008>
- Sanchez Alberti, A., Bivona, A.E., Cerny, N., Schulze, K., Weißmann, S., Ebensen, T., Morales, C., Padilla, A.M., Cazorla, S.I., Tarleton, R.L., Guzmán, C.A., Malchiodi, E.L., 2017. Engineered trivalent immunogen adjuvanted with a STING agonist confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *npj Vaccines* 2, 9. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0010-z>
- Sánchez, L.V., Ramírez, J.D., 2013. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology* 140, 147–159. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001394>
- Sangenito, L.S., Branquinho, M.H., Santos, A.L.S., 2020. Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009-2018) Survey. *Trop Med Infect Dis* 5. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020088>
- Sano, M., n.d. Chagas, the neglected disease affecting 1.5 million people in Argentina, 20% of the total of infected people in the world [WWW Document]. URL <https://www.mundosano.org/en/chagas-the-neglected-disease-affecting-1-5-million-people-in-argentina-20-of-the-total-of-infected-people-in-the-world/> (accessed 6.9.23).
- Sato, S., Kiyono, H., 2012. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr. Opin. Virol.* 2, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.009>
- Savino, W., Villa-Verde, D.M.S., Mendes-da-Cruz, D.A., Silva-Monteiro, E., Perez, A.R., Aoki, M. del P., Bottasso, O., Guiñazú, N., Silva-Barbosa, S.D., Gea, S., 2007. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 107–124. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.01.010>
- Schalk, J.A.C., Mooi, F.R., Berbers, G.A.M., van Aerts, L.A.G.J.M., Ovelgönne, H., Kimman, T.G., 2006. Preclinical and clinical safety studies on DNA vaccines. *Hum. Vaccin.* 2, 45–53. <https://doi.org/10.4161/hv.2.2.2620>
- Schaub, G.A., Meiser, C.K., Balczun, C., 2011. Interactions of *Trypanosoma cruzi* and Triatomines, in: Mehlhorn, H. (Ed.), *Progress in Parasitology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 155–178. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-21396-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-21396-0_9)
- Schmidt, S., 2010. Sur l'importance DE la composition DE la toxine diphtérique pour la production Du sérum antidiphtérique1. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 12, 7–23. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.1935.tb05461.x>
- Shahi, S.K., Freedman, S.N., Dahl, R.A., Karandikar, N.J., Mangalam, A.K., 2019. Scoring disease in an animal model of multiple sclerosis using a novel infrared-based automated activity-monitoring system. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55713-7>
- Shikanai-Yasuda, M.A., Carvalho, N.B., 2012. Oral transmission of Chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* 54, 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Silva-dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque, J., Guerra, B., Moreira, O.C., Berbert, L.R., Ramos, M.T., Mascarenhas, B.A.S., Britto, C., Morrot, A., Serra Villa-Verde, D.M., Garzoni, L.R., Savino, W., Cotta-de-Almeida, V., Meis, J. de, 2017.

- Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl. Trop. Dis.* <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507>
- Silva, G.K., Gutierrez, F.R.S., Guedes, P.M.M., Horta, C.V., Cunha, L.D., Mineo, T.W.P., Santiago-Silva, J., Kobayashi, K.S., Flavell, R.A., Silva, J.S., Zamboni, D.S., 2010. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 184, 1148–1152. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902254>
- Silva, J.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Mohler, K.M., Anderson, D., Reed, S.G., 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 175, 169–174. <https://doi.org/10.1084/jem.175.1.169>
- Silva, J.S., Twardzik, D.R., Reed, S.G., 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J. Exp. Med.* 174, 539–545. <https://doi.org/10.1084/jem.174.3.539>
- Silverio, J.C., Pereira, I.R., Cipitelli, M. da C., Vinagre, N.F., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., Lannes-Vieira, J., 2012. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 8, e1002645. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002645>
- Škrnjug, I., Guzmán, C.A., Ruecker, C., 2014a. Cyclic GMP-AMP displays mucosal adjuvant activity in mice. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110150>
- Škrnjug, I., Rueckert, C., Libanova, R., Lienenklaus, S., Weiss, S., Guzmán, C.A., 2014b. The mucosal adjuvant cyclic di-AMP exerts immune stimulatory effects on dendritic cells and macrophages. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095728>
- Smigiel, K.S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K.R., Dudda, J.C., Klonowski, K.D., Campbell, D.J., 2014. CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.* 211, 121–136. <https://doi.org/10.1084/jem.20131142>
- Snary, D., Flint, J.E., Wood, J.N., Scott, M.T., Chapman, M.D., Dodd, J., Jessell, T.M., Miles, M.A., 1983. A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and glia. *Clin. Exp. Immunol.* 54, 617–624.
- Soares, M.B., Silva-Mota, K.N., Lima, R.S., Bellintani, M.C., Pontes-de-Carvalho, L., Ribeiro-dos-Santos, R., 2001. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am. J. Pathol.* 159, 703–709. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61741-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61741-5)
- Staats, H.F., Jackson, R.J., Marinaro, M., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J.R., 1994. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 572–583. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90144-9)
- Staats, H.F., Thompson, A.L., 2011. Cytokines: the future of intranasal vaccine adjuvants. *Clin. Dev. Immunol.* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/289597>
- Staquicini, D.I., Martins, R.M., Macedo, S., Sasso, G.R.S., Atayde, V.D., Juliano, M.A., Yoshida, N., 2010. Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e613. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000613>
- Stempin, C., Giordanengo, L., Gea, S., Cerbán, F., 2002. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J. Leukoc. Biol.* 72, 727–734.
- Storino, R.A., 1994. Enfermedad de Chagas.
- Sun, J., Tarleton, R.L., 1993. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 161–169.

- Takaki, H., Takashima, K., Oshiumi, H., Ainai, A., Suzuki, T., Hasegawa, H., Matsumoto, M., Seya, T., 2017. cGAMP Promotes Germinal Center Formation and Production of IgA in Nasal-Associated Lymphoid Tissue. *Medical sciences (Basel, Switzerland)* 5, 35. <https://doi.org/10.3390/MEDSCI5040035>
- Takehara, H.A., Perini, A., da Silva, M.H., Mota, I., 1981. Trypanosoma cruzi: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol.* 52, 137–146. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(81\)90069-2](https://doi.org/10.1016/0014-4894(81)90069-2)
- Talvani, A., Ribeiro, C.S., Aliberti, J.C., Michailowsky, V., Santos, P.V., Murta, S.M., Romanha, A.J., Almeida, I.C., Farber, J., Lannes-Vieira, J., Silva, J.S., Gazzinelli, R.T., 2000. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi. *Microbes Infect.* 2, 851–866. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00388-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00388-9)
- Tarleton, R.L., 2015. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Semin. Immunopathol.* 37, 233–238. <https://doi.org/10.1007/S00281-015-0481-9>
- Teixeira, A.R.L., Hecht, M.M., Guimaro, M.C., Sousa, A.O., Nitz, N., 2011. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>
- Teixeira, A.R., Tomé, A.M., Lang, E.W., Gruber, P., Martins da Silva, A., 2006. Automatic removal of high-amplitude artefacts from single-channel electroencephalograms. *Comput. Methods Programs Biomed.* 83, 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2006.06.003>
- Tezuka, H., Ohteki, T., 2019. Regulation of IgA production by intestinal dendritic cells and related cells. *Front. Immunol.* 10, 1891. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01891/BIBTEX>
- Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28, 85–104. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00180-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00180-x)
- Todeschini, A.R., Nunes, M.P., Pires, R.S., Lopes, M.F., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., DosReis, G.A., 2002. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J. Immunol.* 168, 5192–5198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.5192>
- Tomazi, L., Kawashita, S.Y., Pereira, P.M., Zingales, B., Briones, M.R.S., 2009. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that Trypanosoma cruzi hybrid strains are polyphyletic. *Genet. Mol. Res.* 8, 458–476. <https://doi.org/10.4238/vol8-2gmr591>
- Torrice, F., Heremans, H., Rivera, M.T., Van Marck, E., Billiau, A., Carlier, Y., 1991. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice. *J. Immunol.* 146, 3626–3632.
- Tosello Boari, J., Amezcua Vesely, M.C., Bermejo, D.A., Ramello, M.C., Montes, C.L., Cejas, H., Gruppi, A., Acosta Rodríguez, E.V., 2012. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog.* 8, e1002658. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002658>
- Toso M, A., Vial U, F., Galanti, N., 2011. Oral transmission of Chagas' disease. *Rev. méd. Chile* 139, 258–266. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872011000200017>
- Tracey, K.J., Beutler, B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I.W., Hariri, R.J., Fahey, T.J., Zentella, A., Albert, J.D., Et, A., 1986. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234, 470–474. <https://doi.org/10.1126/science.3764421>
- Turley, J.L., Lavelle, E.C., 2022. Resolving adjuvant mode of action to enhance vaccine efficacy. *Curr. Opin. Immunol.* 77, 102229. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102229>
- Tzelepis, F., de Alencar, B.C.G., Penido, M.L.O., Claser, C., Machado, A.V., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R.T., Rodrigues, M.M., 2008. Infection with

- Trypanosoma cruzi restricts the repertoire of parasite-specific CD8<sup>+</sup> T cells leading to immunodominance. *J. Immunol.* 180, 1737–1748. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.3.1737>
- Umekita, L.F., Mota, I., 2000. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 253–258. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2000000300001>
- Vangone, A., Bonvin, A., 2017. PRODIGY: A Contact-based Predictor of Binding Affinity in Protein-protein Complexes. *Bio-protocol* 7. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.2124>
- Vasconcelos, J.R.C., Boscardin, S.B., Hiyane, M.I., Kinoshita, S.S., Fujimura, A.E., Rodrigues, M.M., 2003. A DNA-priming protein-boosting regimen significantly improves type 1 immune response but not protective immunity to *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain. *Immunol. Cell Biol.* 81, 121–129. <https://doi.org/10.1046/j.0818-9641.2002.01136.x>
- Velasco, M., Gimeno-Feliú, L.A., Molina, I., Salas-Coronas, J., Solà, I., Monge-Maillo, B., Torrús-Tendero, D., Caylà, J., de Guzmán, E.N., Arellano, J.P., Pérez-Molina, J.A., 2020. Screening for *Trypanosoma cruzi* infection in immigrants and refugees: Systematic review and recommendations from the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Euro Surveill.* 25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.1900393>
- Velazquez, M., Diez, C.N., Mora, C., Diosque, P., Marcipar, I.S., 2008. *Trypanosoma cruzi*: An analysis of the minicircle hypervariable regions diversity and its influence on strain typing. *Exp. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.07.016>
- Vespa, G.N.R., Cunha, F.Q., Silva, J.S., 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and Immunity.*
- Vianna Martins, A., Patrícia Gomes, A., de Mendonça, E.G., Rangel Fietto, J.L., Alberto Santana, L., de Almeida Oliveira, M.G., Geller, M., Freitas Santos, R. de, Roger Vitorino, R., Siqueira-Batista, R., 2012. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio* 16, 45–58. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(12\)70057-7](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(12)70057-7)
- Vieira, R. de S., Nascimento, M.S., Noronha, I.H., Vasconcelos, J.R.C., Benvenuti, L.A., Barber, G.N., Câmara, N.O.S., Kalil, J., Cunha-Neto, E., Almeida, R.R., 2021. STING Signaling Drives Production of Innate Cytokines, Generation of CD8<sup>+</sup> T Cells and Enhanced Protection Against *Trypanosoma cruzi* Infection. *Front. Immunol.* 12, 775346. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.775346>
- Vimr, E., Lichtensteiger, C., 2002. To sialylate, or not to sialylate: That is the question. *Trends in Microbiology.* [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02361-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02361-2)
- Waldo, F.B., van den Wall Bake, A.W., Mestecky, J., Husby, S., 1994. Suppression of the immune response by nasal immunization. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 72, 30–34. <https://doi.org/10.1006/clin.1994.1103>
- Wallukat, G., Botoni, F.A., Rocha, M.O. da C., Louise, V., Müller, J., Talvani, A., 2022. Functional antibodies against G-protein coupled receptors in Beagle dogs infected with two different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Immunol.* 13, 926682. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.926682>
- Wang, M., Claesson, M.H., n.d. Classification of Human Leukocyte Antigen (HLA) Supertypes. *Methods in Molecular Biology.* [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_17)
- Wang, W., Peng, D., Baptista, R.P., Li, Y., Kissinger, J.C., Tarleton, R.L., 1 2021. Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLoS Pathog.* 17. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009254>
- Weatherly, D.B., Peng, D., Tarleton, R.L., 2016. Recombination-driven generation of the largest pathogen repository of antigen variants in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3037-z>
- Westenberger, S.J., Barnabé, C., Campbell, D.A., Sturm, N.R., 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171, 527–

543. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.038745>
- Wilkinson, S.R., Taylor, M.C., Horn, D., Kelly, J.M., Cheeseman, I., 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5022–5027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>
- Yan, H., 2013. Salivary IgA enhancement strategy for development of a nasal-spray anti-caries mucosal vaccine. *Sci. China Life Sci.* 56, 406–413. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4473-5>
- Yoshida, N., 2009. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 101–107. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900015>
- Yoshida, N., 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol. Int.* 57, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.12.008>
- Yoshida, N., Araya, J.E., da Silveira, J.F., Giorgio, S., 1993. *Trypanosoma cruzi*: antibody production and T cell response induced by stage-specific surface glycoproteins purified from metacyclic trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 77, 405–413. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1100>
- Yoshida, N., Tyler, K.M., Llewellyn, M.S., 2011. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 27, 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.06.006>
- Zamboni, D.S., Lima-Junior, D.S., 2015. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunol. Rev.* 265, 156–171. <https://doi.org/10.1111/imr.12291>
- Zhang, L., Tarleton, R.L., 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180, 480–486. <https://doi.org/10.1086/314889>
- Zhao, J., Zhao, J., Fett, C., Trandem, K., Fleming, E., Perlman, S., 2011. IFN- $\gamma$ - and IL-10-expressing virus epitope-specific Foxp3(+) T reg cells in the central nervous system during encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 208, 1571–1577. <https://doi.org/10.1084/jem.20110236>
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>
- Zuercher, A.W., Cebra, J.J., 2002. Structural and functional differences between putative mucosal inductive sites of the rat. *Eur. J. Immunol.* 32, 3191–3196. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200211\)32:11<3191::AID-IMMU3191>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200211)32:11<3191::AID-IMMU3191>3.0.CO;2-0)