



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE ROSARIO**



GMD Facultad Cs. Médicas  
Biblioteca  
TDM 2653

**CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“Aspectos inmuno-endócrinos que afectan la  
respuesta vacunal a antígenos de *T. cruzi*”**

**CAMILA BULFONI BALBI**

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

**Directora: Ana Rosa Pérez  
Co-director: Gabriel Cabrera**

Lugar de realización:

CONICET



I D I C E R

**2025**

# AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino, muchas personas me han acompañado y brindado su apoyo incondicional, por lo que me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a mi grupo de trabajo, el “Chagas Team”. A Flopy, Bren y Flor, por su paciencia, colaboración, por los debates que nos llevaron a aprender mutuamente, y por el entusiasmo compartido en cada etapa del proyecto. A mi directora Ana, por su paciencia, sabiduría y guía constante, que han sido clave para superar cada desafío. A todo el equipo de Box II y a Ceci, que convierten cada día en una experiencia más divertida y agradable, especialmente con su deliciosa comida y su apoyo incondicional en todos los sentidos. ¡Gracias por hacer cada momento especial!

A mi codirector, Gabi, por su inestimable ayuda y buena predisposición en cada consulta durante esta etapa de constante aprendizaje. A los Dres. Rodolfo Leiva y Eduardo Roggero, por su valiosa colaboración en mi tesis, y por compartir generosamente sus conocimientos y brindar su apoyo en sus respectivos campos de especialización, siempre con un alto nivel de profesionalismo.

A mi familia, por ser mi pilar en todo momento. A mis papás, por su amor inagotable, por creer en mí incluso en los momentos de duda, y por enseñarme que con esfuerzo y dedicación todo es posible. A mis abuelos que son ejemplo de amor y compañía para toda la vida. A mis hermanos, por su apoyo, por las palabras de aliento y por estar siempre a mi lado. Y a mis sobrinos, por la recarga con buena energía cada vez que vuelvo a mi pueblo y por enseñarme lo que es el amor más puro.

A Juani, por su compañía y apoyo todos los días, por su confianza en mí y aliento cuando más los necesitaba, y por compartir conmigo este viaje, brindándome su amor y su paciencia.

A mis amigas de la facu, por entenderme realmente, por estar siempre ahí para escucharme, por las risas, las distracciones necesarias y por acompañarme tanto en los buenos como en los no tan buenos momentos. Su amistad ha sido fundamental en esta etapa de mi vida.

A todos ustedes, les agradezco desde lo más profundo de mi corazón. Este logro es tanto mío como suyo.

# PUBLICACIONES

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

- ***Sexual Dimorphism-Driven Differences are Overcome in a Preclinical Vaccine Model against Trypanosoma cruzi*** Bulfony Balbi Camila, Florencia Pacini, Brenda Dinatale, Cecilia Farré, Florencia Gonzalez, Iván Marcipar, Gabriel Cabrera, Ana Rosa Pérez (*manuscrito enviado, en revisión*).
- ***Intranasal Trans-sialidase vaccine mitigates acute and chronic pathology in a preclinical oral Chagas disease model*** Pacini M.F., Bulfony Balbi C., Dinatale B., Farré C., Cacik P., González F.B., Marcipar I., and Perez A.R. Vaccines, 2024. doi: 10.3390/vaccines12101171
- ***The high identity of the Trypanosoma cruzi Group-I of Trans-sialidases points them as promising vaccine immunogens*** Pacini M.F., Perdomini A., Bulfony Balbi C., Dinatale B., Herrera F.E., Perez A.R. and Marcipar I. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2023. doi: 10.1002/prot.26537
- ***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., Bulfony 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., Bulfony 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. Bulfony 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.

# PRESENTACIONES A CONGRESOS (Periodo 2022-2024)

1. ***Impact of Sex Hormones on Immune Response and Myeloid-Derived Suppressor Cell Modulation in A Trans-Sialidase Vaccine for Chagas Disease*** - "14th Latin American and Caribbean Congress of Immunology". Buenos Aires, Argentina – Buenos Aires, noviembre 4-8, 2024 (Poster). Bulfony Balbi, C; Pacini, Ma. F; Dinatale, B; Gonzalez F; Prochetto, E; Farré, C; Chapo G; Marcipar I; Cabrera, G; Pérez, AR. DOI: 10.35537/10915/173621.
2. ***Impacto del dimorfismo sexual en la respuesta humoral de una vacuna experimental contra Trypanosoma cruzi*** - "XXV Congreso and XLIII Reunión Anual de la SBR". Rosario, Diciembre, 4-5, 2023 (Poster) Mancini, L; Bulfony Balbi, C; Dinatale, B; Gonzalez, F; Farré, C; Pacini, Ma. F; Pérez, AR. ISSN: 2314-1484.
3. ***Immuno-endocrine aspects influencing the vaccine response to T. cruzi antigens*** - "VI Meeting on Thymus Transcriptome and Cell Biology". Rio de Janeiro-Brasil, Noviembre, 27-28, 2023 (Comunicación oral). Bulfony Balbi, C; Pacini, Ma. F; Dinatale, B; Gonzalez, F; Farré, C; Prochetto, E; Cabrera, G; Pérez, AR. ISBN: 978-987-733-386-2
4. ***Sexual hormone effects upon experimental vaccination process against T. cruzi*** - "XLXXI Reunión Anual de la SAI". San Luis, Noviembre 9-11, 2023 (Poster). Bulfony Balbi C, Pacini MF, Dinatale B, González F, Derio M, Farré C, Prochetto E, Chapo G, Marcipar I, Cabrera G, Perez AR. ISBN: 978-987-733-386-2
5. ***Anti-Trypanosoma cruzi prophylactic vaccine decreases heart tissue damage and improves cardiac function in mice*** - "XLXXI Reunión Anual de la SAI". San Luis, Noviembre 9-11, 2023 (Poster). Pacini MF, Bulfony Balbi C, Dinatale B, González F, Farré C, Chapo G, Bottasso O, Cacik PI, Prochetto E, Marcipar I, Perez AR. ISBN: 978-987-733-386-2
6. ***Mucosal vaccine based on trans-sialidase protects against acute and chronic damage after oral infection with Trypanosoma cruzi*** - "Joint Meeting SAIC SAI&FAIC SAFIS 2022". Mar del Plata, 16-19 de noviembre, 2022 (Poster). Pacini MF, Bulfony Balbi C, Dinatale B, González F, Farré C, Chapo G, Bottasso O, Cacik PI, Prochetto E, Marcipar I, Perez AR. PMID: 36368022.
7. ***Innate immunity against Trypanosoma cruzi in immunized animals is affected by sexual dimorphism*** - "Joint Meeting SAIC SAI&FAIC SAFIS 2022". Mar del Plata, 16-19 de noviembre, 2022 (Poster). Bulfony Balbi C, Pacini MF, Dinatale B, González F, Borgna E, Prochetto E, Farré C, Chapo G, Marcipar I, Cabrera G, Perez AR. PMID: 36368022.

8. ***Caracterización del perfil de citoquinas en el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT) después de la inmunización intranasal y después del desafío oral con Trypanosoma cruzi*** - "XXIV Congreso y XLII Reunión Anual de la SBR". Rosario, 1 y 2 de diciembre, 2022 (Poster). Pacini MF, Bulfony Balbi C, Dinatale B, González F, Farré C, Chapo G, Derio M, Cacik PI, Prochetto E, Marcipar I, Perez AR. ISSN: 2314-1484
9. ***Evaluación del rol de la testosterona en el proceso vacunal contra Trypanosoma cruzi*** - "XXIV Congreso y XLII Reunión Anual de la SBR". Rosario, 1 y 2 de diciembre, 2022 (Poster). Bulfony Balbi C, Pacini MF, Dinatale B, González F, Sesma J, Derio M, Prochetto E, Farré C, Chapo G, Marcipar I, Cabrera G, Perez AR. ISSN: 2314-1484
10. ***Vacuna profiláctica basada en un fragmento Nt de la transialidasa induce inmunidad protectora después de la infección oral contra T. cruzi y reduce el impacto a nivel del miocardio durante la fase crónica*** - XI Congreso SAP 2022". Mendoza, 16-18, marzo 2022 (Comunicación Oral). Bulfony Balbi C, Pacini MF, Dinatale B, González F, Villar S, Prochetto E, Farré C, Chapo G, Marcipar I, Cabrera G, Perez AR.
11. ***The role of testosterone in the vaccination process against T. cruzi*** - "II Jornada INCT-NIM". Rio de Janeiro - Brasil, Noviembre, 2022 (Poster). Bulfony Balbi C, Pacini MF, Dinatale B, González F, Prochetto E, Farré C, Chapo G, Marcipar I, Cabrera G, Pérez AR.
12. ***Estudio in silico de la diversidad de la familia Trans-sialidasa utilizada en vacunas experimentales contra T. cruzi y su potencial utilidad en vacunas humanas*** - "XXXIII REUNIÓN ANUAL DE LA SAP". Buenos Aires, 9 y 10 de noviembre, 2022 (Poster). Pacini MF, Perdomini A, Bulfony Balbi C, Dinatale B, González F, Pérez AR, Marcipar I.
13. ***Evaluación del uso terapéutico de una vacuna nasal administrada a ratones crónicamente infectados con Trypanosoma cruzi*** - "XXXIII REUNIÓN ANUAL DE LA SAP". Buenos Aires, 9 y 10 de noviembre, 2022 (Poster). Cacik P, Prochetto E, Pacini MF, Bulfony Balbi C, Dinatale B, Bontempi I, Cabrera G, Pérez AR, Marcipar I.

# Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS .....	1
PUBLICACIONES .....	2
PRESENTACIONES A CONGRESOS (Periodo 2022-2024) .....	3
ABREVIATURAS .....	7
1. RESUMEN.....	11
2. INTRODUCCIÓN.....	13
2.1 Generalidades sobre la Enfermedad de Chagas .....	13
2.2 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas .....	14
2.3 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	18
2.4 Respuesta inmune contra <i>T. cruzi</i> .....	19
2.5 Mecanismos reguladores de la respuesta inmune .....	26
2.6 Dimorfismo sexual .....	34
2.7 Vacunas contra la Enfermedad de Chagas.....	35
2.7.1 Transialidasa como antígeno vacunal .....	38
2.7.2 Adyuvantes .....	41
2.7.3 Estudios preliminares de nuestro grupo sobre una vacuna de administración mucosal .....	43
2.7.4 Sistema inmune de mucosas .....	44
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivo general .....	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	50
4.1 Expresión y purificación del fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la Transialidasa .....	50
4.2 Adyuvante .....	50
4.3 Animales de experimentación .....	50
4.4 Orquiectomía .....	51
4.5 Diseño experimental .....	51
4.6 Protocolo de inmunización .....	52
4.7 Evaluación de la inmunogenicidad .....	53
4.8 Evaluación de la eficacia protectora.....	56
4.9 Análisis estadístico.....	63
5. RESULTADOS.....	64
<b>5.1 CAPÍTULO I</b> .....	64
5.1.1 Dimorfismo sexual e Inmunogenicidad .....	64
5.1.3 Dimorfismo y Eficacia protectora vacunal.....	69

<b>5.2 CAPÍTULO II</b> .....	85
5.2.1 Rol de la testosterona sobre la protección vacunal .....	85
5.2.2 Rol de la testosterona sobre la protección vacunal .....	89
<b>5.3 CAPÍTULO III</b> .....	94
5.3.1 Células supresoras de origen mieloide en animales de ambos sexos vacunados e infectados .....	94
5.3.2 Frecuencia de células T reguladoras en animales de ambos sexos vacunados e infectados .....	98
5.3.3 Efecto de la castración sobre ambas poblaciones reguladoras durante el curso de la infección.....	99
6. DISCUSIÓN.....	101
7. BIBLIOGRAFÍA.....	108

# ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
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> )
BSA	Albúmina sérica bovina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CBA	Matriz de microesferas citométricas (del inglés <i>Cytometric Bead Array</i> )
CDs	Células dendríticas
cGAS	GMP-AMP sintasa cíclica (del inglés <i>Cyclic GMP-AMP Synthase</i> )
CK-MB	Creatina Quinasa MB
CPAs	Células Presentadoras de Antígenos
CPK	Creatinfosfoquinasa
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DHT	Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada (del inglés <i>Delayed-type Hypersensitivity Test</i> )
di-AMP-c	Monofosfato de adenosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico
DTU	Unidad discreta de tipificación (del inglés <i>Discrete Typing Unit</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2	Estradiol
ECG	Electrocardiograma
ECh	Enfermedad de Chagas
ECLIA	Electroquimioluminiscencia
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
ER	Receptor de estrógeno
F	Hembras (del inglés <i>Female</i> )
Fc	Frecuencia cardíaca

GALT	Tejido linfoide asociado al tubo digestivo (del inglés <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> )
GC	Glucocorticoides
G-MDSC	Células supresoras de origen mieloide granulocíticas (del inglés <i>Granulocytic Myeloid-derived suppressor cells</i> )
GOT	Glutamato Oxalacetato Transaminasa
GPT	Glutamato Piruvato Transaminasa
GR	Receptor de Glucocorticoides
Gx	Machos gonadectomizados
HEPA	Filtros de aire de alto rendimiento (del inglés <i>High efficiency particulate air</i> )
HPA	Hipotálamo-Pituitario-Adrenal
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
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 Complex</i> )
ISPA	Partículas inmunoestimulantes (del inglés <i>Immunostimulant Particles</i> )
iTRegs	Linfocitos T reguladores inducidos
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LPS	Lipopolisacárido
M	Machos (del inglés <i>Male</i> )
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés <i>Mucosal-Associated Lymphoid Tissue</i> )
MCC	Miocarditis chagásica crónica
MDSC	Células supresoras de origen mieloide (del inglés <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> )
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>Major histocompatibility complex</i> )
M-MDSC	Células supresoras de origen mieloide monocíticas (del inglés <i>Monocytic Myeloid-derived suppressor cells</i> )
Ms	Machos Sham
NALT	Tejido linfoide asociado a la nasofaringe (del inglés <i>Nasal-Associated Lymphoid Tissue</i> )
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> )
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (del inglés <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
PBS	Solución salina tamponada 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 cuantitativa 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 cuantitativa 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> )
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de simple hebra (del inglés <i>single-stranded DNA</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> )
Teff	Linfocitos T efector
Tfh	Linfocitos T foliculares colaboradores
TGF-β	Factor de crecimiento transformante 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> )

T <sub>MEM</sub>	Células T de memoria convencionales
TNFR	Receptor de TNF (del inglés <i>Receptor Tumour Necrosis Factor</i> )
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés <i>Tumour Necrosis Factor alpha</i> )
Tr1	Células Treg inducibles
Treg	Linfocitos T reguladores (del inglés <i>regulatory T lymphocytes</i> )
TS	Transialidasa (del inglés <i>Trans-sialidase</i> )
TS-GI	Transialidasa del Grupo I
Tvm	Células T de memoria virtuales (del inglés <i>Virtual memory T cells</i> )
vs.	versus

# 1.RESUMEN

Actualmente no existen vacunas disponibles para prevenir la Enfermedad de Chagas (ECh), una parasitosis de gran importancia en América Latina cuyo agente etiológico es el parásito *Trypanosoma cruzi*. En las primeras etapas preclínicas, las pruebas de inmunogenicidad y eficacia de distintas vacunas se realizan mayoritariamente en animales pequeños de laboratorio susceptibles a la infección que se pretende evitar. En este sentido, distintas cepas de ratones son uno de los modelos más utilizados para estudiar la fisiopatología de la ECh, así como para evaluar distintas formulaciones vacunales. La infección por *T. cruzi* en modelo murino muestra diferencias entre sexos en cuanto a la resistencia a la misma, siendo las hembras capaces de controlar la infección que los machos. A pesar de estas diferencias, los desarrollos e investigaciones preclínicas que involucraron vacunas a menudo se centran predominantemente en hembras, lo que puede introducir sesgos en los resultados obtenidos. Diferentes factores reguladores, tanto extrínsecos como intrínsecos, desempeñarían un papel clave en la modulación de la respuesta inmune y el dimorfismo sexual, influyendo en los resultados globales de la vacunación en ambos sexos.

Nuestro grupo desarrolló una vacuna mucosal experimental denominada TS+A, la cual consiste en un fragmento recombinante de la Transialidasa (TS) formulado con el adyuvante di-AMP-c (TS+A). Esta vacuna se administra por vía intranasal, en tres dosis separadas por dos semanas. Estudios previos mostraron resultados positivos de inmunogenicidad mucosal y sistémica, así como un alto grado de protección en hembras. En este contexto, nos propusimos evaluar el impacto del dimorfismo sexual, la testosterona y las poblaciones reguladoras en la inmunogenicidad y el grado de protección obtenido tras la vacunación de ratones BALB/c de ambos sexos con TS+A. La inmunogenicidad se determinó en función del nivel de anticuerpos y de la respuesta celular específica contra TS. El nivel de protección se evaluó mediante la carga parasitaria, el curso clínico de la infección y el grado de daño en tejidos diana de la infección, como el miocardio. Para analizar el papel de la testosterona, se

inmunizaron machos gonadectomizados (Gx) u operados de forma simulada. Asimismo, se evaluaron poblaciones supresoras innatas y adaptativas, es decir, células supresoras de origen mioide (MDSCs) y linfocitos T reguladores (Tregs).

Globalmente, los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la vacuna TS+A indujo una respuesta inmunogénica robusta en ambos sexos, aunque se observaron diferencias claras asociadas al dimorfismo sexual. Las hembras vacunadas con TS+A exhibieron niveles más elevados de IgG2a, IgG1, IL-17 e IFN- $\gamma$ , mientras que los machos presentaron una mayor respuesta de hipersensibilización retardada y una mayor proliferación de linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>. A pesar de las diferencias evidentes entre hembras y machos durante el curso de la infección, la vacuna en ambos sexos redujo significativamente la carga parasitaria tisular, evitó la disminución de las Tregs y el incremento de las MDSCs en el bazo, mejoró el curso clínico de la infección, atenuó la miocarditis aguda y crónica, y optimizó los parámetros electrocardiográficos. Los resultados también demostraron que la testosterona influye en la inmunogenicidad y en la eficacia de la vacuna en los ratones macho. Los ratones Gx vacunados con TS+A mostraron niveles superiores de IL-17, pero menor proliferación de linfocitos CD4<sup>+</sup> y una reducción en el control de la carga parasitaria. Además, los animales Gx-TS+A vacunados tendieron a aumentar las MDSCs esplénicas y reducir significativamente las Tregs esplénicas, disminuyendo la relación Tregs/Teff.

En conclusión, la vacuna TS+A demostró ser altamente eficaz y brindar protección en ambos sexos, independientemente de las diferencias observadas en términos de inmunogenicidad. Estos hallazgos resaltan el potencial clínico de un prototipo vacunal mucosal contra la enfermedad de Chagas, con capacidad de inducir una inmunidad efectiva independientemente del sexo.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Generalidades sobre la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas (ECh), también llamada Tripanosomiasis americana, es una enfermedad causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, el mismo que también fue capaz de identificar tanto al agente causal como al vector (Coura & Borges-Pereira, 2010).

La ECh ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida, lo que implica la necesidad urgente de realizar esfuerzos concertados para el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas, de diagnóstico, y/o de tratamiento. Se estima que esta enfermedad afecta entre 6 y 7 millones de personas en todo el mundo y provoca al menos 12.000 muertes cada año, principalmente en comunidades de bajos recursos, mientras que alrededor de 70 millones corren aún riesgo de infectarse (Chagas Disease - PAHO/WHO, 2021). Históricamente, la ECh estuvo confinada a América Latina, sin embargo, en la actualidad se convirtió en un grave problema de salud pública en Estados Unidos y varios países europeos y asiáticos, debido a las corrientes emigratorias (Chagas Disease - PAHO/WHO, 2021).

La ECh se transmite por diferentes vías como son la vectorial, la congénita, por transfusión de sangre y trasplante de órganos provenientes de personas infectadas, por accidentes de laboratorio o bien, debido a la ingesta de alimento contaminado. Esta última vía de transmisión, también conocida como infección oral, ha emergido en la última década con brotes de alta letalidad en diversas zonas tropicales y subtropicales de América del Sur (Altcheh & Freilij, 2019; OPS/OMS, 2009; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Silva-dos-Santos *et al.*, 2017). Además de la vía de transmisión, las tasas de mortalidad también dependen del estado clínico de los pacientes y del tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad y el inicio del tratamiento. La transmisión oral conlleva una tasa de mortalidad

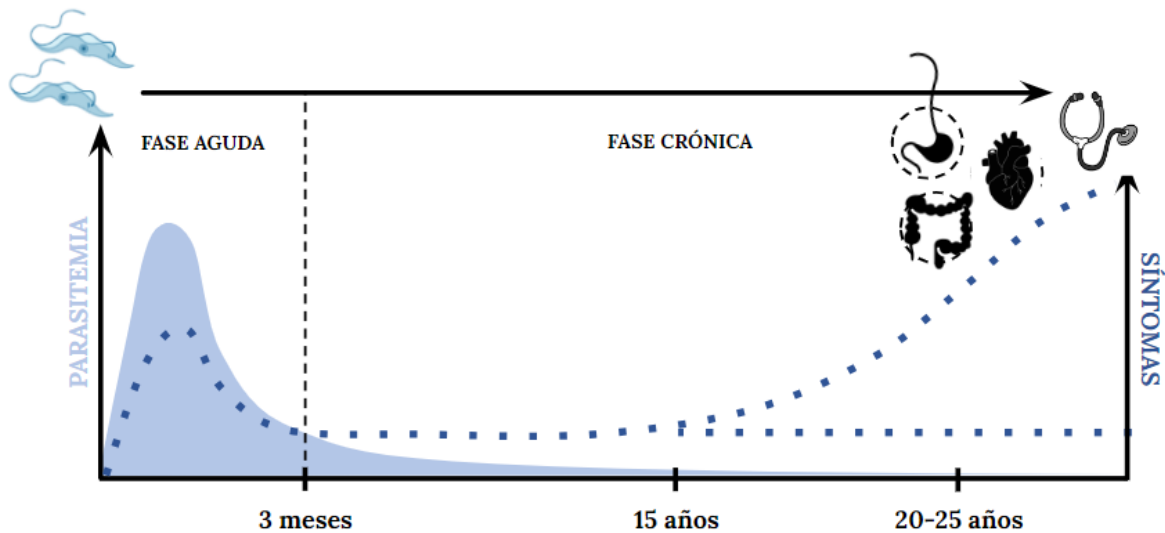
más alta, estimada entre el 8% y el 35%, en comparación con la infección clásica transmitida por vectores, cuya mortalidad es inferior al 5–10% (de Noya *et al.*, 2015; Robertson *et al.*, 2024).

Como tratamiento de la ECh, se administran Nifurtimox o Benznidazol, drogas desarrolladas hace prácticamente 70 años. Estos medicamentos presentan una eficacia alta durante la fase aguda, pero limitada durante la fase crónica, y a menudo, inducen efectos secundarios graves que pueden llevar a la interrupción del tratamiento. Por otra parte, los métodos preventivos se focalizan en el control de vectores, el *screening* en bancos de sangre y el control prenatal. Cabe destacar que, a pesar de los numerosos esfuerzos realizados desde el descubrimiento de la ECh, aún no se han desarrollado vacunas profilácticas ni terapéuticas capaces de controlar la infección causada por *T. cruzi* (Dumonteil and Herrera, 2021; Farani, Jones and Poveda, 2024; Pinazo *et al.*, 2024).

Existen diferentes estudios preclínicos sobre el desarrollo de vacunas basadas en un antígeno inmunodominante del parásito denominado Transialidasa (TS). Estos estudios han mostrado resultados promisorios en términos de inmunogenicidad y eficacia protectora (Gamba *et al.*, 2021; Pacini *et al.*, 2022; Pacini, *et al.*, 2023; Pacini *et al.*, 2024; Prochetto, *et al.*, 2022). A pesar de ello, hasta el momento no se ha logrado la inmunidad esterilizante y muchos de los mecanismos inmunoreguladores desencadenados o modulados por estos prototipos vacunales siguen siendo desconocidos. Cabe destacar que la respuesta inmune desencadenada tras la administración de la vacuna está influenciada por diversos factores, entre los cuales los sistemas contrarreguladores intrínsecos y extrínsecos podrían impactar tanto en la inmunogenicidad como en la eficacia de la protección.

## 2.2 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas

En la ECh se distinguen dos fases: una fase aguda y una crónica, ambas con sintomatología diversa y con diferente grado de compromiso tisular (Fig. 1).



**Figura 1: Evolución de la Enfermedad de Chagas.** Adaptado de De Bona et al., 2018 (De Bona et al., 2018).

Luego de la primoinfección, comienza la fase aguda de la ECh. Esta fase suele durar en seres humanos alrededor de 2-3 meses, periodo en el cual la parasitemia (es decir la presencia del parásito en sangre) se evidencia por métodos directos.

Si la infección ocurrió por vía vectorial, la fase aguda de la ECh se caracteriza por ser asintomática en la mayoría de los casos y, sólo entre un 5 y 10% de los individuos infectados desarrollan síntomas, generalmente inespecíficos como fiebre, astenia y cefalea, a la vez que suele cursar con hepato y esplenomegalia. Los signos patognomónicos más frecuentes de la ECh aguda vectorial son el signo de Romaña, caracterizado por un 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 et al., 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 probablemente también a una mayor eficacia de los parásitos para penetrar la mucosa gástrica y acceder a la circulación sistémica (de Noya and González, 2015).

Cuando el parásito se vuelve indetectable en sangre mediante métodos directos, comienza la fase crónica de la enfermedad. A su vez, esta fase se subclasifica en una conocida como “sin patología demostrada o indeterminada”, y en una fase sintomática.

La fase “sin patología demostrada” se caracteriza por ser clínicamente asintomática y presentar electrocardiograma (ECG) y radiografía de tórax y vísceras normales. En esta etapa, el método de diagnóstico es serológico, y para confirmar un caso positivo se 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 manometría esofágica), es posible diagnosticar en estos pacientes asintomáticos sutiles anomalías cardíacas o digestivas, lo cual obliga a reclasificarlos.

Los individuos infectados pueden permanecer asintomáticos o sin patología demostrada toda su vida. Sin embargo, luego de un período que normalmente varía entre 10 a 30 años, alrededor de un 30% de los individuos infectados desarrollan Miocardiopatía Chagásica Crónica (MCC); y en menor medida, pueden desarrollar megavísceras (megaesófago y megacolon) (Carod-Artal and Gascon, 2010).

La MCC es sin dudas la manifestación más grave y frecuente de la ECh crónica, lo que podría deberse al particular tropismo que *T. cruzi* suele mostrar por los miocardiocitos (Fernandes and Andrews, 2012). La mayoría de los individuos con MCC, presentan corazones que suelen estar aumentados de tamaño (“*core bovis*”). Además, se observa un

adelgazamiento anómalo de la pared ventricular, que protruye en algunos casos formando un aneurisma. La evaluación microscópica de estas áreas revela una atrofia significativa, caracterizada por la pérdida de fibras miocárdicas y su sustitución por tejido cicatricial fibroso denso, acompañado de infiltración grasa entre el endocardio y el epicardio (Bonney *et al.*, 2019). Estas alteraciones pueden generar anomalías en el sistema de conducción, bradiarritmias, taquiarritmias, aneurismas apicales, insuficiencia cardíaca, eventos tromboembólicos y muerte súbita. Las anomalías en el ECG más comunes son el bloqueo de rama derecha, el bloqueo fascicular anterior izquierdo, los latidos ventriculares prematuros, los cambios en los segmentos ST-T, las ondas Q anormales y el bajo voltaje del segmento QRS. La combinación de bloqueo de rama derecha y bloqueo fascicular anterior izquierdo es muy típica en la MCC (Rassi, Rassi and Little, 2000; Rassi, Rassi and Marin-Neto, 2010).

El tejido cardíaco también sufre fibrosis debido al aumento gradual y significativo de las fibras de colágeno. Dicho tejido cicatricial es capaz de afectar intensamente la función cardíaca (Salazar-Schettino *et al.*, 2016). La remodelación por fibrosis (fundamentalmente mediada por fibroblastos) 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 (Fan *et al.*, 2012; De Alba-Alvarado *et al.*, 2020, 2023). En la fase aguda, la presencia de infiltrados inflamatorios enriquecidos en macrófagos, polimorfonucleares, y eventualmente, linfocitos, a nivel cardíaco, causa un extenso daño tisular (Melo, 2008), mientras que, en la fase crónica, puede desarrollarse hipertrofia cardíaca con infiltrados predominantemente linfocitarios (Talvani *et al.*, 2000; Moreno-Medina, Valerio-Campos and Goyenaga-Castro, 2007; Talvani, 2011; Bonney *et al.*, 2019).

Además del tejido cardíaco, *T. cruzi* es capaz de infectar diferentes tejidos y a su vez, causar patología en otros órganos y tejidos, como el tracto gastrointestinal, el bazo, el hígado, e incluso el tejido nervioso. Este tropismo, y probablemente el desenlace de la enfermedad, dependen en parte de la variabilidad genética del parásito. Existen cepas del parásito que son reticulotrópicas, e decir que prefieren invadir células mononucleares fagocíticas (p. ej.,

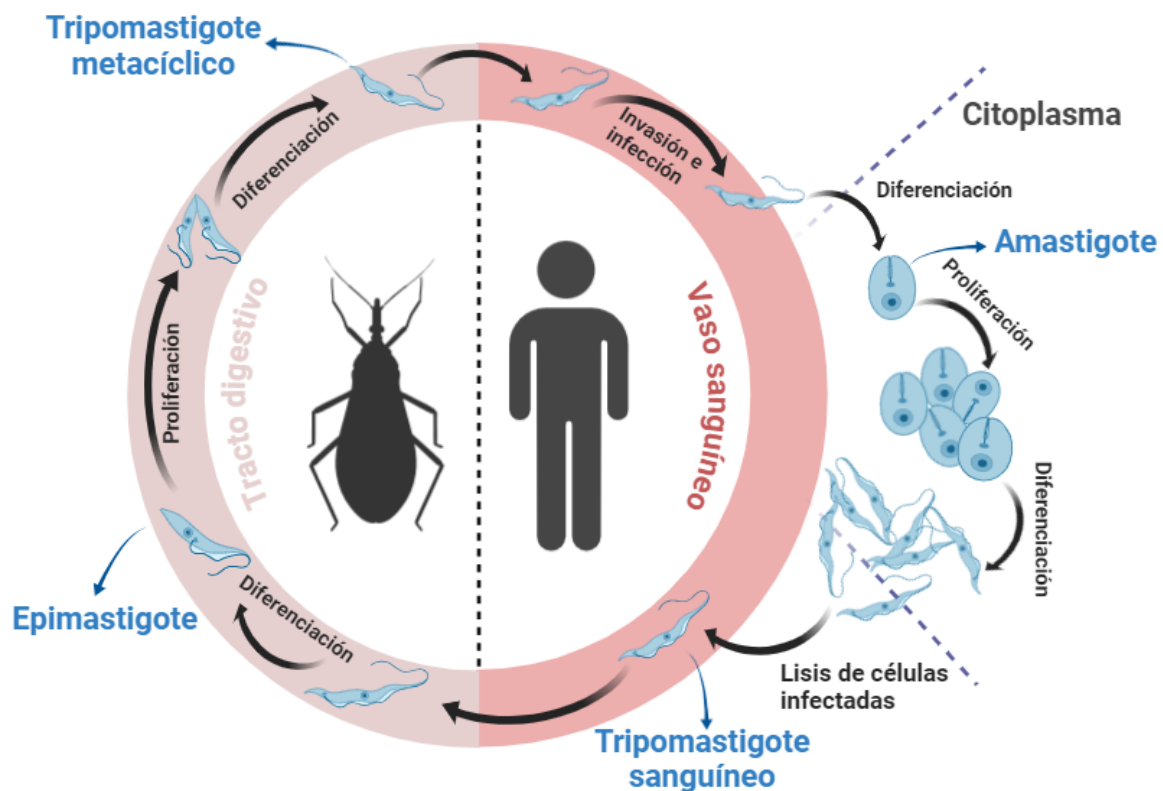
del bazo y del hígado), mientras que las cepas miotrópicas tienden a invadir preferentemente las células musculares (p. ej., del miocardiocitos y músculo esquelético). Solo a modo de ejemplo, y dado que será la cepa utilizada más adelante en nuestros estudios, cabe mencionar que la cepa Tulahuen es considerada reticulotrópica, ya que infecta células de estirpe mieloide en bazo e hígado, e induce esplenomegalia y patología hepática (Ronco *et al.*, 2010; Erdmann *et al.*, 2016). Sin embargo, Tulahuen es también capaz de infectar profusamente el tejido muscular esquelético y cardíaco (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015; Pacini *et al.*, 2022, 2024).

## 2.3 Ciclo de vida de *T. cruzi*

*T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo, en donde alterna entre un huésped mamífero y un insecto hematófago perteneciente a la subfamilia *Triatominae* (*Hemiptera* y *Reduviidae*), que actúa como vector. *T. cruzi* infecta a más de 150 especies de mamíferos, que incluyen animales domésticos como perros, gatos y cobayos; y mamíferos salvajes como roedores, marsupiales y armadillos, entre otros. Tres de las especies de vectores más importantes que infectan al hombre son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (Rassi, Rassi and Marin-Neto, 2010).

El ciclo de vida de *T. cruzi* se describe en la Fig. 2. Este comienza cuando el insecto pica a un vertebrado infectado e ingiere sangre que contiene tripomastigotes circulantes o sanguíneos. Cuando los parásitos se encuentran dentro del tubo digestivo del insecto, se diferencian en epimastigotes, que se multiplican mediante división binaria (forma replicativa en el vector). Luego, estos migran por el tracto digestivo y, en el recto, se adhieren a la cutícula y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, liberándose con las heces cuando el insecto ingiere sangre nuevamente. Luego, los tripomastigotes metacíclicos ingresan al mamífero a través de las mucosas, o bien mediante heridas en la piel que generalmente se producen debido al rascado en la zona de la picadura.

Una vez en el interior del mamífero, los tripomastigotes metacíclicos penetran en las células cercanas al sitio de entrada, y una vez que se encuentran en el citoplasma celular, se diferencian hacia la forma amastigote, proliferan (forma replicativa en el mamífero) y, posteriormente, se diferencian en tripomastigotes sanguíneos. Esta forma del parásito se libera mediante ruptura celular, y es capaz de infectar cualquier célula cercana, migrar a través del torrente sanguíneo para invadir tejidos distantes o ser ingerida nuevamente por un vector, cerrando así el ciclo de vida (*Chagas Disease | Chagas Disease | CDC, n.d.*) (Fig. 2).



**Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** El esquema representa las distintas formas biológicas que adquiere este patógeno a lo largo de su ciclo de vida, que son el epimastigote, el tripomastigote metacíclico (ambas formas presentes en el triatómino), el amastigote y el tripomastigote sanguíneo (en los mamíferos, incluidos los seres humanos). Adaptado de Acevedo 2018 (Acevedo, Girard and Gómez, 2018).

## 2.4 Respuesta inmune contra *T. cruzi*

En los últimos años, ha habido avances significativos en la comprensión de los mecanismos inmunológicos que contribuyen a la resistencia contra *T. cruzi*. Sin embargo, aún

quedan aspectos por esclarecer. Este parásito puede acceder al organismo a través de distintas rutas y asentarse en una variedad de tejidos, lo que implica que su eliminación depende de múltiples mecanismos efectores del sistema inmunitario. Debido a que *T. cruzi* alterna entre formas extracelulares e intracelulares, el control de la infección involucra la participación de diversas células inmunocompetentes.

A continuación, se describen los mecanismos claves que median la respuesta inmune innata y adaptativa frente a *T. cruzi*, resumidos de manera esquemática en la Fig. 3:

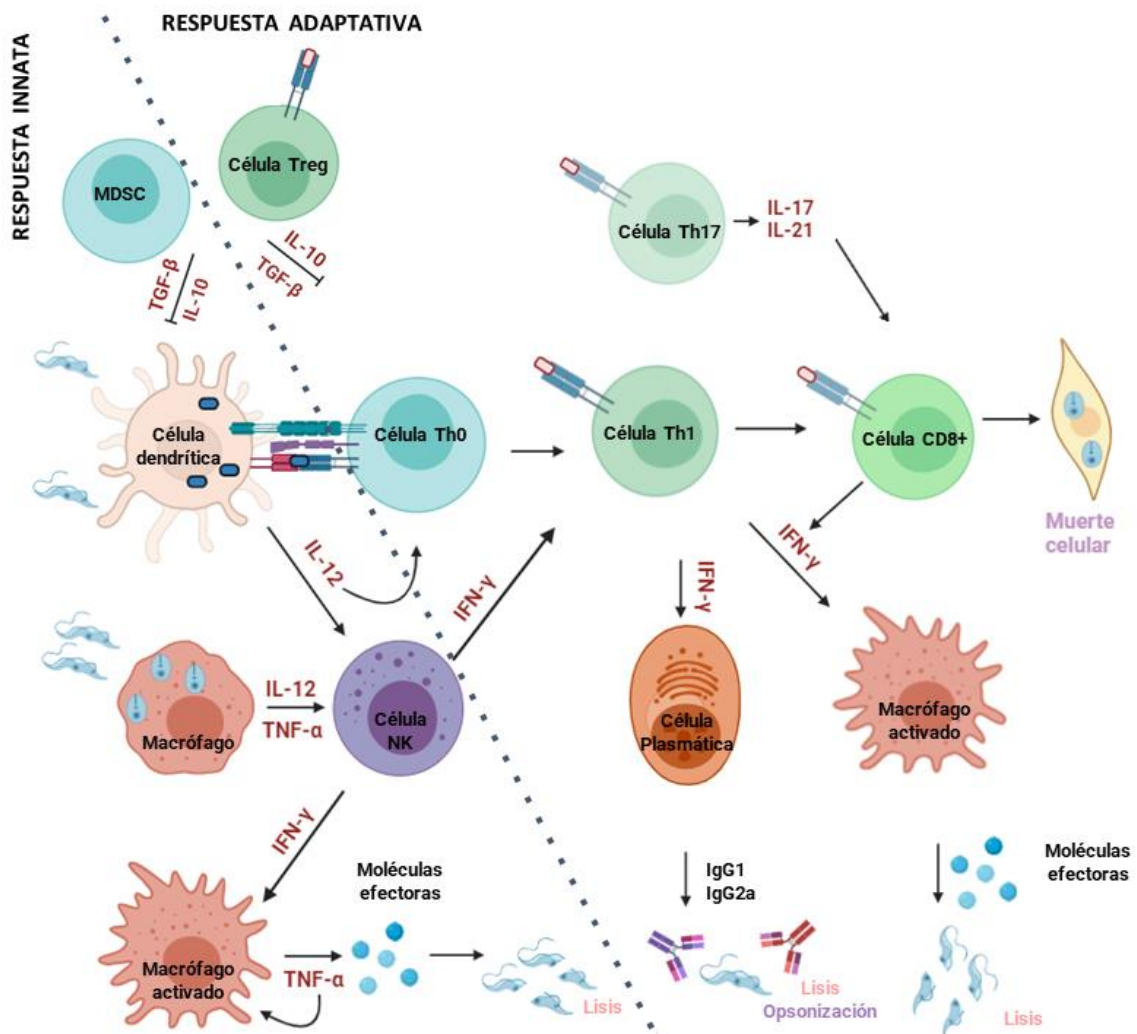


Figura 3: Mecanismos de la respuesta inmune protectora frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Como *T. cruzi* es capaz de replicarse dentro de las células y también circular por fuera de la misma, su control requiere de diferentes poblaciones de células inmunitarias, como macrófagos, células dendríticas (CDs), células asesinas naturales (NK), así como también linfocitos T y B (Kierszenbaum *et al.*, 1974; Kierszenbaum and Howard, 1976; Kierszenbaum and Pienkowski, 1979; Rottenberg *et al.*, 1988). Como se mencionó anteriormente, este parásito puede ingresar al huésped a través de diferentes vías, como la piel o las mucosas, ambas consideradas partes de las barreras físicas de la inmunidad innata. En dichos sitios de ingreso, se encuentran poblaciones de macrófagos, CDs, NKs y poblaciones linfoides innatas, tales como los linfocitos T $\gamma\delta$  de las mucosas (De Meis *et al.*, 2013; de Pinho *et al.*, 2014; Acevedo *et al.*, 2018). Estas poblaciones, en su conjunto, tienen la capacidad de captar el antígeno, generar una respuesta innata local y, al mismo tiempo, desarrollar una respuesta adaptativa, lo que da lugar posteriormente a una respuesta tanto local (en piel o mucosas) como sistémica.

#### 2.4.1 Respuesta inmune innata

En las células innatas, el reconocimiento se lleva a cabo mediante los “receptores de reconocimiento de patrón” (PRR). Estos receptores reconocen 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*.

Por un lado, los TLR de membrana y del compartimento lisosomal, al reconocer ligandos específicos, transmiten señales a través de adaptadores citosólicos como MyD88, lo que activa factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias e interferones de tipo I (IFN-I). Tras la infección por *T. cruzi*, los receptores TLR-2 y TLR-4, así como los TLR-7 y TLR-9, se activan fuertemente. Existen moléculas en la superficie del parásito, como el aquilacilglicerol y los lipofosfoglicanos, que son reconocidas por TLR-2, mientras que los glicoinositolfosfolípidos y glicosilfosfatidilinositoles son

detectados por TLR-2/TLR-4. El ARN parasitario es reconocido por TLR-7 y el ADN por TLR-9 (Rodrigues *et al.*, 2012). Esta activación estimula a macrófagos y CD8 a producir interleucina (IL)-12, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). Los macrófagos activados en un entorno rico en IL-12 e IFN- $\gamma$ , conocidos como “Macrófagos M1”, son cruciales para controlar la infección. Además, se ha observado que la IL-17 potencia la capacidad tripanocida de estos macrófagos en sinergia con IFN- $\gamma$  (Erdmann *et al.*, 2013). Asimismo, la importancia de los TLRs en el control de la infección por *T. cruzi* se evidencia en estudios realizados con ratones deficientes en TLR-2 o TLR-9, ya que estos presentan una reducción en la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$ , un aumento en la parasitemia y una elevada letalidad (Ouassiss *et al.*, 2002; Bafica *et al.*, 2006; Gravina *et al.*, 2013).

Por otro lado, la activación de la vía NLR permite la generación del inflamasoma, que se ensambla en el citoplasma en respuesta a moléculas del patógeno. Se ha reportado que *T. cruzi* activa el inflamasoma NLRP3/ASC/caspasa-1, lo que culmina en la liberación de IL-1 $\beta$  y la muerte celular por piroptosis (Zamboni and Lima-Junior, 2015). Los ratones deficientes en NLR tipo-1 (NOD1) presentan mayor letalidad y carga parasitaria que los *wild type*, aunque la producción de citocinas no se ve afectada, lo que sugiere potenciales interacciones entre las vías NLR y TLR durante el curso de la infección (Silva *et al.*, 2010).

Por otra parte, el ADN parasitario puede ser detectado por sensores intracitoplasmáticos como la cGAS o PARP1, que inducen la síntesis de citocinas pro-inflamatorias mediadas por NF- $\kappa$ B e IRF3. Esta vía también se activa en respuesta a ADN oxidado encapsulado por vesículas extracelulares (Choudhuri & Garg, 2020). A diferencia de TLR-9, que reconoce ssDNA con CpG no metilado, cGAS detecta ADN citosólico y activa el receptor STING en el retículo endoplasmático, llevando a la secreción de IFN- $\beta$ , IL-12 e IL-6 en macrófagos (Vieira *et al.*, 2022). La señalización de la vía STING incrementa la resistencia a la infección, mientras que, por el contrario, ratones deficientes en STING muestran una capacidad limitada para controlar el parásito (Vieira *et al.*, 2022). La IL-12 es un mediador

crucial para la producción innata de IFN- $\gamma$  por las células NK y NKT (Duthie & Kahn, 2005) que, a su vez, actúa potenciando la capacidad fagocítica de macrófagos y CD. Esto en parte se debe a que el IFN- $\gamma$  induce la expresión y actividad de la enzima iNOS (NO sintasa inducible) en los fagocitos, hecho que favorece la citotoxicidad contra *T. cruzi* mediada por NO (Vespa *et al.*, 1994). De hecho, ratones que carecen de IFN- $\gamma$ , iNOS o IL-12 muestran una mayor susceptibilidad a la infección (Torrice *et al.*, 1991; Hölscher *et al.*, 1998; Graefe *et al.*, 2003).

Durante la fase aguda, los macrófagos producen grandes cantidades de TNF- $\alpha$ . Esta citocina actúa como una señal autócrina que lleva a un incremento de la actividad microbicida mediada por IFN- $\gamma$ . La neutralización del TNF- $\alpha$  o el bloqueo de las vías de señalización mediadas por TNFR1 y TNFR2 reduce la producción de NO y disminuye la capacidad tripanolítica del hospedero (Langermans *et al.*, 1992; Muñoz-Fernández *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 2007). Contrariamente, niveles excesivos de TNF- $\alpha$  pueden acelerar la mortalidad en animales infectados, al inducir un cuadro similar al shock endotóxico que causa daño tisular severo (Tracey, M.D and Cerami, Ph.D, 1994; Villar *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014). En etapas más avanzadas de la infección (por ejemplo, en la fase crónica), la producción continua de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por las células inmunes que infiltran los tejidos también contribuye al daño tisular (Lannes-Vieira, 2022; Tracey, M.D & Cerami, Ph.D, 1994).

En paralelo, durante la respuesta innata se producen citocinas anti-inflamatorias, como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF)- $\beta$ , que contrarrestan el exceso de inflamación (Abrahamsohn, 1998). La IL-10 puede ser secretada por macrófagos, neutrófilos y CD4 con perfil regulador, siendo esta citocina esencial para limitar el exceso de inflamación (Abrahamsohn, 1998; Poncini *et al.*, 2010). No obstante, niveles elevados de citocinas anti-inflamatorias pueden aumentar la susceptibilidad a la infección (Reed *et al.*, 1994; Poncini and González-Cappa, 2017). En ciertos contextos, la IL-4 y la IL-13 inducen la activación alternativa de macrófagos, los que adquieren un perfil conocido como "M2". Este perfil promueve la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ , mientras reduce la producción de NO y aumenta la actividad de la arginasa (Stempin *et al.*, 2002). De esta forma, es evidente que el

equilibrio entre citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en la respuesta innata define la posterior respuesta adaptativa y el curso de la infección por *T. cruzi* (Gazzinelli, Ropert and Campos, 2004).

Por último, por varios años se ha investigado el papel del sistema del complemento en la infección por *T. cruzi*. Se ha visto que, los tripomastigotes sanguíneos, los amastigotes y los tripomastigotes metacíclicos resisten la lisis mediada por el complemento; mientras que los epimastigotes, son altamente susceptibles a la lisis mediada por el complemento y la destrucción celular (Lidani *et al.*, 2017). Si bien no desarrollaremos aquí este tipo de respuesta, cabe notar que el parásito ha desarrollado diversos mecanismos de evasión frente a este sistema (Cestari *et al.*, 2013).

#### 2.4.2 Respuesta inmune adaptativa

Una vez fagocitado el parásito, las CDs maduran y migran hacia los órganos linfoides secundarios, donde presentan antígenos a los linfocitos B y T, iniciando la respuesta inmune adaptativa contra *T. cruzi*.

Las CDs presentan antígenos parasitarios a los linfocitos T helper CD4+ vírgenes (Th0), e inducen su diferenciación hacia linfocitos Th1 mediante la secreción de IL-12. Estos linfocitos Th1 secretarán a su vez IL-2 e IFN- $\gamma$ , que tal como se mencionó anteriormente, juegan un papel protector fundamental durante la infección (Torrico *et al.*, 1991; Hoft *et al.*, 2000; Kumar and Tarleton, 2001; Roggero *et al.*, 2002). Cabe remarcar que, aunque las células NK producen IFN- $\gamma$  en la respuesta innata, son los linfocitos Th1 los principales productores de esta citocina durante la fase adaptativa. Esto permite potenciar la activación de macrófagos y amplificar los mecanismos antiparasitarios de la inmunidad innata (Hoft *et al.*, 2000). Además, la IL-2 y el IFN- $\gamma$  favorecen la activación de los linfocitos T CD8+, que ejercen su función citotóxica mediante la secreción de perforina/granzima y la vía Fas-FasL (Martin and Tarleton, 2004). Ratones deficientes en perforina o granzimas A y B muestran una menor tasa de supervivencia, lo que subraya la importancia de estos mecanismos en el control de la infección (Müller *et al.*, 2003). A su vez, los linfocitos T CD8+ también secretan

IFN- $\gamma$ , promoviendo aún más la activación de macrófagos y la eliminación del parásito, si bien su presencia en los sitios de inflamación también puede contribuir al daño tisular, tanto en la fase aguda como en la crónica (Sun and Tarleton, 1993).

Simultáneamente, algunos Th0 se diferenciarán en linfocitos Th2 productores de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, involucradas en la producción de anticuerpos y la regulación de la inflamación (Annunziato and Romagnani, 2009). Una respuesta Th2 predominante suele asociarse con una mayor susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* (Tarleton *et al.*, 2000).

Si bien es indudable que los mecanismos Th1 son esenciales para controlar la infección (Rodrigues *et al.*, 1999; Kumar and Tarleton, 2001; Hoft and Eickhoff, 2005), es también evidente que la cooperación entre las respuestas Th1 y Th2 genera una protección más efectiva contra el parásito (Petray *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1992). A nivel experimental, el balance entre los distintos perfiles Th suele asociarse con la producción de diferentes isotipos de anticuerpos séricos: el perfil Th2 parece promover que las células B produzcan IgG1, mientras que inhibe la síntesis de IgG2a; contrariamente, el perfil Th1 mejora la producción de IgG2a, pero inhibe la producción de IgG1 (Mosmann and Coffman, 1989; Mountford *et al.*, 1994).

En los últimos años, los linfocitos Th17 han captado mayor atención en torno a su papel en el control parasitario. Su desarrollo está regulado por el factor de transcripción maestro ROR- $\gamma$ t y se diferencian a partir de linfocitos Th0 en un microambiente enriquecido en TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23. A su vez, producen IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y la quimiocina CCL20. Cai y col. demostró que la IL-17A promueve la activación de la NADPH oxidasa y, por ende, el estallido respiratorio de los fagocitos. Por otra parte, mediante la liberación de IL-21 también contribuirían a la activación de células T CD8+ (Cai *et al.*, 2016).

## 2.5 Mecanismos reguladores de la respuesta inmune

### 2.5.1 Generalidades

Un desafío crucial para los organismos vivos es mantener la homeostasis. En este contexto, se considera que una respuesta inmune específica y equilibrada es fundamental para eliminar amenazas potenciales y restablecer el estado de homeostasis sin causar daño excesivo a las células y a los tejidos sanos. En este sentido, se han identificado diversos sistemas y poblaciones celulares que desempeñan un papel clave en la preservación de estado de homeostasis inmunológica, algunos de los cuales se mencionan en la Tabla 1. A los fines prácticos, los hemos dividido en mecanismos extrínsecos e intrínsecos a la respuesta inmune.

**Tabla 1.** Mecanismos reguladores de la respuesta inmune.

(HPA: hipotálamo-pituitario-adrenal; GC: Glucocorticoides; MDSC: células supresoras de origen mieloide)

	<b>Factores reguladores</b>	<b>Mecanismo efector</b>
<b>Mecanismos extrínsecos</b>	Eje HPA	Su activación libera GC (inhibe la síntesis de anticuerpos, induce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y genera un sesgo Th1→Th2).
	Hormonas sexuales	En términos generales, los Estrógenos estimulan principalmente la respuesta humoral, mientras que la Testosterona inhibe la respuesta inmunitaria
<b>Mecanismos intrínsecos</b>	Células Tr1	Suprimen la activación de las células T efectoras de una manera dependiente de la citocina IL-10.
	Células Th3	Suprimen la activación de las células T efectoras a través de la producción del TGF-β.
	Células Treg FoxP3+	Inhiben a las células T efectoras ya sea por contacto célula-célula como a través de la producción de IL-10 y TGF-β.
	MDSC	Suprimen células T mediante regulación positiva de iNOS, arginasa y NADPH oxidasa; Producción de ROS. Inducción del desarrollo de <i>novo</i> de células Treg FoxP3+.
	CD8 T <sub>MV</sub>	Presentan características funcionales similares a las células T de memoria (T <sub>MEM</sub> ), ya que responden rápidamente ante la infección.
	Citocinas	IL-4, IL-6 (en ciertos contextos), IL-10, IL-11, IL-13, IL-1RA y TGF-β, que inhiben la respuesta inflamatoria o sesgan la respuesta hacia un perfil Th2

## 2.5.2 Mecanismos Extrínsecos

Entre los componentes regulatorios extrínsecos que pueden influir de diversas maneras en la respuesta inmunitaria se encuentran, entre otros, la activación del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) y del eje gonadal. En el primero, las hormonas glucocorticoides desempeñan un papel central, mientras que, en el segundo, las hormonas sexuales, como los estrógenos y la testosterona, adquieren una relevancia particular.

### 2.5.2.1 Eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal y Glucocorticoides

El eje HPA es un mecanismo neuroendocrino que participa como intermediario en los efectos de los factores estresantes (entre ellos el infeccioso) mediante la regulación del metabolismo, la respuesta inmunitaria y el sistema nervioso autónomo. La activación de este eje en procesos infecciosos, se debe en principio, al incremento de citocinas pro-inflamatorias que se vuelcan a circulación e impactan en el hipotálamo y la pituitaria. A nivel hipotalámico, esto lleva la producción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la que actúa sobre la pituitaria anterior induciendo la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Esta, a su vez, una vez liberada a circulación, estimula la liberación de glucocorticoides (GC) por parte de la glándula suprarrenal (Papadimitriou and Priftis, 2009). Los GCs cerrarán el circuito inhibiendo la producción de citocinas inflamatorias, apagando la respuesta inmune (Rocamora-Reverte *et al.*, 2022).

En este sentido, se sabe que la infección por *T. cruzi* es capaz de inducir la activación del eje HPA. Se ha probado que, en modelos animales de la infección, la activación de este eje es inducida por la liberación sistémica de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y la IL-6 (Corrêa-De-Santana *et al.*, 2006; Roggero *et al.*, 2006). Los GC, una vez liberados en cantidades supra-fisiológicas, son capaces de inhibir la respuesta inmune, principalmente la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y de anticuerpos, generando un sesgo Th1 $\rightarrow$ Th2 (Lieberman *et al.*, 2018). Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la activación del eje HPA causa durante la fase aguda -como efecto colateral- una marcada atrofia tímica, la que se revierte parcialmente en la fase crónica (Pérez *et al.*, 2007; Roggero *et al.*, 2006).

### 2.5.2.2 Hormonas sexuales

Se ha establecido que las hormonas sexuales son capaces de controlar y/o modificar la respuesta inmunológica (Klein & Flanagan, 2016). Dentro de los esteroides sexuales se encuentran los estrógenos y los andrógenos, dentro de los cuales el estradiol (E2) y la testosterona son sus principales representantes. Estas hormonas desempeñan un papel crucial en la regulación de distintos fenómenos fisiológicos, y entre ellos la respuesta inmune. Estos varían durante diferentes momentos de la vida, como por ejemplo dentro del ciclo sexual, en el embarazo y postmenopausia (Pillerová *et al.*, 2021). Los receptores de estrógeno (ER) se encuentran presentes en linfocitos, macrófagos y CD4; y existen dos subtipos principales (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ). El ER $\alpha$  predomina en las células T, mientras que el ER $\beta$  en las células B (Phiel *et al.*, 2005). Por otro lado, son capaces de interactuar con diferentes factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B, SP1 y AP-1, lo que permite aumentar su efecto inmunomodulador (Kovats, 2015).

En relación a la respuesta innata, el tratamiento con estradiol E2 aumenta la proporción de neutrófilos en circulación (Jilma *et al.*, 1994) y en tejido pulmonar (Robinson *et al.*, 2014). En relación a las NK, el E2 parece influenciar de manera distinta esta población celular en función del contexto, ya que tanto puede producir un aumento en el número de células que expresan IFN- $\gamma$  (Nakaya *et al.*, 2006), o bien disminuir su capacidad citotóxica con una reducción en la expresión de granzima B y marcadores de activación (Hao *et al.*, 2007). Por otro lado, dosis bajas de E2 mejoran la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF –asi como de TLR-4– por parte de monocitos y macrófagos; mientras que en dosis altas inducen una disminución de las mismas (Bouman *et al.*, 2005; Rettew *et al.*, 2009). La adición de E2 a CD4 plasmocitoides cultivadas *in vitro* facilita la producción de IFN-I vía TLR-7 y 9, y mejora su capacidad de presentación antigénica (Seillet *et al.*, 2012).

Por otra parte, el E2 también afecta a la respuesta adaptativa. Concentraciones bajas de E2 promueven respuestas con un perfil Th1 y potencian la respuesta celular, mientras que concentraciones más altas favorecen un sesgo hacia un perfil Th2 y una respuesta predominantemente humoral (Straub, 2007). La adición de E2 exógeno tiene consecuencias

aún no del todo claras sobre las células T reguladoras (Treg), ya que se ha visto que tanto incrementa (Polanczyk *et al.*, 2004) como disminuye la frecuencia de dicha población celular (Singh and Bischoff, 2021). En relación a las células Th17, se evidenció que en altas dosis E2 es capaz de reducir su producción de IL-17 (Tyagi *et al.*, 2012).

La testosterona es uno de los andrógenos fisiológicamente más relevantes. Esta hormona presenta efectos inmunosupresores que se han relacionado con la disminución de la proliferación y la actividad de células NK (Hou and Wu, 1988; Page *et al.*, 2006), la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NKT, fenómenos que se evitan mediante gonadectomía (Lotter *et al.*, 2013). También está involucrada en la disminución de la expresión de TLR-4 y en una menor producción de TNF, iNOS y NO por parte de macrófagos (Agostino *et al.*, 1999; Rettew *et al.*, 2008). Por otro lado, es capaz de aumentar la síntesis de citocinas regulatorias como IL-10, TGF- $\beta$  (Agostino *et al.*, 1999; Liva and Voskuhl, 2001) y disminuir la síntesis de TNF- $\alpha$  (Malkin *et al.*, 2004).

La testosterona regula la respuesta adaptativa modulando la diferenciación de células T. La castración disminuye los niveles de andrógenos, lo que reduce el umbral de respuesta a IL-12, aumenta la expresión de T-bet y la fosforilación de Stat4, ambos relacionados con la diferenciación hacia un perfil proinflamatorio Th1 (Kissick *et al.*, 2014). Además, promueve la expresión de IL-10, una citocina anti-inflamatoria que favorece la respuesta Th2, y facilita la apoptosis de timocitos al aumentar la expresión de FAS y caspasa-8, modulando el equilibrio Th1/Th2 (Buendía-González & Legorreta-Herrera, 2022). Por otro lado, dicha hormona ayuda a preservar las Tregs, la activación de células T CD8<sup>+</sup> (Page *et al.*, 2006).

En otras palabras, los esteroides sexuales actúan como reguladores fundamentales de la inmunidad, modulando tanto respuestas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias.

### 2.5.3 Mecanismos intrínsecos

Dentro de los mecanismos reguladores intrínsecos, dos componentes celulares importantes son las células supresoras de origen mieloide (MDSC) (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Gabrilovich, 2017) y las Tregs (Sakaguchi *et al.*, 2008). Las primeras tendrían un rol

fundamental en la respuesta innata, mientras que la segunda en la adaptativa. En el contexto de un proceso infeccioso, la respuesta supresora mediada por MDSC y Tregs tiene como objetivo fundamental mantener el equilibrio inmunológico, prevenir la autoinmunidad y restaurar el entorno homeostático (Veglia *et al.*, 2021; Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2023). Si se logra este equilibrio, el huésped puede controlar tanto la patología inducida por el microorganismo como evitar el desarrollo de inmunopatología o contribuir a la cronicidad de la infección.

### 2.5.3.1 Células Supresoras de Origen Mieloide

Las MDSCs representan una población heterogénea e inmadura de origen mieloide con funciones supresoras que se expanden tanto en condiciones patológicas como fisiológicas. Dentro de las condiciones patológicas, se han observado en contextos de inflamación estéril, cáncer o en infecciones agudas y crónicas. En condiciones fisiológicas, están presentes en el embarazo y aumentan con la senescencia (Veglia *et al.*, 2018; Köstlin-Gille and Gille, 2020; Dietz *et al.*, 2021; Veglia *et al.*, 2021; Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2023). También se ha observado su expansión tras la administración de vacunas (Gamba *et al.*, 2021; Prochetto, *et al.*, 2022; Prochetto *et al.*, 2017). Las MDSCs son capaces de suprimir ramas tanto innatas como adaptativas de la respuesta inmune, hecho que puede favorecer la persistencia de los patógenos y aumentar las posibilidades de cronicidad.

En ratones, las MDSCs generalmente se identifican mediante la expresión de los marcadores CD11b y Gr-1. Además, se han descrito dos tipos de linajes en ratones, que caracterizados por su fenotipo se denominan MDSC monocíticas (M-MDSC: CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>/Ly6G<sup>-</sup>) y MDSC granulocíticas (G-MDSC: CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>/Ly6G<sup>low/+</sup>) (Youn *et al.*, 2008; Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Los mecanismos supresores más utilizados por las MDSCs incluyen la producción de citocinas inhibitoras (IL-10 o TGF- $\beta$ ), la producción de NO y ROS, la expresión superficial de moléculas inhibitoras como PD-L1, CTLA-4, CD80 o CD40, y la producción de prostaglandina-E2, entre otras (Veglia *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020).

Se ha reportado que *T. cruzi* puede provocar en ratones un incremento importante de células MDSCs tanto en bazo e hígado como en corazón durante la fase aguda, contribuyendo probablemente al establecimiento de un estado inmunosupresor y a una mayor letalidad (Arocena *et al.*, 2014; Cuervo *et al.*, 2011; Goñi *et al.*, 2002). Según estudios de Cuervo y col., las MDSCs pueden desempeñar un papel dual en la MCC. Así, durante la fase aguda de la infección, las M-MDSCs que infiltran el corazón expresan iNOS y arginasa-I, de forma tal que colaborarían en el control de la carga parasitaria mediante la producción de NO. Sin embargo, esta misma actividad sería perjudicial si se mantiene en el tiempo, ya que provocaría la depleción sistémica de L-Arginina, lo cual lleva a la supresión de la respuesta inmune mediada por linfocitos T. Si bien el mecanismo por el cual esto ocurre no se encuentra bien definido, un estudio en cáncer mostró que la privación de L-arginina induce la acumulación de MDSCs, que inhiben la proliferación de las células T. A su vez, se observó que la inhibición de L-Arginina bloquea la proliferación y la progresión del ciclo celular de las células T, sin provocar su apoptosis ni perjudicar su metabolismo ni la expresión de mediadores de activación temprana (Fletcher *et al.*, 2014).

#### 2.5.3.2 Células T Regulatoras FoxP3+.

La habilidad que presenta el sistema inmunitario para reconocer antígenos propios y extraños, así como para distinguir entre los que son dañinos y los que no lo son, resulta crucial para preservar la homeostasis inmunológica. Es por ello que la falta de tolerancia hacia antígenos propios o bien hacia antígenos inocuos puede provocar el desarrollo de enfermedades autoinmunes o alérgicas, respectivamente.

Las Treg representan otro mecanismo regulatorio importante en el contexto de las infecciones, esenciales para mantener la autotolerancia y regular la magnitud de la respuesta inflamatoria (Sakaguchi *et al.*, 2008). Se caracterizan por la expresión de CD4, CD25<sup>high</sup> (receptor de la cadena  $\alpha$  de la IL-2) y la expresión del factor de transcripción FoxP3 (Goldmann *et al.*, 2024). Las Treg pueden suprimir la activación de los linfocitos T, las NK y de las células presentadoras de antígenos (CPAs) mediante diferentes mecanismos

supresores: 1) Contacto célula-célula, mediado por CTLA-4; 2) Secreción de citocinas anti-inflamatorias, tales como IL-10, TGF- $\beta$  o IL-35; 3) Acción citolítica mediada por granzima B; 4) Captura de mediadores esenciales para otras poblaciones celulares (por ejemplo, IL-2) inhibiendo así su proliferación; 5) Desarrollo de un ambiente inmunosupresor a través de la producción de adenosina (Caridade *et al.*, 2013; Goldmann *et al.*, 2024).

En estudios realizados en ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi*, se demostró que el parásito desencadena una respuesta T efectora (Teff) excesiva, la cual supera la respuesta reguladora mediada por Tregs (González *et al.*, 2015; Araujo Furlan *et al.*, 2018). En este contexto, el patógeno es controlado de manera eficaz, aunque a expensas de un aumento en el daño tisular e, incluso, de una mayor letalidad (Belkaid and Rouse, 2005; González *et al.*, 2015).

Hasta la fecha, la influencia de los mecanismos intrínsecos y extrínsecos sobre las vacunas ha sido poco evaluada. Informes recientes indican que una disminución en la proporción de MDSCs se relaciona con una mejor protección contra diferentes microorganismos (Sui *et al.*, 2014; Prochetto *et al.*, 2017). En cuanto a las células Tregs, se demostró que la depleción de las MDSCs en ratones inmunizados e infectados con *T. cruzi* da como resultado un aumento sorprendente de las Tregs en el bazo (Gamba *et al.*, 2021). Además, también se describió que las vacunas podrían equilibrar la respuesta Teff/Treg, aumentando así la capacidad del sistema inmunológico para hacer frente al parásito (Prochetto *et al.*, 2017; Gamba *et al.*, 2021), pero aún se desconoce el papel exacto de ambas ramas regulatorias (innata y adaptativa) en la eficacia de las vacunas.

#### 2.5.3.3 Otras poblaciones reguladoras

Si bien la mayoría de las Tregs se originan en el timo, existen otras células reguladoras inducibles que se originan en tejidos periféricos, conocidas como células Treg inducibles (Tr1) y las Th3. Las Tr1 se diferencian a partir de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> tras la presentación del antígeno por CDs inmaduras en presencia de citocinas como la IL-10 (Roncarolo and Battaglia, 2007). Se localizan en tejidos inflamados y realizan su función supresora en forma independiente del

antígeno, a través de citocinas supresoras como IL-10 y TGF- $\alpha$  (Roncarolo *et al.*, 2006). Las células Th3 son células productoras de TGF- $\beta$ , y funcionan de manera similar a las Tr1 (Verbsky, 2007). Se las ha descrito en las placas de Peyer y los ganglios mesentéricos y se las considera responsables de los mecanismos de tolerancia oral (MacDonald, 1998).

Las células T $\gamma\delta$  presentan características tanto innatas como adaptativas. Estas células no solo presentan funciones pro-inflamatorias, sino que cada vez hay más pruebas de que también presentan funciones reguladoras. Las células T $\gamma\delta$  podrían diferenciarse hacia un fenotipo supresor en condiciones similares a las requeridas para la generación de Tregs inducidas en la periferia. Estas células fueron descritas con un papel inmunosupresor en contextos de cáncer, embarazo, alergia e inflamación (Peters *et al.*, 2018) y su papel durante los procesos vacunales mucosales es desconocido.

Recientemente se describió en ratones no manipulados, una población de células T CD8<sup>+</sup> características inmunológicas similares a las células T de memoria convencionales (T<sub>MEM</sub>), que podrían responder rápidamente a estímulos innatos o mediados por TCR. Estas células tendrían la capacidad de responder rápidamente como las células T<sub>MEM</sub>, pero sin haber tenido un contacto previo con el antígeno (White *et al.*, 2017), y en base a esto fueron denominadas células de memoria virtual (T<sub>VM</sub>) (Haluszczak *et al.*, 2009). Las T<sub>VM</sub> son también llamadas células T CD8<sup>+</sup> innatas, ya que demuestran una fuerte capacidad citotóxica que sería crítica durante la fase temprana de la respuesta del huésped. El factor de transcripción Helios es necesario para la función reguladora de las T<sub>VM</sub>, mientras que Eomes es esencial para su ubicación folicular; por otro lado, la IL-15 controla su homeostasis y TGF- $\beta$  es necesario para mantener su identidad reguladora (Choi *et al.*, 2024). Esta población fue descrita recientemente en la infección por *T. cruzi*. Dichas células mostraron una mayor producción IFN- $\gamma$ , así como también una capacidad de exportación reducida en dicho contexto infeccioso (Viano *et al.*, 2024).

## 2.6 Dimorfismo sexual

El dimorfismo se define como una característica que puede presentarse en dos formas distintas o transformarse dentro de una misma especie. Dentro de las diferencias más extremas, podemos mencionar al dimorfismo sexual, que son puntualmente los rasgos que difieren entre machos y hembras (Mesnick and Ralls, 2018; Fairbairn and Cox, 2024). El dimorfismo sexual está influenciado por la genética y la expresión de hormonas sexuales dentro de cada especie. Algunos ejemplos de dimorfismo sexual incluyen diferencias en el color del plumaje en las aves, así como variaciones más extremas, como la presencia de órganos o estructuras distintivas (cuernos, antenas, etc.). Todas estas características contribuyen a la supervivencia y adaptación de las especies a lo largo de su evolución.

Tal como se mencionó en el punto anterior, las hormonas sexuales pueden disminuir o mejorar la respuesta inmune, modulando la inmunogenicidad y la inmunocompetencia (Bouman *et al.*, 2005), lo cual influencia diferencialmente la respuesta inmune entre ambos sexos.

En términos generales, el dimorfismo sexual está influenciado principalmente por el E2 y la testosterona. El E2 estimula la respuesta inmune, especialmente la síntesis de anticuerpos. Se considera que esta mayor producción de anticuerpos por parte de las mujeres sería, al menos en parte, la razón por la que tienden a controlar determinadas infecciones de forma más eficaz que los hombres. Por el contrario, la testosterona tiene claros efectos supresores sobre la respuesta inmune (Fish, 2008; Roved *et al.*, 2017; Fischinger *et al.*, 2019). Su impacto en hombres se hace evidente en la respuesta reducida frente a determinadas infecciones y en un diferente desarrollo de la respuesta humoral tras el proceso de vacunación (Cook, 2008). En hombres con bajos niveles de andrógenos se evidencia un incremento en el desarrollo de procesos inflamatorios, incluida enfermedades cardiovasculares y títulos de anticuerpos, situación que se restaura tras la administración de testosterona (Malkin *et al.*, 2004; Bobjer *et al.*, 2013).

Otra serie de estudios muestran que el sexo no solo es un predictor crítico de susceptibilidad a infecciones y enfermedades autoinmunes, sino que también es capaz de influir fuertemente en la respuesta producidas luego del proceso vacunal (Markle & Fish, 2014). En este contexto, cabe remarcar que, sin embargo, las investigaciones experimentales sobre vacunas aún tienden a realizarse con un solo sexo, asumiendo que el sexo opuesto presenta el mismo comportamiento, lo que provoca un sesgo en cuanto a los resultados (Flanagan *et al.*, 2017). Por lo tanto, la inclusión de ambos sexos en los estudios de función inmune, especialmente en términos de respuesta ante la administración de vacunas, se vuelve cada vez más imperativa.

Particularmente en la ECh experimental, se evidencia un claro dimorfismo sexual, ya que las hembras son más resistentes que los machos (Roggero *et al.*, 2016). En machos, mayores niveles de testosterona se relacionan con una mayor mortalidad, inflamación y daño oxidativo debido a la producción de ROS, mientras que las hembras con niveles más altos de E2 presentan una parasitemia más baja y un daño cardíaco menos severo (Reboreda-Hernández *et al.*, 2024). En este mismo contexto, se ha reportado que los pacientes de sexo masculino infectados por *T. cruzi* presentan un mayor riesgo de progresión de la miocarditis (Basquiera *et al.*, 2003). Vale destacar, que a la fecha no se disponen de trabajos que evalúen el efecto del dimorfismo sexual en la respuesta a vacunas experimentales tendientes a evitar la ECh.

## 2.7 Vacunas contra la Enfermedad de Chagas

Los mecanismos de protección inducidos por la vacunación contra una determinada infección se basan en la activación coordinada y secuencial de la respuesta inmune innata y la adaptativa (ya sea celular o humoral). Tras la administración de la vacuna, la estimulación eficiente del sistema inmunitario innato es crucial para inducir respuestas efectivas de linfocitos T y B específicos contra el patógeno. Por lo tanto, la magnitud, las características y funciones de la respuesta de linfocitos T y B determinarán el efecto protector real de las

vacunas. Sin embargo, gran parte de los mecanismos que se ponen en juego tras la vacunación permanecen aún desconocidos o, en el mejor de los casos, han sido caracterizados de manera incompleta, lo que explica por qué, salvo los anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunas antivirales, se dispone de muy pocos correlatos de protección claramente establecidos (Haks *et al.*, 2017).

Aunque los anticuerpos neutralizantes son fundamentales, la evidencia indica que los linfocitos T también desempeñan un papel crucial en la respuesta vacunal. Idealmente, las células T de memoria específicas deberían persistir tras la eliminación del antígeno vacunal para brindar protección duradera contra futuras infecciones (Palatnik-de-sousa & Nico, 2020).

Además, para lograr la eficacia y efectividad de una vacuna, es esencial considerar algunos otros parámetros al momento de diseñar estrategias de vacunación adaptadas a individuos o grupos específicos, como por ejemplo ancianos o niños. Estos parámetros incluirán la edad, el sexo, el estilo de vida, los antecedentes genéticos y las enfermedades preexistentes, como infecciones crónicas, disfunciones metabólicas, alergias, cáncer y autoinmunidad (Riese *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, aún no existe una vacuna disponible para uso en humanos contra la ECh. En este punto, cabe destacar que la mayoría de las vacunas experimentales se han desarrollado de manera empírica, con una comprensión limitada o nula de los mecanismos inmunológicos que inducen la inmunidad protectora (Palatnik-de-sousa & Nico, 2020).

La idea de desarrollar una vacuna contra *T. cruzi* se originó en 1912, cuando Blanchard demostró que los animales que sobrevivían a la fase aguda eran sumamente resistentes a la reinfección con el parásito. Desde entonces, se han explorado diversas estrategias para llevarla a cabo. Las primeras inmunizaciones utilizaron tripanosomas inactivados mediante métodos químicos (como Timerosal y Formalina) y físicos (sonicación, congelado, irradiación). Sin embargo, estos intentos mostraron un bajo grado de protección, posiblemente por la pérdida de epítopes durante la inactivación (Rodríguez-Morales *et al.*, 2015).

En los años 50, se implementaron estrategias vacunales con cepas atenuadas de *T. cruzi*. La atenuación de los parásitos se realizaba mediante tratamientos farmacológicos, pasajes seriados en cultivos (da Cruz *et al.*, 1989; Fernandes *et al.*, 1966) o más recientemente mediante ingeniería genética (Pérez Brandan *et al.*, 2011). Estas vacunas, si bien generaron respuestas inmunitarias duraderas, plantearon serias preocupaciones de seguridad (Pulendran & Ahmed, 2011). A finales del siglo XX, se realizaron incluso inmunizaciones experimentales con epimastigotes de *T. rangeli* y *Phytomonas serpens*, que lograron una reducción significativa de parasitemia en los animales vacunados (Basso & Marini, 2015; Breganó *et al.*, 2003).

Entre los 80 y 90, se identificaron distintas porciones inmunogénicas del parásito. Ruiz y col. aislaron fracciones de epimastigotes, de las cuales solo la fracción flagelar ofreció protección (Ruiz *et al.*, 1985). Más tarde, se evaluaron glicoproteínas y antígenos de membrana como inmunógenos, estrategia que logró protección tras el desafío con tripomastigotes sanguíneos (Araujo & Morein, 1991).

Con el avance de la tecnología del ADN recombinante, se comenzaron a utilizar proteínas sintéticas como inmunógenos. Por ejemplo, Pereira y col. utilizaron como inmunógeno al antígeno CRA recombinante, que indujo una respuesta humoral con aumento de IgG3 específica (Pereira *et al.*, 2004). Otros estudios que utilizaron inmunógenos recombinantes tales como la proteína PFR y a la cisteína proteasa Cruzipaína (Cz) también mostraron respuestas inmunitarias significativas (Cazorla *et al.*, 2010; Luhrs *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha explorado el uso de vacunas de ADN, que, si bien son sencillas y económicas, presentaron diversos efectos adversos, entre ellos hepatotoxicidad (Limon-Flores *et al.*, 2010). Además, se han utilizado sistemas de “*delivery*” basados en adenovirus, baculovirus recombinantes y *Salmonella atenuada*, los que lograron inmunidad humoral y celular duradera contra una variedad de patógenos en modelos animales (Roland and Brenneman, 2013; Sakurai, Tachibana and Mizuguchi, 2021; Masip *et al.*, 2024). En relación a esto último, la utilización de *Salmonella atenuada* junto con el plásmido que codifica la Cz, generó una buena respuesta humoral, menores parasitemias y menor daño tisular (Cazorla

*et al.*, 2015). Más recientemente, nuestro grupo desarrolló una bacteria *L. lactis* como vector vacunal que mostró buenos resultados en términos de inmunogenicidad (Quintana *et al.*, 2018). Por último, la "vacunología inversa" ha permitido identificar nuevos antígenos vacunales que ejercen cierto grado de protección, tales como TcG1 a TcG4 (Bhatia *et al.*, 2004).

La pandemia causada por el SARS-COV2 permitió la implementación de las vacunas a ARN. De hecho, hoy en día existen varios grupos que se encuentran trabajando en la aplicación de esta tecnología en el desarrollo de vacunas para *T. cruzi* (Poveda *et al.*, 2023; Mancino *et al.*, 2024).

### 2.7.1 Transialidasa como antígeno vacunal

La TS es una enzima que solo se encuentra en *T. cruzi*, y debido a sus características, diversos estudios han explorado su uso como inmunógeno en distintos prototipos vacunales, que se detallan en la Tabla 2. La TS es un inmunógeno inmunodominante, lo que se evidencia en que al menos un 40% de las células T CD8<sup>+</sup> son específicas contra dicho antígeno en un contexto infeccioso en modelo murino (Martin *et al.*, 2006; Tzelepis *et al.*, 2008).

En un principio, se utilizó en las formulaciones formas enzimáticamente activas de la TS, las que no mejoraron la tasa de supervivencia y a la vez generaron efectos adversos, como toxicidad hepática y miocárdica (Risso *et al.*, 2007). Esto llevó a optar por miembros inactivos de la TS, los que promovieron la inmunogenicidad sin generar reacciones adversas de consideración (Fontanella *et al.*, 2008).

Los ensayos pre-clínicos iniciales que utilizaron vacunas a ADN, es decir que utilizaban plásmidos que codificaban un fragmento de la TS, mostraron que eran capaces de inducir tanto una respuesta humoral como celular específica, con reducción de la parasitemia (Costa *et al.*, 1998). Eickhoff y col. demostraron que la co-administración de un plásmido que contenía el gen de la TS (pTS), administrado junto a IL-15 como adyuvante mejoraba la protección a largo plazo (Eickhoff *et al.*, 2011). El uso combinado de vacunas a ADN y proteínas recombinantes derivadas de TS también generaron un grado apreciable de

respuesta, a la vez que revelaron perfiles de respuesta Th1 y Th2 (Vasconcelos *et al.*, 2003). Por otro lado, el uso de vectores adenovirales, como el Ad5, resultó efectivo al generar una buena respuesta inmune y protección dependiente de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, aunque no alcanzó una inmunidad esterilizante (Machado *et al.*, 2006).

En particular, las vacunas basadas en proteínas recombinantes son consideradas seguras y son menos propensas a generar reacciones adversas. Un estudio publicado en 2007, mostró que la administración de una TS junto con adyuvante CpG generaba buenos niveles de protección, especialmente cuando era vehiculizada por vía intramuscular y nasal (Giddings *et al.*, 2010). Asimismo, la administración subcutánea de una TS adyuvada con ISCOMATRIX, mostró un control efectivo de la infección y menor inflamación cardíaca en fase aguda y crónica (Bontempi *et al.*, 2015). Más recientemente, un antígeno quimérico recombinante, denominado Traspaina, demostró una eficacia significativa al reducir el número de parásitos en circulación y el daño cardíaco (Sanchez Alberti *et al.*, 2017). Además, bacterias *L. lactis* modificadas de forma tal que expresaran TS recombinante, indujeron tras ser administradas *in vivo* un incremento en el nivel de anticuerpos específicos (Quintana *et al.*, 2018). Recientemente, el uso de fragmentos recombinantes N-terminal y C-terminal de la TS, junto con diferentes adyuvantes (ISPA o di-AMP-c), mostró una eficacia significativa al reducir la parasitemia y proteger contra el daño tisular cardíaco. Esto sugiere que fragmentos más pequeños de la TS podrían ser también beneficiosos en el desarrollo de vacunas (Pacini *et al.*, 2022; Pacini, *et al.*, 2023; Pacini *et al.*, 2024; Prochetto *et al.*, 2017).

**Tabla 2.** Estudios pre-clínicos que utilizan la TS o sus fragmentos como inmunógeno vacunal

(n.i.=cepa ni informada; NALT tejido linfoide asociado a mucosa nasal; DHT: Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada; 5-FU: 5 fluorouracilo)

Antígeno	Adyuvante	Inmunización	Infección (Vía/Forma/Cepa)	Resultados	Referencia
ADN TS	-	Intramuscular	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / n.i.	↑IgG1, ↑IgG2a, ↑DHT; ↑Proliferación <i>in vitro</i> ; ↓parasitemia; ↑supervivencia	(Costa <i>et al.</i> , 1998)
Plásmidos con TS y/o TS recombinante	-/óxido de aluminio	intramuscular/ intraperitoneal	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / Y	↑IgG1, ↑IgG2a, ↑IFN-γ <i>in vitro</i>	(Vasconcelo s <i>et al.</i> , 2003)
Ad5+TS y/o Ad5+ASP-2		Subcutánea	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / Y	↑IgG, ↑IFN-γ <i>in vitro</i> ; ↓parasitemia; ↑supervivencia	(Machado <i>et al.</i> , 2006)
TS recombinante		Intranasal e intramuscular	Oral /	↑IgG, ↑INF-γ <i>in vitro</i> ; ↑IgG, ↑IgA,	(Hoft <i>et al.</i> , 2007)

	CpG ODN		<i>T. cruzi</i> metacíclico derivado de insecto / n.i.	↓ parasitemia; ↑ supervivencia	
<b>TS recombinante</b>	Ayudante de Freud completo/ incompleto	Subcutánea	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / Tulahuén	↑ IgG, ↓ parasitemia, ↑ supervivencia, ↓ daño tisular	(Fontanella <i>et al.</i> , 2008)
<b>TS recombinante</b>	Oligonucleotidos con motivos CpG	Intranasal	Ocular / Tripomastigotes derivados de cultivo / n.i.	↑ IgA, ↑ Proliferación <i>in vitro</i> , ↑ IFN-γ <i>in vitro</i> , ↑ supervivencia	(Giddings <i>et al.</i> , 2010)
<b>Plásmido TS</b>	Plásmido IL-15	Intramuscular	Subcutánea / Tripomastigotes sanguíneos / n.i.	↑ IFN-γ <i>in vitro</i> , ↑ supervivencia	(Eickhoff <i>et al.</i> , 2011)
<b>Mutante glicosilada de TS inactiva (TSM)</b>	ISCOMATRIX o Ayudante de Freud completo	Subcutánea	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / Tulahuén	↑ IgG1, ↑ IgG2a, ↑ DHT, ↑ IFN-γ e IL-10 <i>in vitro</i> ; ↓ parasitemia; ↑ supervivencia; ↓ carga parasitaria tisular	(Bontempi <i>et al.</i> , 2015)
<b>Traspaína</b>	di-AMP-c	Intranasal	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / RA	↑ IgG1, ↑ DHT, ↑ Proliferación <i>in vitro</i> . ↑ IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 <i>in vitro</i> ; ↓ parasitemia; ↑ supervivencia; ↓ daño tisular/ Th17; ↓ carga parasitaria e inflamación crónica	(Sanchez Alberti <i>et al.</i> , 2017)
<b>TSf</b>	ISPA (Partículas inmunoestimulantes)	Subcutánea	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / Tulahuén	↑ IgG1, ↑ IgG2a, ↑ DHT ↑ IFN-γ <i>in vitro</i> ; ↓ parasitemia ↑ supervivencia	(Prochetto <i>et al.</i> , 2017)
<b><i>L. lactis</i> TS</b> <b><i>L. lactis</i> TS+di-AMP-c</b>	<i>L. lactis</i> di-AMP-c	Oral	-	↑ DHT	(Quintana <i>et al.</i> , 2018)
<b><i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium aroA 7207 (SaroA) + plásmido Traspaína</b>	di-AMP-c/CpG	2 dosis orales de SaroA + 2 dosis nasales de Traspaína	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / RA	↑ IgG1, ↑ DHT, ↑ Proliferación <i>in vitro</i> . ↑ IFN-γ, IL-17, IL-2, IL-4 <i>in vitro</i> ; ↓ parasitemia ↑ supervivencia; ↓ daño tisular	(Cerny <i>et al.</i> , 2020)
<b>TS</b>	di-AMP-c e ISPA	Intranasal	Oral / Tripomastigotes sanguíneos / Tulahuén	↑ IgG2a e IgG1; ↑ IgA TS+di-AMPc > TS+ISPA; ↓ parasitemia, daño tisular TS+di-AMPc < TS+ISPA	(Pacini <i>et al.</i> , 2022)
<b>TSnt</b>	ISPA + Beznidazol	Subcutánea	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / Tulahuén	↓ alteraciones en ECG y daño tisular crónico	(Prochetto, Bontempi, <i>et al.</i> , 2022)
<b>TSdA</b>	di-AMP-c	Intranasal	-	↑ IFN-γ, IL-6, IL-17A, IL-4, IFN-β y TGF-β ARNm en NALT; ↑ IgA, IgG1, IgG2; ↑ DHT	(Pacini <i>et al.</i> , 2023)
<b>TRASP (ASP-2/TS con fragmento SAPA)</b>	Poly-ICLC	Subcutánea	-	↓ parasitemia, parasitismo tisular <i>in vitro</i>	(Castro <i>et al.</i> , 2023)
<b>TSf</b>	ISPA	Subcutánea	Intraperitoneal / Tripomastigotes sanguíneos / Tulahuén	↓ parasitemia; ↑ supervivencia. Depleción con 5-FU: ↑ CD8+ y CD4+ <i>in vitro</i> ; ↑ Treg.	(Gamba <i>et al.</i> , 2021; Borgna <i>et al.</i> , 2024)
<b>TSnt</b>	di-AMP-c	Intranasal	Oral / Tripomastigotes sanguíneos / Tulahuén	↑ IFN-γ, IL-17a e IL-4 ARNm en NALT; ↑ IgA; ↓ parasitemia, carga parasitaria y daño tisular agudo y crónico	(Pacini <i>et al.</i> , 2024)

## 2.7.2 Adyuvantes

Los adyuvantes constituyen un grupo variado de compuestos y sustancias que, al ser administrados junto a un antígeno, mejoran la intensidad, eficacia, amplitud y persistencia de las respuestas inmunológicas. Además, contribuyen a disminuir la necesidad de dosis adicionales, lo que permite un uso más eficiente de las vacunas y extiende considerablemente su disponibilidad. Los adyuvantes fueron descritos por primera vez en 1925 (Schmidt, 1935; 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 (Exley *et al.*, 2010).

En particular, las vacunas a subunidades requieren el uso de adyuvantes para lograr un grado óptimo de eficacia. Las sales de aluminio son las más utilizadas en las vacunas de subunidades que se administran vía parenteral, es decir cuando se inyectan, ya que inducen el incremento en IgG específicas en suero. Sin embargo, estos adyuvantes no parecen ser tan efectivos en la inducción de IgA secretora (sIgA) o en el homing de linfocitos B y T efectores hacia otros tejidos mucosales (Butler *et al.*, 1970; Pulendran *et al.*, 2021). Además, las sales de aluminio requieren que la formulación vacunal se mantenga en cadena de frío (2–8 °C) durante el transporte y el almacenamiento (World Health Organization, 2006) y, por otro lado, en algunos casos son capaces de producir reacciones graves (Tomljenovic and A. Shaw, 2011). Por eso la gran necesidad de desarrollar nuevos y más seguros adyuvantes.

Hoy en día, los adyuvantes se clasifican en tres grupos:

- Sistemas de “*delivery*” o de entrega que facilitan la presentación de antígenos al prolongar la biodisponibilidad de los antígenos cargados o permiten su direccionamiento a ganglios o CPA, alguno de ellos son el MF59 y el Sistema

Adyuvante 03 -AS03- (ambos son emulsión de aceite en agua), las nanopartículas lipídicas (LNP), los liposomas, los ISCOM, entre otros;

- Los inmunoestimulantes, suelen ser agonistas PRRs, ya sea PAMPs o moléculas de señal de peligro (DAMPs) que inducen la maduración y activación de las CPAs como ocurre con los adyuvantes Imiquimod, CpG 1018 y AS04;
- Sistemas que combinan los 2 grupos anteriores como por ejemplo el AS01 (adyuvante liposomal con el inmunoestimulante MPLA y un ingrediente activo de la corteza de *Quillaja Saponaria* QS-21) (Zhao *et al.*, 2023).

Actualmente, se realiza un estudio exhaustivo en búsqueda de adyuvantes con nuevas propiedades, debido a que se busca que las vacunas no solo favorezcan la respuesta humoral, sino también la respuesta celular, ya que esto toma particular relevancia en el caso de patógenos intracelulares, como *T. cruzi*.

A nivel de mucosas, un adyuvante que ha comenzado a ser evaluado es un segundo mensajero bacteriano denominado “monofosfato de adenosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico” o “di-AMP-c”. Esta molécula actúa como agonista de la proteína STING e induce la producción de IFN-I y citocinas de la familia de la IL-1 (Lirussi *et al.*, 2017). Diversas investigaciones han demostrado que, en procesos de inmunización mucosal donde se emplea el di-AMP-c como adyuvante, se promueve un fuerte sesgo Th1 -un requisito esencial para el control de patógenos intracelulares-, además de inducir de manera 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, y son luego presentados sobre las MHC-I) (Lirussi *et al.*, 2017). Este tipo de adyuvantes permite entonces amplificar 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, sino que además estimularía de forma equilibrada las respuestas Th1/Th2/Th17; con

presencia de linfocitos Th1 multifuncionales y T CD8+ citotóxicos (Ebensen *et al.*, 2011; Madhun *et al.*, 2011).

### 2.7.3 Estudios preliminares de nuestro grupo sobre una vacuna de administración mucosal

Nuestro grupo de investigación lleva varios años trabajando en el desarrollo y evaluación de distintos prototipos vacunales basados en el uso de la TS de *T. cruzi*. Una de estas formulaciones, ha sido diseñada para ser administrada por vía intranasal y utiliza el adyuvante di-AMP-c, reconocido por sus propiedades inmunopotenciadoras a nivel de la mucosa.

Uno de los enfoques principales ha sido la evaluación de una vacuna experimental compuesta por un fragmento recombinante del extremo N-terminal del dominio catalítico de una TS-GI, que carece del dominio SAPA y está adyuvada con di-AMP-c (TS+A). Dichos estudios se llevaron a cabo solamente en hembras, en donde se evidenció que la vacuna administrada por vía nasal tenía capacidad inmunogénica tanto a nivel sistémico como mucosal (Pacini *et al.*, 2022; Pacini, *et al.*, 2023; Pacini *et al.*, 2024). Esto es particularmente relevante para el control temprano de la infección causada por vía oral por *T. cruzi*, dado que las mucosas de la orofaringe, el paladar y el resto del tracto digestivo son posibles puntos de entrada del parásito tras su depósito en la cavidad bucal (Silva-dos-Santos *et al.*, 2017).

En los estudios realizados por nuestro grupo, la administración intranasal de TS+A generó una respuesta inmune local y sistémica, caracterizada por la expresión de ARNm de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-4 en el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT), junto con la producción de IgA específica. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Ebensen y col. respecto a la inducción de un perfil mixto Th1/Th2/Th17 (Ebensen *et al.*, 2011). Además, la re-estimulación *ex vivo* con el fragmento recombinante de TS provocó un enriquecimiento en la proporción de linfocitos T CD4+ IFN- $\gamma$ +ROR- $\gamma$ t+ (Pacini *et al.*, 2023), hecho que verificó la capacidad de la vacuna de generar perfiles mixtos de respuesta celular.

Los resultados obtenidos demostraron que la vacunación intranasal con TS+A en hembras logró, tras la infección oral, reducir significativamente la parasitemia y la carga parasitaria en órganos como el corazón, el músculo esquelético y el intestino. Además, la vacuna nasal atenuó las manifestaciones clínicas de la infección aguda, manteniendo niveles prácticamente basales de creatina quinasa MB (CK-MB), glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT) y reduciendo la miocarditis. Por último, esta vacuna también brindó protección durante la fase crónica al disminuir las alteraciones histológicas y electrocardiográficas (Pacini *et al.*, 2024).

En resumen, estos resultados confirmaron el potencial de una vacuna mucosal basada en TS y di-AMP-c para prevenir el desarrollo de la miocardiopatía chagásica, proporcionando protección tanto a nivel local como sistémico y extendiendo su efecto hasta las etapas crónicas de la enfermedad. Sin embargo, dado que la respuesta inmune inducida por la vacunación puede diferir entre sexos, consideramos fundamental evaluar la inmunogenicidad y la capacidad protectora de esta formulación también en machos. Esto permitiría verificar su eficacia en ambos sexos, considerando especialmente el dimorfismo sexual observado tras la infección con *T. cruzi*.

#### 2.7.4 Sistema inmune de mucosas

Las cavidades y órganos internos están recubiertos por mucosas, que actúan como un nexo entre el ambiente externo e interno del organismo. Estas superficies están continuamente expuestas a una gran diversidad de antígenos y a la flora comensal (Corr *et al.*, 2008; Sato and Kiyono, 2012). Por esta razón, las inmunizaciones a nivel de mucosas buscan desencadenar una respuesta antígeno-específica tanto humoral como celular, efectiva a nivel local (o en las distintas mucosas) y sistémica. Sin embargo, la respuesta generada depende en gran medida del sitio de administración, ya que existen diversas vías para llevar a cabo este tipo de inmunizaciones: oral/sublingual, intragástrica, rectal, vaginal, intraocular e intranasal. Entre ellas, las vías oral e intranasal son las más accesibles y aceptadas.

El tejido linfoide asociado a mucosas o MALT (del inglés “*Mucosal-Associated Lymphoid Tissue*”) es el conjunto de linfocitos y estructuras linfoides que están presentes en las mucosas. A su vez, el MALT se encuentra conformado por una red o sistema 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).

Esta red de mucosas constituye un sistema altamente interconectado, incluso entre mucosas anatómicamente distantes. Evidencia de esto es que la administración oral de antígenos puede inducir la producción de IgA específica en la mucosa del tracto gastrointestinal, de las glándulas salivales y las glándulas mamarias. Asimismo, la inoculación intranasal de antígenos genera IgA en el tracto respiratorio superior, así como también en las mucosas gástrica y genital (Bemark *et al.*, 2012; Sallusto *et al.*, 2010).

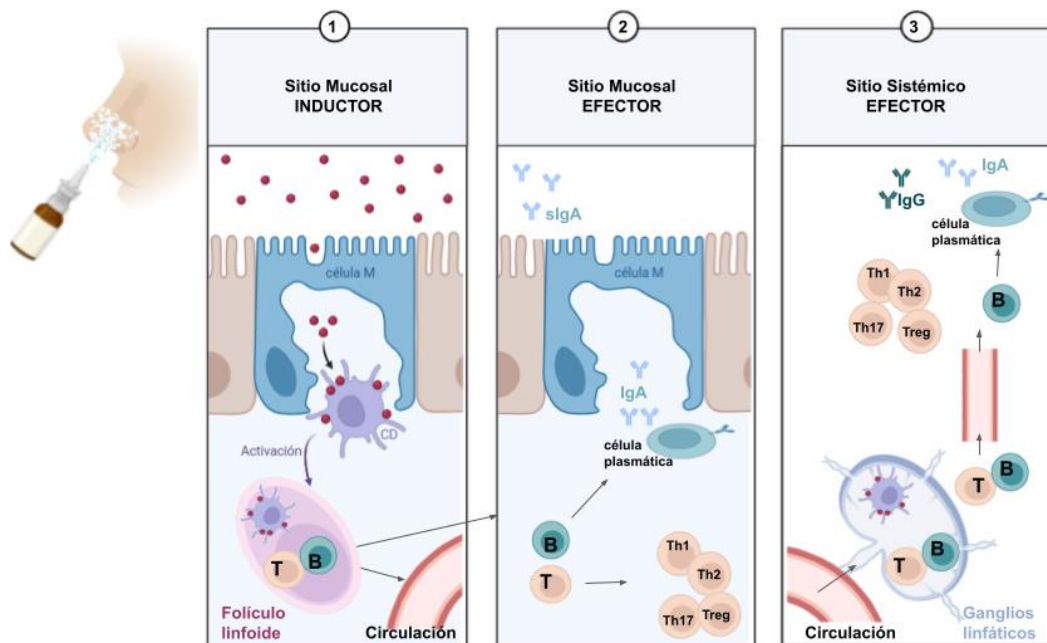
En cada mucosa pueden distinguirse sitios inductores y efectores, estructural y funcionalmente diferentes. Los sitios inductores son aquellos en donde los linfocitos T y B vírgenes se activan, se expanden y se transforman en células efectoras y de memoria. Los sitios efectores son los responsables de llevar a cabo la respuesta efectora propiamente dicha. En el NALT de los seres humanos los sitios inductores incluyen las amígdalas y los 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 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).

Como se esquematiza en la Fig. 4, 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; Riese *et al.*, 2014). Los antígenos son captados en la lámina propia por las CDs, las cuales migran a los folículos linfoides del sitio inductor donde presentan allí los antígenos procesados a los linfocitos T vírgenes, produciéndose así la activación de los linfocitos Th hacia un determinado perfil. Además, en el NALT se desarrolla una respuesta humoral específica contra dichos antígenos (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 se diferencian principalmente a células plasmáticas secretoras de IgA, como también a linfocitos B de memoria. Luego, tanto los linfocitos B como T activados, pueden ir a la circulación general mediante 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.

Un estudio reciente mostró que existe dimorfismo sexual a nivel de la respuesta inmune de mucosas, puntualmente la mucosa intestinal. Este estudio reveló diferencias significativas en la respuesta inmune intestinal entre hombres y mujeres sanos. En las mujeres, se observó una mayor activación basal de células T CD4<sup>+</sup> en el tejido linfoide intestinal, junto con niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . También se detectó una mayor expresión de IL-17A y de sus reguladores

transcripcionales (RORC y STAT3) en las células T CD4<sup>+</sup> femeninas, lo que sugiere un posible impacto en la progresión de infecciones virales y bacterianas. Estas respuestas podrían ser efectivas contra infecciones, pero también predisponer a enfermedades inflamatorias, especialmente tras la menopausia. El E2 promovería la reparación y regeneración de la mucosa intestinal mediante la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, mejorando la proliferación de células epiteliales. Sin embargo, estas diferencias también podrían influir en la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes (Sankaran-Walters *et al.*, 2013).



**Figura 4: Respuesta inmune que se desencadena tras la administración de un antígeno de forma intranasal.** 1) Los antígenos vacunales atraviesan la barrera mucosa y son transportados por células M o células epiteliales nasales hacia los folículos linfoides subyacentes. Allí, las CDs capturan estos antígenos y los presentan a las células T. Este proceso favorece la formación de centros germinales en los folículos linfoides nasales, con la colaboración de células B activadas. 2) Las células B activadas se diferencian en células plasmáticas productoras de IgA. Los anticuerpos IgA se ensamblan en forma de dímero y son transportados de regreso al sitio efector de la mucosa nasal, donde actúan como centinelas frente a patógenos respiratorios. 3) Las células dendríticas activadas por los antígenos migran hacia los ganglios linfáticos regionales, donde interactúan con células T y B, promoviendo la generación de anticuerpos IgG y subconjuntos de células T específicas para el antígeno. Estas células y anticuerpos ingresan a la circulación a través de la vasculatura, proporcionando protección tanto en sitios sistémicos como en mucosas distantes.

Por otra parte, una proporción de CDs que capturan antígenos en el sitio inductor migra hacia los ganglios linfáticos de la región sistémica, donde activa a los linfocitos T y B específicos. Estos, a su vez, ingresan al torrente sanguíneo y se dirigen a los sitios efectores distantes, contribuyendo a la protección sistémica. De este modo, la generación de inmunidad específica no se limita únicamente a los sitios inductores locales, sino que también abarca

áreas distantes de la mucosa y otros tejidos a nivel sistémico. Esto resalta el enorme potencial de las vacunas administradas por vía mucosal, especialmente mediante la vía intranasal (Riese *et al.*, 2014).

## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los elementos reguladores de la respuesta inmune, tanto extrínsecos —como las hormonas sexuales o la activación del eje HPA— como intrínsecos —como las citocinas, las Tregs y las MDSCs— pueden desempeñar un papel clave en la modulación de la inmunidad, contribuyendo a los resultados generales de la vacunación

En base a ello nos propusimos los siguientes objetivos:

### 3.1 Objetivo general

Evaluar los mecanismos reguladores de la respuesta inmune tanto extrínsecos como intrínsecos que se ponen en marcha después de la administración nasal de una formulación vacunal basada en Transialidasa.

### 3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el impacto del dimorfismo sexual en la inmunogenicidad y eficacia vacunal.
- Evaluar del rol de la testosterona en la inmunogenicidad y eficacia vacunal.
- Analizar la dinámica de las poblaciones reguladoras innatas y adaptativas en animales inmunizados y desafiados con *T. cruzi*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Expresión y purificación del fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la Transialidasa

El fragmento TS N-terminal fue seleccionado, clonado y expresado en *E. coli* como fue descrito previamente por nuestro grupo (Prochetto *et al.*, 2017). Este fragmento carece de actividad enzimática y del antígeno SAPA y contiene epítopos T y B predichos por bioinformática (Pacini, *et al.*, 2023). Posteriormente, la purificación del fragmento se realizó por cromatografía de afinidad en columnas Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa (Invitrogen TM, Waltham, MA, EE. UU.) con un gradiente imidazol/imidazol de 8 M urea.

Todas las fracciones fueron recolectadas y dializadas contra PBS/0,5 M urea y cuantificadas por el método del ácido bicinconínico. La presencia de lipopolisacárido (LPS) en la proteína recombinante se determinó utilizando el kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL test) (Genscript, Piscataway, NJ, EE. UU.). Los niveles de LPS fueron <10 unidades de endotoxina (UE)/mg de proteína. La pureza de la proteína se verificó mediante SDS-PAGE. El fragmento N-terminal se indexó en GenBank con el número de acceso MZ215730.

### 4.2 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.

### 4.3 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos y 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

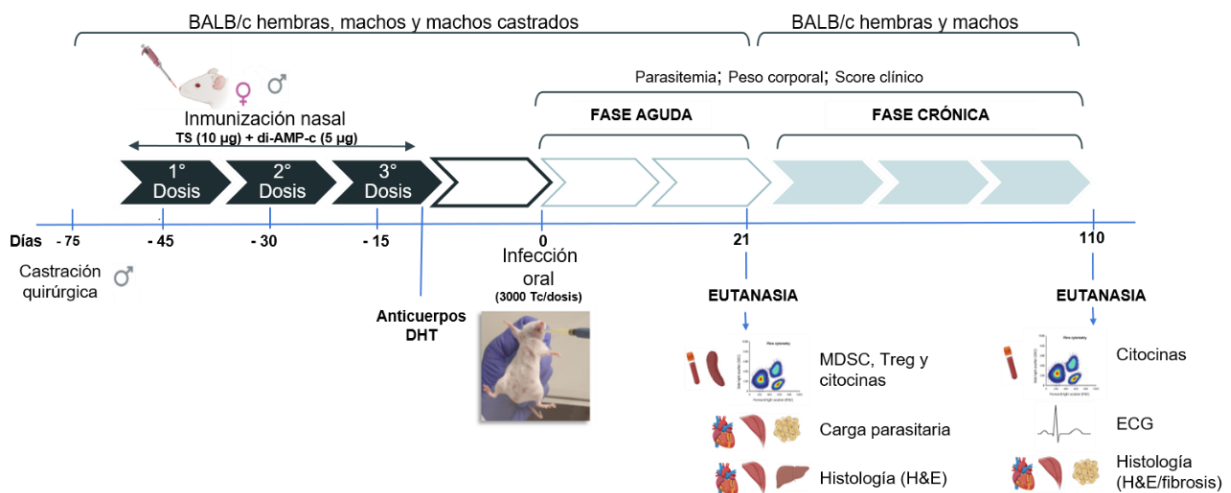
en gabinetes ventilados con filtros HEPA, con control de temperatura y humedad y manteniendo ciclos de luz oscuridad de 12 h, en las instalaciones del Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina (CIPReB-FCM-UNR). Todos los protocolos para los estudios en animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (Res. Nro: 0805/2020 y Nro: 2142/2024).

## 4.4 Orquiectomía

La orquiectomía se realizó 30 días antes de la primera inmunización. Los ratones machos fueron asignados aleatoriamente a cirugía simulada (grupo Ms) o a orquiectomía (grupo Gx). Para la orquiectomía, los ratones fueron previamente anestesiados (ketamina 100 mg/kg - xilacina 10 mg/kg). Brevemente, se hizo una incisión vertical en la piel del escroto y fue seguida por una pequeña incisión en los músculos cremáster que se encuentran debajo. Los contenidos testiculares fueron expuestos suavemente. La grasa testicular se aisló mediante unas pinzas romas estériles. La cola del epidídimo y la cabeza del epidídimo se separaron suavemente del testículo, mientras que se ató una ligadura del epidídimo alrededor de los conductos deferentes y los vasos sanguíneos. El testículo se extirpó al cortar los vasos sanguíneos. Finalmente, se cerró la herida con pegamento tisular. Y luego, se realizó el mismo procedimiento en el otro testículo. Se comprobó el peso de los ratones para controlar su recuperación (Sophocleous and Idris, 2019). Los niveles de testosterona se analizaron 2 días antes de la vacunación en animales Gx para verificar el éxito de la castración quirúrgica mediante ECLIA (Roche). Las muestras de sangre se extrajeron de la vena facial y luego solo se incluyeron en el estudio animales Gx con niveles de testosterona inferiores a 0,03 ng/mL.

## 4.5 Diseño experimental

En la Fig. 5 se puede observar el esquema experimental general de esta tesis.



**Figura 5: Esquema experimental de trabajo general.** Aplicación profiláctica de formulaciones basadas en el fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la Transialidasa, acompañada o no del adyuvante di-AMP-c, seguido de la evaluación de la eficacia de la vacunación en un modelo de infección aguda y crónica.

## 4.6 Protocolo de inmunización

Los animales fueron inmunizados por vía intranasal. Se administraron 3 dosis, en intervalos de 15 días. El volumen de cada dosis fue de 20 µL (10 µL/fosa nasal). Los grupos de trabajo fueron los siguientes:

- Grupo V:** animales a los que se le administró solución salina o vehículo;
- 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;
- Grupo 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;
- Grupo A:** animales a los que solo se le administró 5 µg de di-AMP-c.

En algunos estudios, se agregó un grupo control adicional que consistió en animales no inmunizados ni infectados **-Grupo V(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.

## 4.7 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 acompañada por di-AMP-c. Los mismos se describen a continuación (Fig. 6).

### 4.7.1 Determinación de anticuerpos específicos en plasma, muestras fecales y lavados nasales

Quince días después de la última inmunización, se obtuvo sangre a partir de la vena facial con 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 a 3-4 individuos por caja, las muestras fecales de cada grupo se recolectaron en forma conjunta en tubos eppendorff 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. Para la obtención de lavados nasales se siguió el protocolo informado por (Cho et al., 2012). Brevemente, 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 determinar la respuesta humoral, se recubrieron microplacas ELISA (Nunc-Inmuno Maxisorp™, Thermo) con el fragmento TS seleccionado (0,5 µg para suero y 2 µg para extractos fecales y lavados nasales) diluido en tampón carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6). Las placas se lavaron con PBS-Tween-20 al 0,05% después de una incubación durante toda la noche (o.n.) y luego se bloquearon con PBS/albúmina sérica bovina (BSA) al 5%

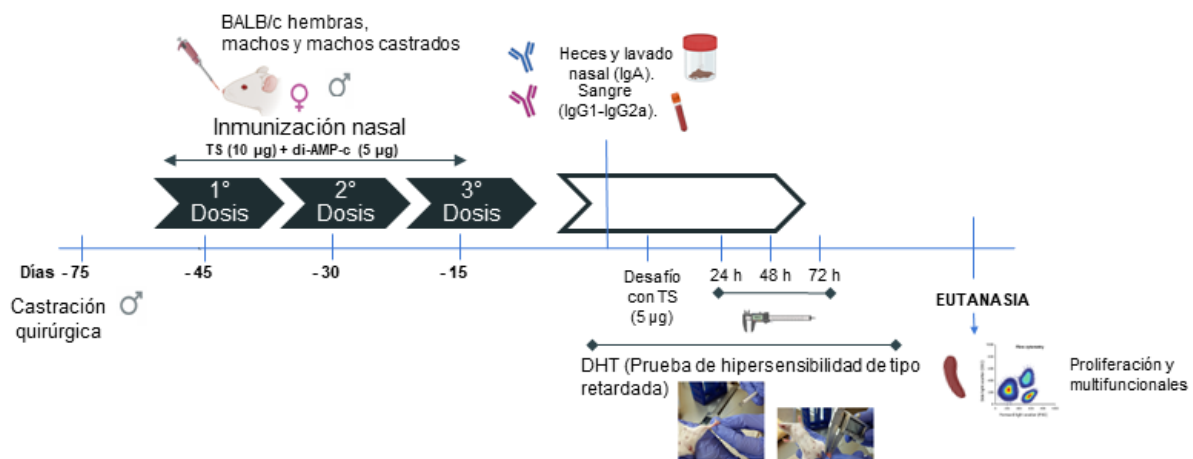
durante 1 hora. Posteriormente, las placas se lavaron nuevamente con PBS-0,05% Tween-20. El plasma, los extractos fecales y los lavados nasales se diluyeron en PBS/BSA al 0,5 % (1:20 y 1:4, sin diluir, respectivamente) y se incubaron por duplicado en pocillos recubiertos con TS. Los anticuerpos anti-TS en plasma se detectaron mediante incubación con IgG1 anti-ratón de rata e IgG2a HRP (1:2000, BD Biosciences). En cambio, la IgA en lavados fecales y nasales se detectó mediante incubación con IgA anti-ratón de rata biotinilada (1:1500, BD Biosciences) mezclada con estreptavidina HRP (1:1500, BD Biosciences). Las muestras se leyeron a 450 nm con corrección a 545 nm en un lector ELISA (Epoch Biotek Instruments) después de la incubación con 100  $\mu$ l de trimetilbencidina lista para usar (Sigma) seguido de la adición de 100  $\mu$ l de solución tampón (Wiener Lab). Los valores de densidad óptica (OD) para la medición de Igs se ajustaron restando la lectura de OD del diluyente (blanco). Posteriormente, se calculó la DO relativa con el objetivo de normalizar los datos. Para ello, se obtuvo el promedio de las absorbancias correspondientes al grupo control (V) y, a continuación, cada valor individual de absorbancia fue dividido por este promedio. Este procedimiento permitió estandarizar las mediciones y facilitar la comparación entre los distintos grupos experimentales.

#### 4.7.2 Prueba de hipersensibilidad de tipo retardada (DHT)

Luego de la última inmunización, los animales fueron inoculados con 5  $\mu$ g de la TS en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha, siguiendo el protocolo de Bontempi y col. (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, 48 y 72 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.

### 4.7.3 Detección de células T multifuncionales y proliferación de linfocitos T y B

A los quince días de la última inmunización se evaluó *in vitro* la proliferación de células T y B junto con el perfil multifuncional de las células T. Brevemente, los bazos se recogieron asépticamente y se homogeneizaron en RPMI 1640 (Gibco). Los glóbulos rojos se lisaron mediante la adición de tampón 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 RPMI 1640 suplementado con BFS al 10% (Gibco) y 2-mercaptoetanol 0,4 mM (Laboratorio Wiener). Luego, se lavaron  $1 \times 10^6$  células y posteriormente se marcaron para detectar niveles basales de IFN- $\gamma$  y ROR- $\gamma\text{t}$ , se sembraron esplenocitos en placas de 48 pocillos y se estimularon con ionomicina y brefeldina A (BD GolgiPlug, BD Pharmingen) durante 4 horas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ , como se informó anteriormente. Después de eso, los esplenocitos se incubaron con anticuerpos anti-Fc $\gamma$ II/III-R, se lavaron y se tiñeron con anti-B220/PE, anti-CD4/PE-Cy7 y anti-CD8/PerCP (BD Pharmingen) durante 30 minutos. Luego, las células se lavaron y se resuspendieron en un tampón de permeabilización/fijación durante otros 30 minutos a 4°C. Después de eso, las células se lavaron y se tiñeron intracelularmente con anticuerpos monoclonales anti-IFN- $\gamma$ /FITC y anti-ROR- $\gamma\text{t}$ /PE o anti-Ki-67/FITC (BD Pharmingen). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSArialII (Beckton-Dickinson, EE. UU.) para identificar y cuantificar las diferentes poblaciones. En el análisis, las células muertas se eliminaron basándose en la dispersión de la luz en diferentes ángulos (dispersión frontal -FCS- y dispersión lateral -SSC-). En todos los casos, los valores de tinción basal obtenidos con los controles de isotipo conjugado se restaron de sus respectivos fluorocromos. Los análisis de frecuencia e intensidad de fluorescencia se realizaron mediante el programa "BD FACSDiva Software" (Beckton-Dickinson, EE. UU.).



**Figura 6: Detalle del esquema experimental utilizado para evaluar inmunogenicidad.** Aplicación profiláctica de formulaciones basadas en el fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la Transialidasa, acompañada o no del adyuvante di-AMP-c, seguido de la evaluación de la inmunogenicidad

## 4.8 Evaluación de la eficacia protectora

La vía de infección seleccionada para evaluar la protección de la vacuna fue la oral. Se seleccionó esta opción porque representa una vía de transmisión emergente en América Latina y a su vez, permitía determinar si la administración de la formulación vacunal a nivel de la mucosa nasal generaba tanto inmunidad mucosal como sistémica. Es importante señalar que el modelo utilizado es no letal, lo que impide utilizar la supervivencia como punto final del estudio. Por lo tanto, para una mejor apreciación de la eficacia vacunal, se elaboró un score *ad hoc* que considera diferentes signos clínicos presentes durante la infección.

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

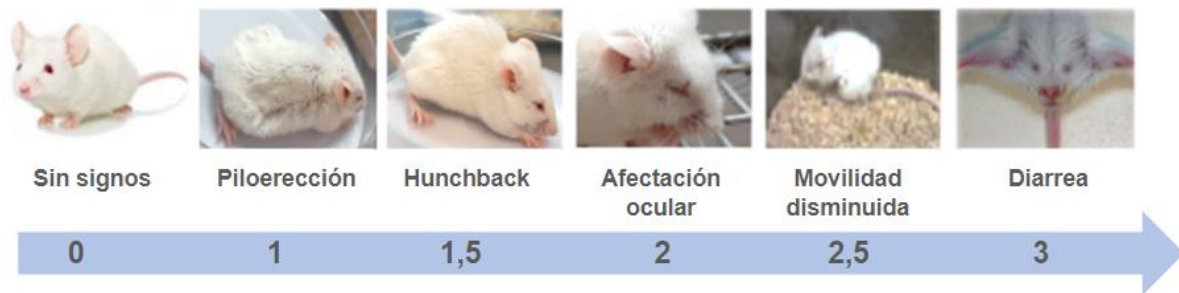
Transcurridos 15 días desde la última inmunización, los ratones BALB/c fueron privados de agua durante 4 horas y, posteriormente, se los infectó por vía oral con 3000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen (DTU-VI). La inoculación se realizó con una micropipeta, depositando lentamente 50 µL de una suspensión de parásitos en la mucosa bucal, respetando un tiempo de deglución de al menos 15 minutos para evitar la aspiración del

parásito. Los ratones fueron pesados semanalmente y la supervivencia se registró diariamente, tal como se indicó en estudios anteriores (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015).

La parasitemia se evaluó mediante microscopía directa siguiendo el método de Brenner, analizando 5 µL de sangre heparinizada entre un portaobjeto y un cubreobjeto de 22 x 22 mm en diferentes días post-infección (pi). En cada muestra, se contabilizó el número de parásitos presentes en 50 campos a un aumento de 40X, y este número se transformó posteriormente a parásitos/mL. Además, se calculó el área bajo la curva (AUC) para evaluar la carga de parasitemia a lo largo del período agudo, como se describió anteriormente (Pacini *et al.*, 2022). Los parásitos utilizados en los procedimientos experimentales se obtuvieron de la sangre de ratones CBI machos destetados, infectados con  $1,5 \times 10^5$  parásitos Tulahuen.

#### 4.8.2 Score clínico

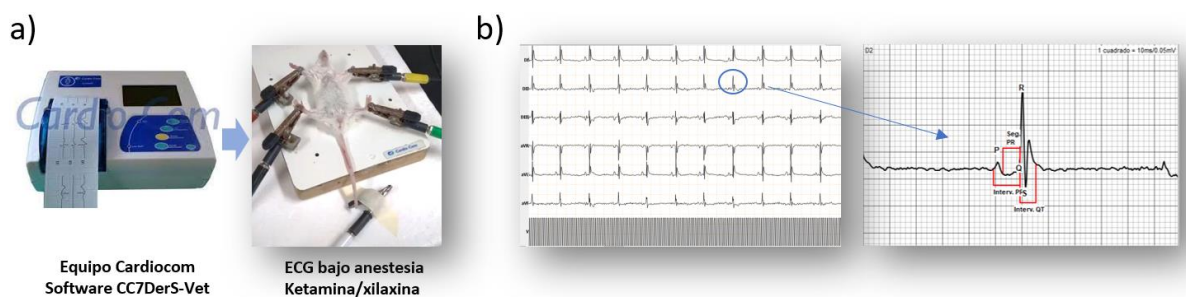
Para evaluar el impacto clínico de la vacuna, se utilizó un sistema de puntuación clínica basado en el publicado anteriormente por Pacini y col. (Pacini *et al.*, 2022). Esta puntuación tiene en cuenta diferentes manifestaciones clínicas causadas por la infección por *T. cruzi* en ratones como sigue: ausencia de signos (puntuación 0), piloerección (puntuación 1), postura encorvada (puntuación 1,5), secreción ocular (puntuación 2), disminución de la actividad locomotora (puntuación 2,5) y diarrea (puntuación 3) (Fig. 7). Estas manifestaciones clínicas se registraron diariamente. La puntuación individual se calculó como la suma de valores preestablecidos para cada signo clínico. La puntuación global de cada grupo/día se calculó como la media de las puntuaciones individuales. La puntuación acumulada de cada grupo se evaluó como el AUC.



**Figura 7: Score clínico en animales infectados con *T. cruzi*.** Puntuación asignada a cada una de las diferentes manifestaciones clínicas observadas en los ratones infectados durante la fase aguda de la infección. Las manifestaciones aparecen en forma secuencial durante el curso de la infección y se asocian con la severidad de la misma.

#### 4.8.3 Electrocardiografía

Al día 110 pi, los animales se anestesiaron con una solución de ketamina (50%, Holliday-Scott S.A.) / xilacina (10%, PharmaVet) y posteriormente se realizó una evaluación cardiológica mediante electrocardiogramas (ECG), registrando la actividad eléctrica con un electrocardiógrafo diseñado para animales de laboratorio (Cardiocom, Argentina), 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 (Fig. 8). Como el valor del intervalo QT varía con la Fc registrada (disminuye a Fc altas y aumenta a Fc bajas), por lo que su valor se corrigió aplicando la fórmula descrita en Mitchell y col., (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. Se contó con la supervisión del cardiólogo Rodolfo Leiva para el análisis de los ECG.



**Figura 8: Registro electrocardiográfico en modelo murino.** a) Electrocardiógrafo para roedores de laboratorio. b) 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.

#### 4.8.4 Detección de ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* en corazón, músculo e intestino delgado.

Al día 21 pi, se extrajo ADN del corazón, músculo esquelético e intestino delgado, siguiendo el método de Cummings y Tarleton (Cummings and Tarleton, 2003). Brevemente, cada muestra se desagregó con un tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH = 7,6; NaCl 0,1 M; EDTA 10 Mm; SDS al 0,5 %, proteinasa K 300 µg/ml de Sigma) y se extrajo el ADN total. Luego, las muestras se calentaron durante 2 h a 55 °C y se extrajeron dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Luego, se añadió etanol frío (AAPER Alcohol and Chemical Co., Shellyville, KY), el doble del volumen de la muestra extraída, y las muestras se colocaron a -80 °C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 13.000 rpm y se lavaron con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en agua esterilizada. Las muestras de ADN se ajustaron a una concentración final de 25 ng/µL y se usaron como plantilla para las reacciones de qPCR utilizando los cebadores específicos para *T. cruzi*: el ADNk se amplificó usando S36 (5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT G3') y cebadores S67rev (5'GAA CCC CCC TCC CAA AAC C3'). Para generar la curva de cuantificación de *T. cruzi*, se enriquecieron 25 mg de tejidos no infectados con  $1 \times 10^6$  tripomastigotes. Se extrajo el ADN total y la concentración final se

ajustó a 25 ng/ $\mu$ L. Las curvas estándar se prepararon mediante diluciones en serie diez veces mayores, utilizando ADN de tejidos no infectados (25 ng/ $\mu$ L) como diluyente para generar un rango de 0,01 a 1000 equivalentes de parásitos por 50 ng de ADN total. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis Biodyne) en el instrumento StepOne™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). La carga parasitaria se expresó como parásitos equivalentes en 50 ng de ADN murino.

#### 4.8.5 Daño tisular

Al día 21 pi, se extirparon porciones de tejido muscular, corazón (tanto aurículas como ventrículos) e hígado de los ratones inmunizados e infectados; mientras que al día 110 pi se analizó el corazón, tejido muscular y tejido adiposo. Los tejidos 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 o con picrosirus red para evaluar el grado de fibrosis. La miocarditis y la inflamación de los tejidos 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), tal como se informó anteriormente (Roggero *et al.*, 2002; Bontempi *et al.*, 2015). También se registraron las características de los infiltrados (focales o difusos).

Las muestras fueron analizadas a ciego por un patólogo experto en enfermedad de Chagas (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 (Shahi *et al.*, 2019).

A su vez, al día 21 pi (coincidiendo con el pico de parasitemia) y al día 110 pi se determinó en plasma fresco la actividad de enzimas indicadoras de daño muscular cardíaco y hepático: CK-MB o creatinfosfoquinasa (CPK), GOT y GPT, mediante ensayos espectrofotométricos, de acuerdo con la descripción del fabricante (Roche).

#### 4.8.6 Detección de Células supresoras de origen mieloide y células T reguladoras

Las MDSC se evaluaron mediante citometría de flujo al día 21 pi. Brevemente, se obtuvieron los esplenocitos y las muestras de sangre. Los glóbulos rojos se eliminaron utilizando un tampón 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). Posteriormente, primero se incubaron  $1 \times 10^6$  células con anticuerpos anti-receptor Fc $\gamma$ II/III, se lavaron y se tiñeron con anti-CD11b/PercP, anti-Ly6C/FITC y anti-Ly6G/PE (BD Pharmingen) durante 30 min. Las células Treg se midieron únicamente en los esplenocitos. Siguiendo el mismo protocolo, pero teñido con anti-CD4/PEcy7. Luego, las células se lavaron y se resuspendieron en un tampón de permeabilización/fijación durante otros 30 minutos a 4°C. Las células marcadas con CD4 también se tiñeron intracelularmente para detectar el anticuerpo monoclonal anti-FoxP3/FITC (eBioscience). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSAriaII (Beckton-Dickinson, EE.UU.) para identificar y cuantificar las diferentes poblaciones (M-MDSC, G-MDSC y Tregs), como se publicó anteriormente (Gamba *et al.*, 2021). El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo.

#### 4.8.7 Cuantificación de citocinas en plasma

En los días 0, 21 y 110 pi se determinó la presencia de IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A en las muestras de plasma mediante citometría de flujo (BD *Cytometric Bead Array* -CBA-, BD Biosciences, EE. UU). Brevemente, las muestras se diluyeron en un medio hasta un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  y se incubaron durante 2 h con las perlas de captura y el reactivo de detección conjugado con PE. Luego se lavó con solución *ad hoc* y se centrifugó a 200 g

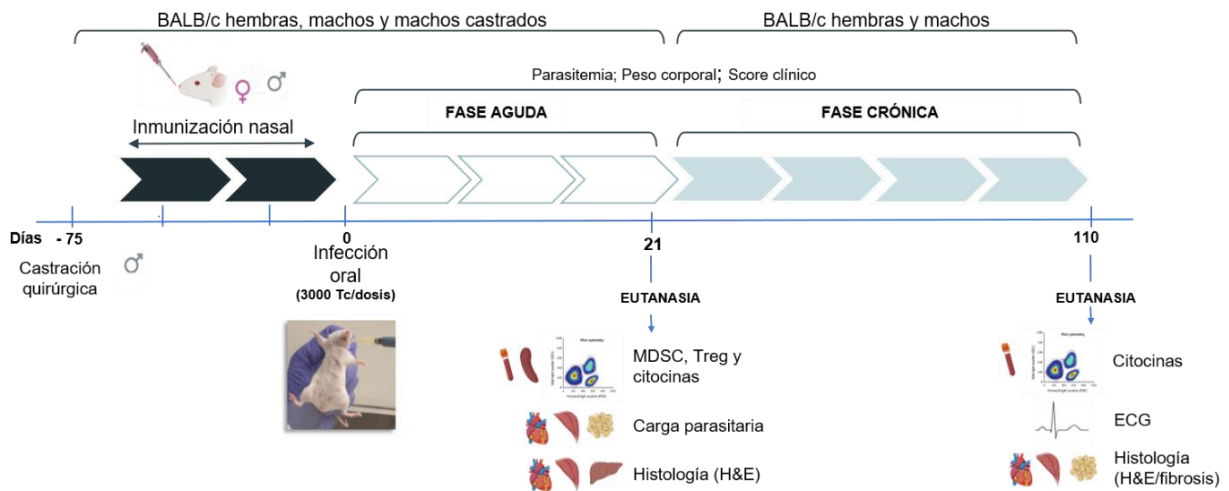
durante 5 min. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSAriaII (Beckton-Dickinson, EE. UU.) y las concentraciones de las citocinas de interés se determinaron utilizando el software BD-CBA.

#### 4.8.8 Perfil de citocinas cardíacas mediante RT-qPCR

Se analizó el perfil de citocinas en tejido cardíaco obtenido al día 110 pi. Brevemente, se procesó la mitad del corazón y se disgregó mecánicamente en TRI-Reagent®. A partir del ARNm, se realizó la transcripción reversa para obtener el ADNc utilizando la transcriptasa inversa RevertAid (Thermo-Fisher, EE.UU.). La PCR en tiempo real se realizó en un equipo StepOnePlus (Applied-Biosystems, Waltham, MA, USA) utilizando Mix-5x-HOT-FIREPol®EvaGreen® qPCR-Mix Plus con ROX (Solis-BioDyne, Tartu, 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 segundos, un annealing entre 59/62 °C, y finalmente un alargamiento a 72 °C durante 20 segundos, durante 40 ciclos. Se midió la fluorescencia después de cada paso de extensión y la especificidad de la amplificación, se evaluó mediante 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 utilizando 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 utilizados fueron los siguientes:

IL-17A	Fwd: CAAAGCTCAGCGTGTCCAAA Rev: CTTCCCAGATCACAGAGGGATA
IL-1 $\beta$	Fwd: AGACAACACTGCACTACAGGCTC Rev: TTGTCGTTGCTTGGTTCTCCT
TGF- $\beta$	Fwd: TGACGTCACTGGAGTTGTACGG Rev: GTTCATGTCATGGATGGTGC
IL-6	Fwd: GAGGATACCACTCCCAACAGACC Rev: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF- $\alpha$	Fwd: CACAGAAAGCATGATCCGCGAC Rev: GAACTTCTCATCCCTTTGGGGAC
GADPH	Fwd: AGCAATGCATCCTGCACCACCA Rev: ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA

En la Fig. 9 puede observarse un esquema del diseño experimental utilizado para la evaluación de la eficacia de las formulaciones vacunales.



**Figura 9: Diseño experimental para evaluar eficacia protectora de la formulación vacunal basada en TS.** Aplicación profiláctica de formulaciones basadas en el fragmento recombinante N-terminal del dominio catalítico de la Transialidasa, acompañada o no del adyuvante di-AMP-c, seguido de la evaluación de la protección de nuestra formulación.

## 4.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas: Kruskal-Wallis (para comparaciones entre k grupos, con  $k > 2$ ), y 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.RESULTADOS

## 5.1 CAPITULO I

### Evaluación del impacto del dimorfismo sexual en la inmunogenicidad y eficacia vacunal

El dimorfismo sexual en la respuesta inmunitaria ha sido ampliamente reconocido como un factor clave que influye en la susceptibilidad a infecciones, la progresión de enfermedades y la eficacia de las intervenciones terapéuticas, incluidas las vacunas. Las diferencias biológicas entre hombres y mujeres, moduladas tanto por hormonas sexuales como por factores genéticos, pueden afectar la inmunogenicidad y la eficacia vacunal en distintas fases de la enfermedad, ya sea en la etapa aguda o crónica. Comprender cómo este dimorfismo podría impactar en el desarrollo de una vacuna para la enfermedad de Chagas sería crucial para el diseño de estrategias inmunológicas más eficaces.

#### 5.1.1 Dimorfismo sexual e Inmunogenicidad

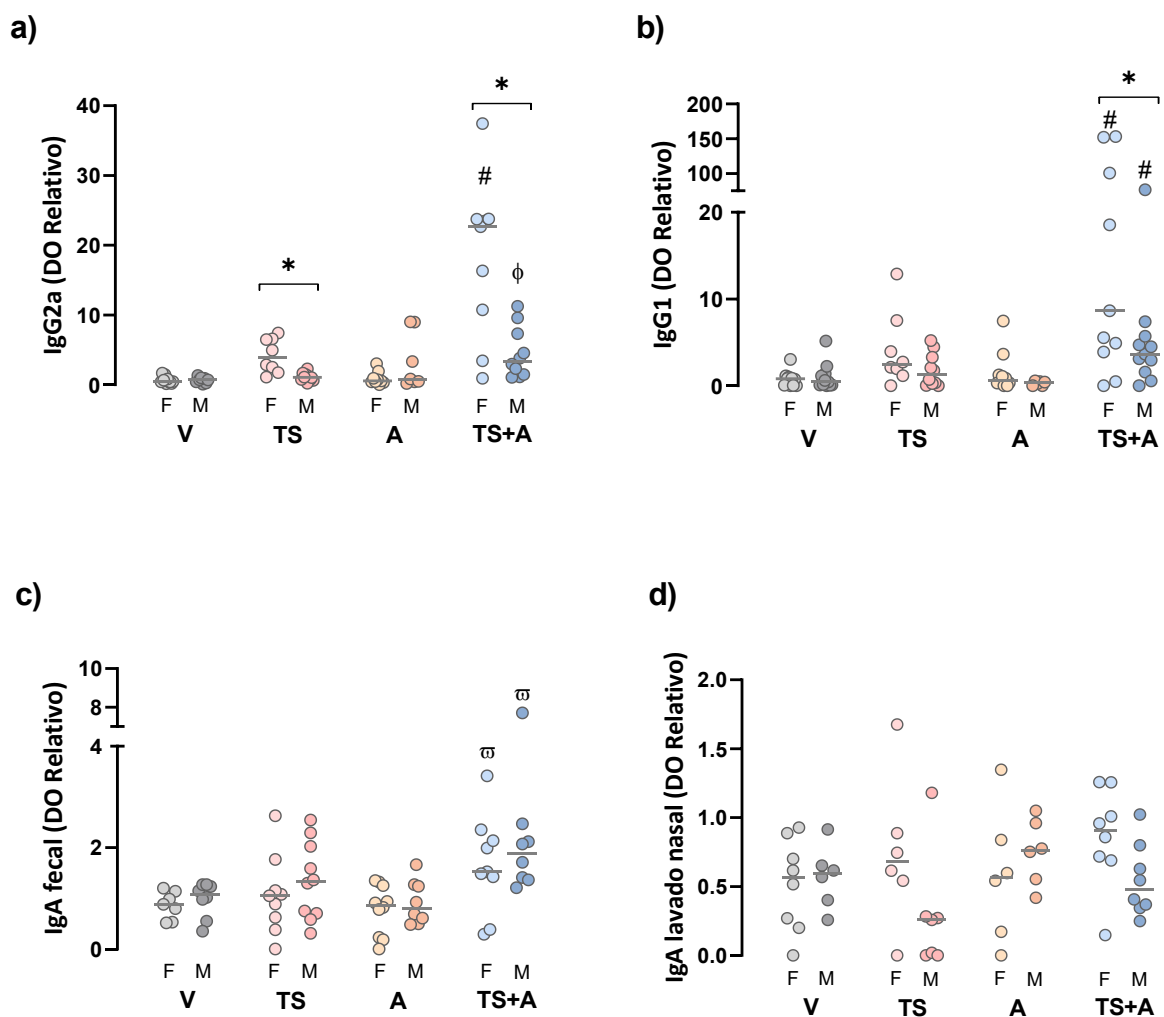
##### 5.1.1.1 Dimorfismo: Respuesta Humoral sistémica y mucosal

Transcurridos quince días de la última inmunización, se evaluó la respuesta sistémica humoral en términos de niveles de anticuerpos IgG2a e IgG1 específicos contra la TS. Independientemente del sexo, los ratones que recibieron la formulación TS+A exhibieron los niveles más altos de IgG2a. Además, los niveles de IgG2a en hembras inmunizadas con TS+A y TS aumentaron en comparación con los respectivos machos, siendo mayores en el primer grupo. Entre los machos, los niveles de IgG2a aumentaron más en los grupos TS+A que en los grupos V y TS (Fig. 10a). Se observó una respuesta similar en relación con los

niveles de IgG1, donde los ratones que recibieron TS+A mostraron los niveles más altos, siendo más elevados en las hembras que en los machos (Fig. 10b).

Como se observa en la Fig. 10c, la respuesta mucosal desencadenada por TS+A y TS fue evidente en las heces, siendo los niveles de IgA similares entre hembras y machos ( $p < 0,05$  en ambos casos). La IgA en los lavados nasales no mostró diferencias entre los grupos vacunados (Fig. 10d). Globalmente, TS+A indujo una mejor respuesta humoral sistémica y mucosal, siendo más evidente en hembras a nivel sistémico.

F: Hembras / M: Machos    **V** Vehículo    **TS** Transialidasa    **A** di-AMP-c    **TS+A** Transialidasa + di-AMP-c



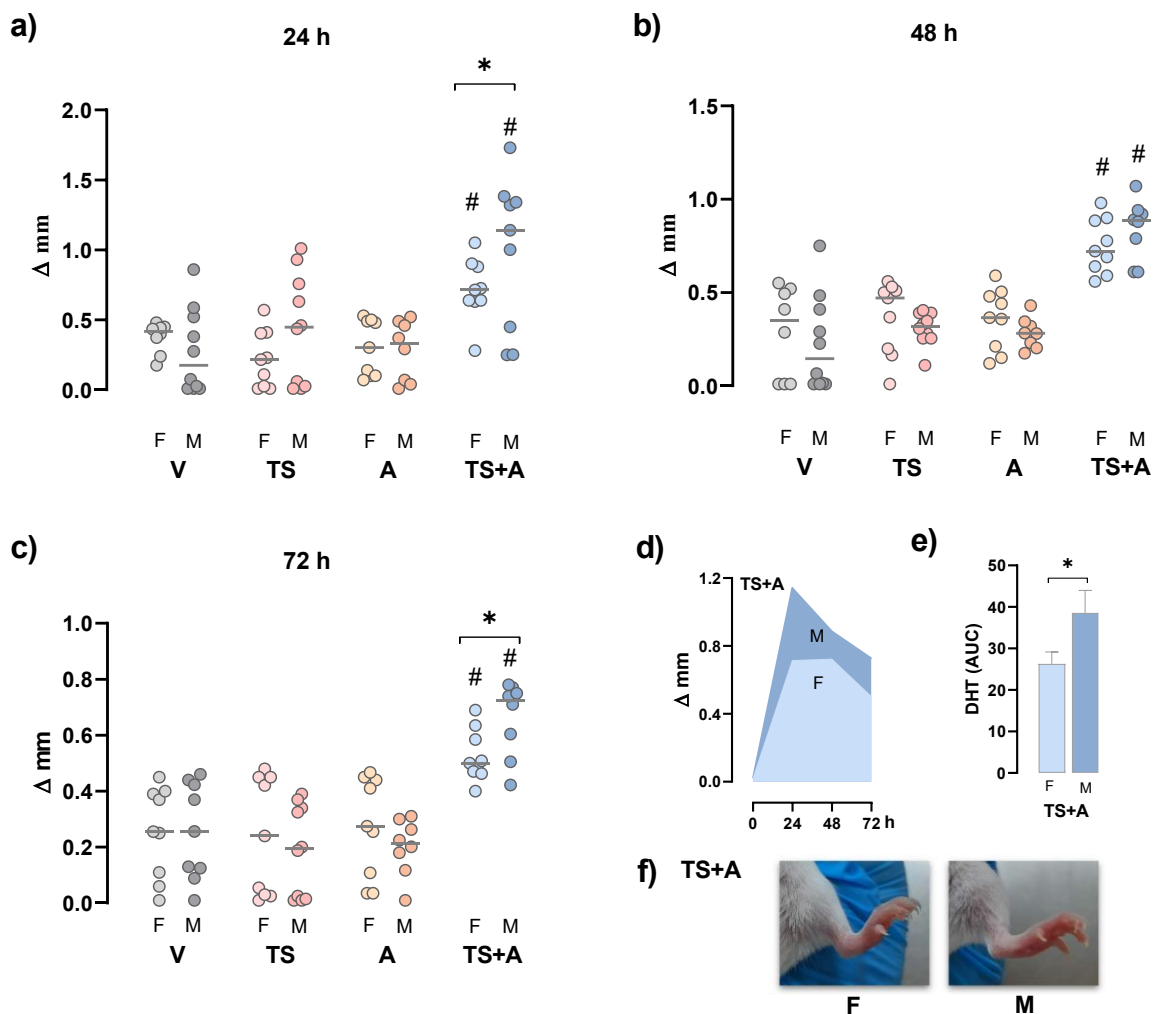
**Figura 10: Respuesta humoral específica contra TS gatillada por la vacunación en animales de ambos sexos.** Se inmunizaron ratones BALB/c con V, TS, A o TS+A, y 15 días después de completar el esquema de inmunización se analizó en plasma el nivel de anticuerpos IgG2 y IgG1 específicos para TS (a, b), mientras que la IgA específica se evaluó en heces (c) y en lavado nasal (d).

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05$ = M vs. F; # $p < 0,05$ = TS+A vs. resto;  $\phi$   $p < 0,05$ = TS+A vs. V y TS;  $\square$   $p < 0,05$ =TS+A vs. V y A

### 5.1.2.2 Dimorfismo: Respuesta celular específica y Citocinas plasmáticas

Después de dos semanas de completar el programa de vacunación, se realizó una prueba de DHT *in vivo* en la almohadilla plantar, para determinar si se había desarrollado inmunidad celular contra TS. Como se observa en la Fig. 11a-c, después de la re-exposición a TS, los animales vacunados con TS+A exhibían una respuesta celular específica hacia TS muy evidente, que fue ligeramente más pronunciada en machos que en hembras, y que persistió incluso a las 72 horas. Se observó una respuesta global similar, aunque de menor envergadura, en hembras vacunadas con TS+A (Fig. 11d-e). No se detectaron diferencias en el grosor de las almohadillas plantares entre los grupos V, TS y A, independientemente del sexo de los ratones

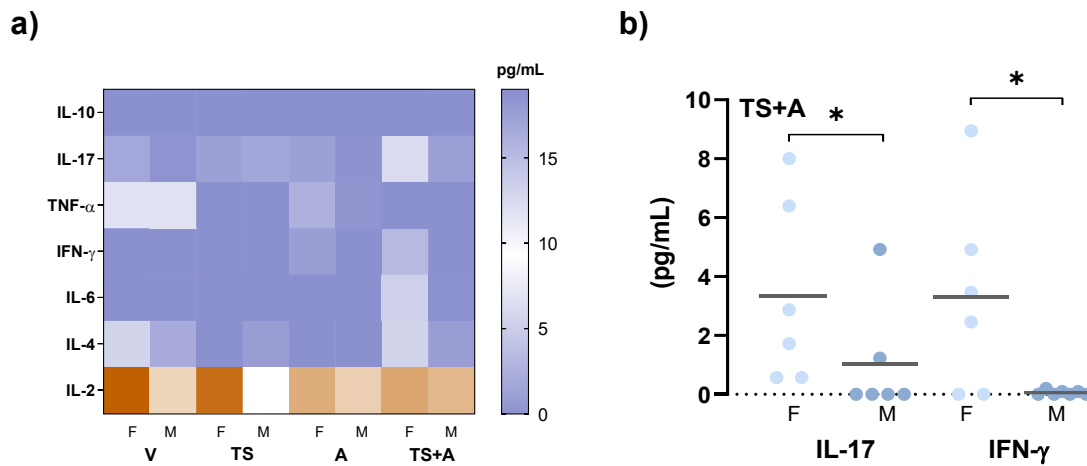
F: Hembras / M: Machos    **V** Vehículo    **TS** Transialidasa    **A** di-AMP-c    **TS+A** Transialidasa + di-AMP-c



**Figura 11: Respuesta celular específica contra la TS en ambos sexos.** La inmunogenicidad celular específica se estimó 15 días después de completar el programa de inmunización mediante una prueba de hipersensibilidad de tipo retardada (DHT). a-c) Tras la inoculación de 5  $\mu$ g de TS en la almohadilla plantar, se midió el espesor de la misma antes y después de 24, 48 y 72 horas post-inoculación; los valores obtenidos se informan como  $\Delta$  (en mm). d) Representación de la variación de la DHT ( $\Delta$ , en mm) entre machos y hembras vacunados con TS+A durante el período evaluado. e) Valores del área bajo la curva (AUC) entre machos y hembras vacunados con TS+A. f) Fotografía representativa que muestra la inflamación de la almohadilla plantar de la pata derecha inducida después de 24 h de TS en un animal de los grupos TS+A. Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = M$  vs. F; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto.

Al mismo tiempo, el análisis de las citocinas plasmáticas mostró que, excepto IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-6 están ligeramente aumentados en los grupos vacunados en comparación con el grupo V (Fig. 12a), mientras que en el grupo TS+A, IL-17 e INF- $\gamma$  se encuentran más incrementadas en hembras que en machos (Fig. 12b).

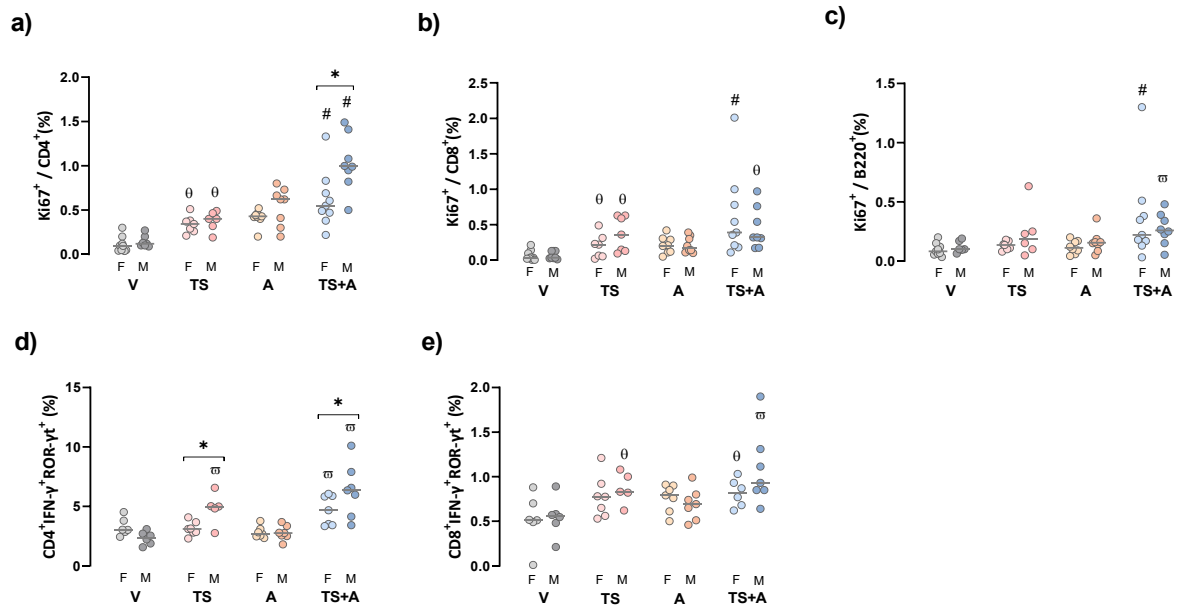
F: Hembras / M: Machos    **V** Vehículo    **TS** Transialidasa    **A** di-AMP-c    **TS+A** Transialidasa + di-AMP-c



**Figura 12: Producción de citocinas post-inmunización en ambos sexos.** Se inmunizaron ratones BALB/c con V, TS, A o TS+A, y 15 días después de completar el esquema de inmunización, se analizaron los niveles de citocinas plasmáticas mediante *Cytometric Bead Array*. (a) Los resultados globales se muestran como un mapa de calor correspondiente a los niveles medios de citocinas en plasma. (b) Valores individuales de IL-17 e IFN- $\gamma$  en el grupo TS+A, significativamente más elevados en F que en M. Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = M$  vs. F

La respuesta proliferativa de las células B y T esplénicas también se examinó *ex vivo* después de la vacunación (Fig. 13a-e). Globalmente, los grupos TS+A y TS mostraron una mayor frecuencia de linfocitos esplénicos CD8<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> y B220<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>. Tanto hembras como machos vacunados con TS+A mostraron un incremento en la frecuencia de proliferación de las poblaciones analizadas, siendo levemente mayor la proliferación de las CD4<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> en machos que en hembras (Fig. 13a-c). El análisis de los linfocitos T multifuncionales que expresan tanto IFN- $\gamma$  como ROR- $\gamma$ t (como marcador sustituto de la producción de IL-17) mostró que su frecuencia aumentó tanto en hembras como en machos de animales vacunados con TS+A (Fig. 13d,e). En el caso de los linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>, estos estuvieron particularmente aumentados en los grupos de machos TS y TS+A en relación a las hembras de los mismos grupos.

F: Hembras / M: Machos    V Vehículo    TS Transialidasa    A di-AMP-c    TS+A Transialidasa + di-AMP-c



**Figura 13: Proliferación linfocitaria y frecuencia de células T multifuncionales gatillada por la inmunización en ambos sexos.** TS+A indujo en ambos sexos una proliferación mejorada dentro de linfocitos CD8+, CD4+ y B220+ esplénicos (a-c, respectivamente), y también impulsa una frecuencia mejorada CD4+IFN- $\gamma$ +ROR- $\gamma$ t+ y CD8+IFN- $\gamma$ +ROR- $\gamma$ t+ respecto al resto de grupos (d-e).

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = M$  vs. F; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\omega$   $p < 0,05 = TS+A$  o TS vs. V y A;  $\theta$   $p < 0,05 = TS$  o TS+A vs. V.

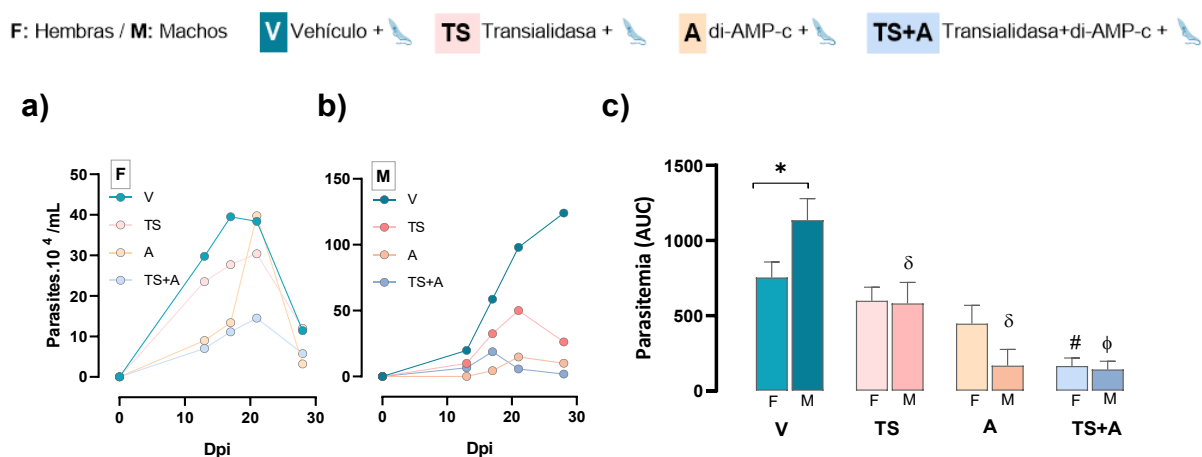
En general, los estudios de inmunogenicidad demostraron que la inmunización con TS+A resultó muy efectiva en términos de inmunidad humoral y celular. Sin embargo, TS+A desencadenó una mejor respuesta humoral y mayores niveles plasmáticos de IL-17 e IFN- $\gamma$  en las hembras, mientras que, por el contrario, indujo respuesta celular más evidente en machos, al menos en términos de proliferación e inducción de células multifuncionales esplénicas.

## 5.1.2 Dimorfismo y Eficacia protectora vacunal

### 5.1.2.1 Dimorfismo: Parasitemia y Score clínico

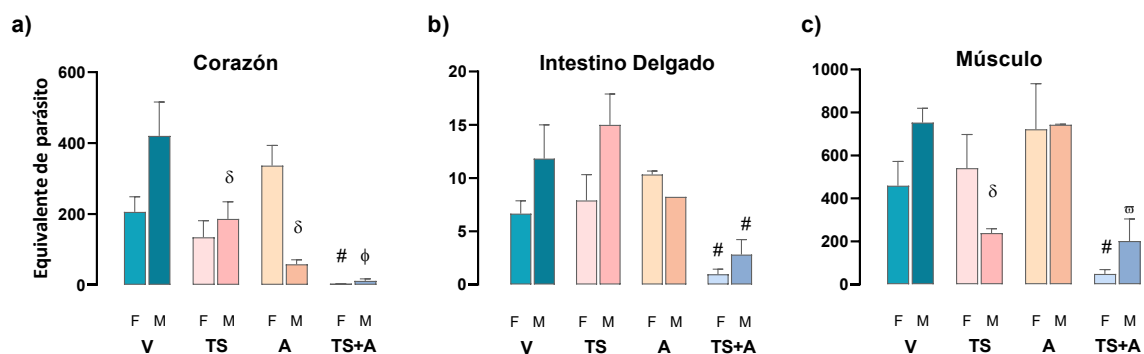
Para evaluar el grado de protección proporcionada por las formulaciones, los animales fueron posteriormente infectados por vía oral con *T. cruzi*. Luego se analizó la parasitemia y se registraron las manifestaciones clínicas. Se corroboró que las hembras BALB/c son más

resistentes a la infección por *T. cruzi* que los machos (Roggero *et al.*, 2016). En este sentido, el grupo de hembras que solo había recibido el V mostró niveles de parasitemia 2/3 veces más bajos que los machos del grupo V (Fig. 14c). La vacunación con TS+A logró disminuir significativamente la parasitemia en ambos sexos. Mientras que en hembras logró reducir sustancialmente la circulación de parásitos en comparación con el resto de los grupos (Fig. 14c); en los machos, solo lo logró en comparación con los grupos TS y V (Fig. 14c). Los animales inmunizados con TS o A exhibieron un nivel intermedio de control sobre los parásitos circulantes en comparación con los grupos TS+A y V, independientemente del sexo (Fig. 14c).



**Figura 14: Parasitemia en animales vacunados de ambos sexos.** Los ratones inmunizados fueron infectados por vía oral con 3000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Parasitemia entre animales inmunizados con V, TS, A y TS+A en hembras y machos (a y b, respectivamente). c) Parasitemia acumulada como el área bajo la curva (AUC) hasta el día 28 pi. Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = M$  vs. F; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\phi$   $p < 0,05 = TS+A$  vs. V y TS;  $\delta$   $p < 0,05 = TS$  y A vs. V.



Al evaluar la carga parasitaria en el corazón, el músculo esquelético y el intestino delgado, los ratones vacunados con TS+A mostraron una carga significativamente menor que el resto de los grupos, independientemente del sexo de los animales (Fig. 15a-c).

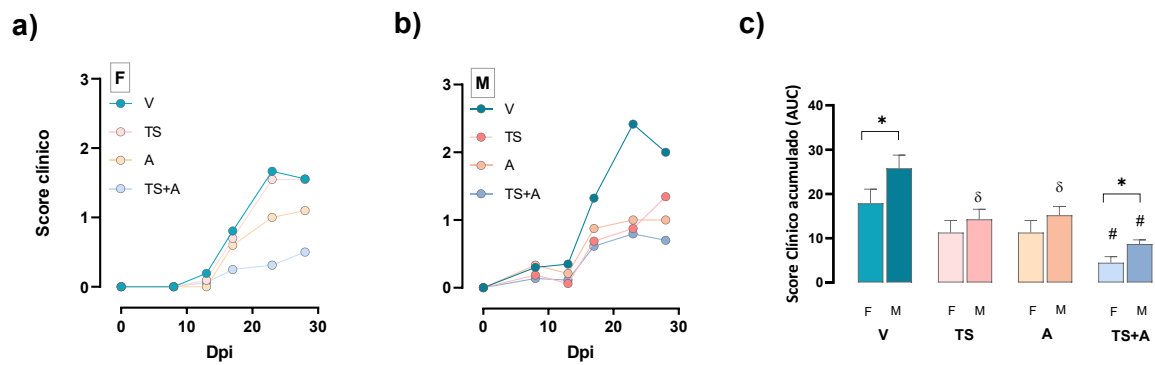


**Figura 15: Carga parasitaria en diferentes tejidos diana en animales vacunados de ambos sexos.** Carga de parásitos tisulares en corazón, intestino delgado y músculo después de 21 post-infección (a, b y c, respectivamente).

Los datos se expresan como media+SEM. #  $p < 0,05 = \text{TS+A vs. resto}$ ;  $\phi$   $p < 0,05 = \text{TS+A vs. V y TS}$ ;  $\omega$   $p < 0,05 = \text{TS+A vs. V y A}$ ;  $\delta$   $p < 0,05 = \text{TS y/o A vs. V}$ .

Dado que nuestro modelo de infección oral es no letal, las manifestaciones clínicas se registraron utilizando un sistema de puntuación previamente validado (Pacini *et al.*, 2022). Como era de esperar, los ratones inmunizados solo con el V mostraron una afectación evidente a lo largo de la fase aguda, siendo menos evidente en las hembras que en los machos (Fig. 16a-c). Curiosamente, tanto hembras como machos vacunados con TS+A mostraron el menor impacto clínico entre los grupos infectados ( $p < 0,05$ ) (Fig. 16c). De manera similar a lo que ocurre con la parasitemia, los animales inmunizados con TS o A solo exhibieron un grado intermedio de afectación clínica (Fig. 16c). Asimismo, las hembras que habían sido previamente vacunadas con TS+A mostraron niveles sistémicos más elevados de IFN- $\gamma$  e IL-17 que los machos (Fig. 17a,c).

F: Hembras / M: Machos **V** Vehículo +  **TS** Transialidasa +  **A** di-AMP-c +  **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c + 

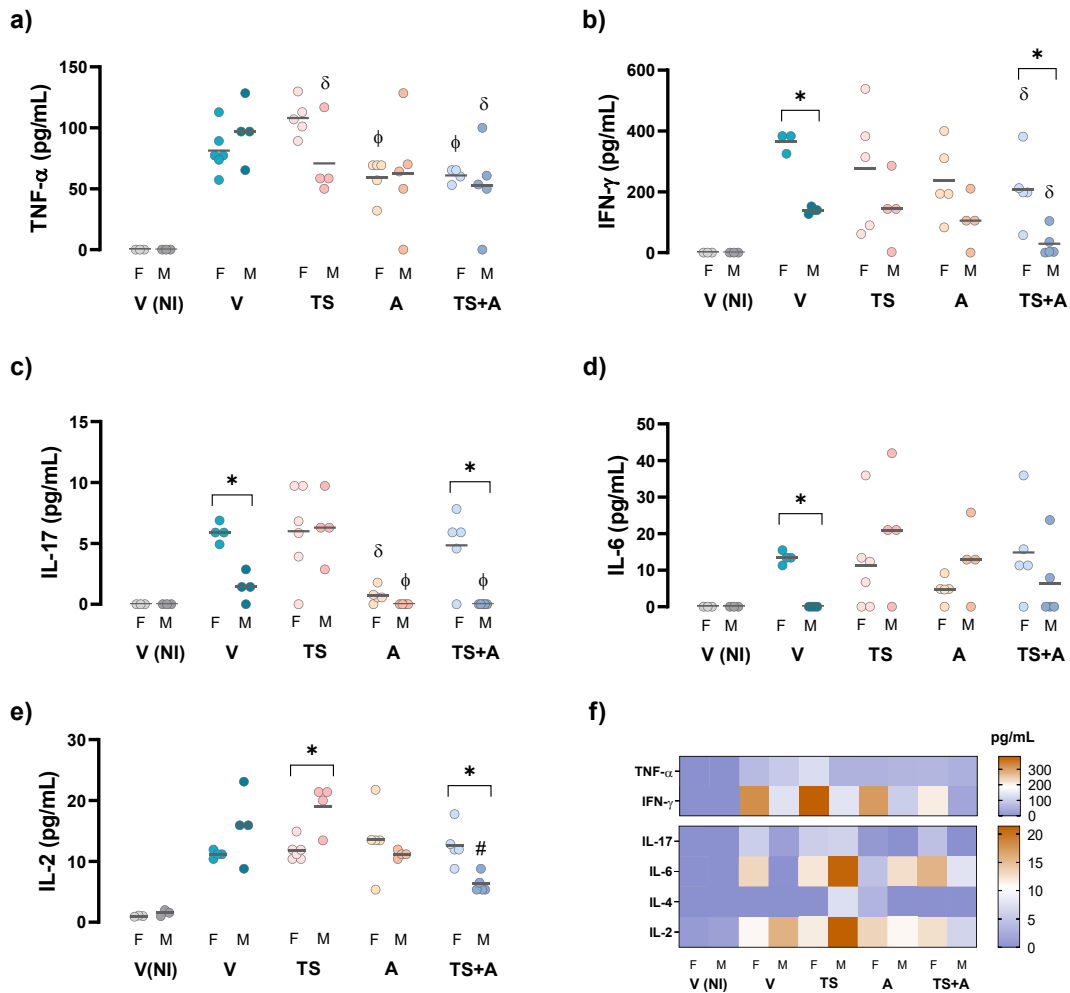


**Figura 16: Score clínico en animales vacunados de ambos sexos.** La evaluación clínica de los animales inmunizados e infectados se realizó diariamente desde el día 7 pi hasta el día 28 pi. Los animales se sometieron a un examen visual para detectar los siguientes signos: ausencia de signos (puntuación 0), piloerección (puntuación 1), postura encorvada (puntuación 1,5), secreción ocular (puntuación 2), disminución de la actividad locomotora (puntuación 2,5) y diarrea (puntuación 3). La suma de las puntuaciones observadas da la puntuación diaria de cada animal en machos y hembras (a y b, respectivamente). c) La puntuación clínica acumulada de cada grupo se evaluó como *área bajo la curva* (AUC).

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs.  $M$ ;  $\#p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\delta p < 0,05 = TS$  y  $A$  vs.  $V$ .

Continúa en la página siguiente ---

F: Hembras / M: Machos    **V(NI)** Vehículo    **V** Vehículo +    **TS** Transialidasa +    **A** di-AMP-c +    **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +



**Figura 17: Niveles de citocinas plasmáticas en animales de ambos sexos previamente vacunados e infectados por vía oral.** El perfil de citocinas plasmáticas durante la fase aguda de la infección oral en los animales vacunados se determinó mediante *Cytometric Bead Array*, de forma cuantitativa y simultánea en los grupos inmunizados. En los gráficos de puntos se muestran los valores individuales obtenidos para cada una de las citocinas evaluadas (a-e) y un mapa de calor de los niveles medios de cada uno de las citocinas, donde las concentraciones aumentan a medida que el color cambia de azul a naranja oscuro (f).

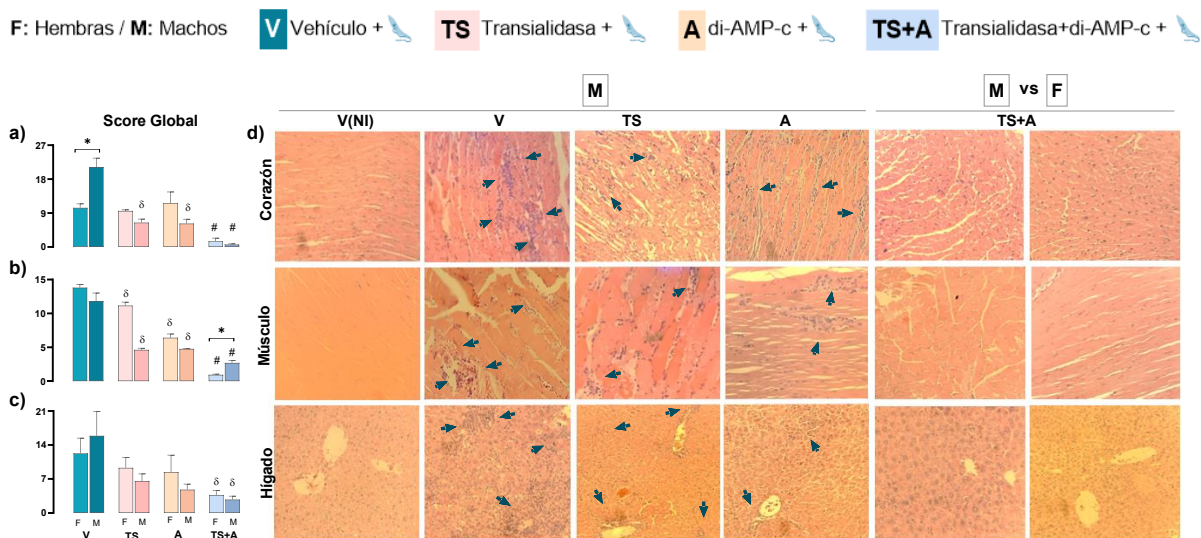
Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs.  $M$ ; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\phi$   $p < 0,05 = TS+A$  y  $A$  vs.  $V$  y  $TS$ ;  $\delta$   $p < 0,05 = TS, A$  o  $TS+A$  vs.  $V$ .

### 5.1.2.2 Dimorfismo: Evaluación del daño tisular en la fase aguda

#### 5.1.2.2.1 Histopatología y enzimas indicativas de lesión tisular

Para analizar si la vacuna atenuaba el daño tisular causado por la infección por *T. cruzi*, se evaluó la intensidad de la inflamación y la gravedad del daño tisular en miocardio, músculo esquelético y tejido hepático tras 21 días pi. Los estudios histopatológicos





realizados en el tejido cardíaco de ratones vacunados con V mostraron mayores lesiones e infiltrados en machos que en hembras (Fig. 18a y Fig. 18d, panel superior), pero estas diferencias se desvanecen en los animales vacunados previamente con TS+A, ya que se reducen significativamente a valores similares en ambos sexos. Hallazgos comparables se observaron en relación al daño histológico en músculo esquelético y en hígado (Fig. 18b,c y Fig. 18d, paneles de abajo), si bien en músculo esquelético fue algo más marcada la protección lograda en hembras.

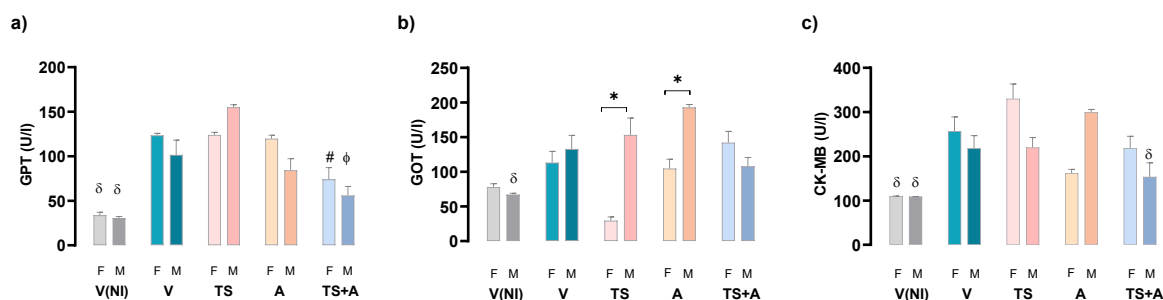


**Figura 18: Evaluación del daño tisular en animales de ambos sexos vacunados e infectados.** Análisis anatomopatológico de tejidos blanco procedentes de ratones previamente vacunados, tras 21 días de infección. Los datos se muestran como score histológico global correspondiente a: a) tejido cardíaco, b) músculo esquelético, c) hígado. Dicho score se calculó como la proporción de infiltrado inflamatorio (área infiltrada/área total) multiplicada por la puntuación asignada (1-leve-, 2-moderado- o 3-severo-). d) Imágenes representativas de tejido cardíaco de M y F teñidos con hematoxilina/eosina. Las flechas indican infiltrados inflamatorios o destrucción de tejido.

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs.  $M$ ; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\delta p < 0,05 = TS, A$  o  $TS+A$  vs.  $V$ .

La infección causó una elevación de las enzimas CK-MB, GOT y GPT durante el pico de parasitemia en los grupos de animales que recibieron el V, mientras que en el resto de los grupos tuvo un comportamiento similar, siendo los valores más bajos los del grupo inmunizado con TS+A (Fig. 19a-c). Estos resultados señalan que el daño cardíaco, muscular y hepático al momento del pico de parasitemia en el grupo TS+A era más bajo que el resto de los grupos evaluados, lo que se condice con las evaluaciones histopatológicas mostradas previamente.

F: Hembras / M: Machos    **V(NI)** Vehículo    **V** Vehículo +     **TS** Transialidasa +     **A** di-AMP-c +     **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c + 



**Figura 19: Cuantificación de enzimas de daño hepático, muscular y cardíaco.** Se determinó el nivel de distintas enzimas plasmáticas al día 21 post-infección en animales vacunados de ambos sexos: a) Glutamato piruvato transaminasa (GPT); b) Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT); c) Creatina Kinasa MB (CK-MB). Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs.  $M$ ; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\phi$   $p < 0,05 = TS+A$  vs.  $V$  y  $TS$ ;  $\delta$   $p < 0,05 = V(NI)$  o  $TS+A$  vs.  $V$ .

### 5.1.2.3 Dimorfismo: Evaluación del daño tisular y funcional en la fase crónica

#### 5.1.2.3.1 Histopatología y enzimas indicativas de lesión tisular

A diferencia de lo observado en tejidos obtenidos en fase aguda donde predominaban los infiltrados inflamatorios focales, la inflamación crónica fue de tipo difusa, lo que impidió cuantificar claramente el área. Por esta razón, la evaluación histológica se centró en la intensidad del daño tisular (leve, moderado, severo). Por otra parte, cabe aclarar que aquí no se evaluó daño hepático, ya que este se presenta principalmente durante la fase aguda. Por otra parte, dado que el parásito se establecería y persistiría en el tejido adiposo durante la fase crónica, se decidió analizar este tejido para determinar si allí se evidencia algún tipo de alteración.

El estudio histopatológico confirmó que la administración de TS+A brindó protección contra el daño tisular en los tres tejidos evaluados (corazón, músculo esquelético y tejido adiposo) independiente del sexo (Fig. 21-23).

Tal como se observa en la Fig. 21a, el tejido cardíaco de los animales vacunados con TS+A, tanto hembras como machos, presentó un score de daño tisular significativamente menor en comparación al resto de los grupos. En contraste, los animales que solo recibieron el vehículo desarrollaron miocardiopatías moderadas en ambos sexos. Es importante

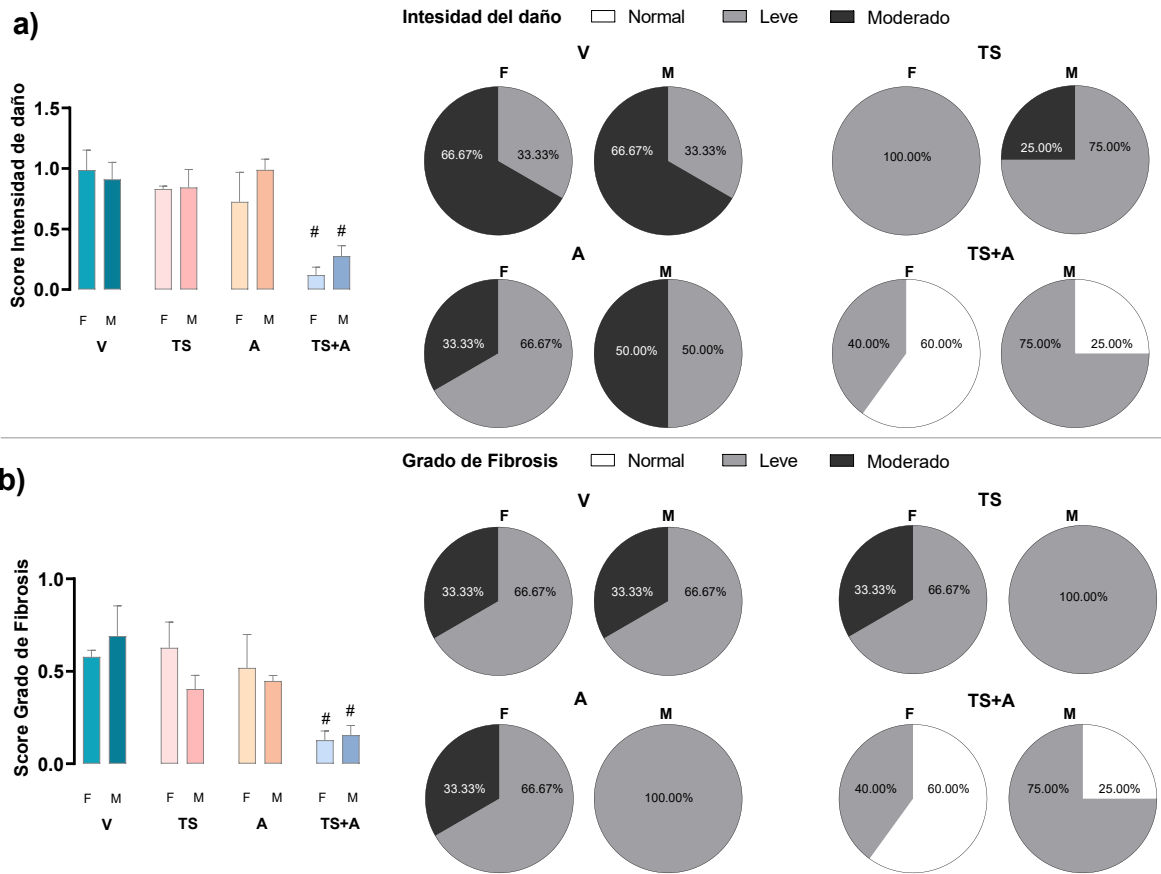
destacar que ningún animal vacunado con TS+A mostró daño tisular moderado, y un 60% de las hembras junto con un 25% de los machos de este grupo no evidenciaron signos de miocardiopatía. Estos resultados fueron consistentes con los hallazgos obtenidos en la evaluación de fibrosis (Fig. 21b).

Los estudios histopatológicos realizados en músculo esquelético mostraron una tendencia similar a lo reportado en tejido cardíaco, tanto en términos de intensidad del daño como fibrosis (Fig. 22). Llamativamente los machos del grupo V presentaron menor intensidad de infiltrados (Fig. 22a), pero mayor grado de fibrosis que las hembras del mismo grupo (Fig. 22b). De todas formas, la vacunación con TS+A, redujo significativamente la inflamación y la fibrosis en ambos sexos. De igual manera, la proporción de tejido que no presentaba daño alguno fue mayor en los TS+A (Fig. 22a,b, panel derecho).

Por último, la evaluación del tejido adiposo evidenció que la administración de la vacuna TS+A logró una mayor protección del daño tisular tanto en hembras como en machos en comparación con las demás formulaciones evaluadas (Fig. 23, panel izquierdo). Sumado a esto, el 60 % de las hembras y el 85 % de los machos presentaron tejido adiposo con características normales (Fig. 23, panel derecho).

*Continúa en la página siguiente ---*

F: Hembras / M: Machos **V** Vehículo + **TS** Transialidasa + **A** di-AMP-c + **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +







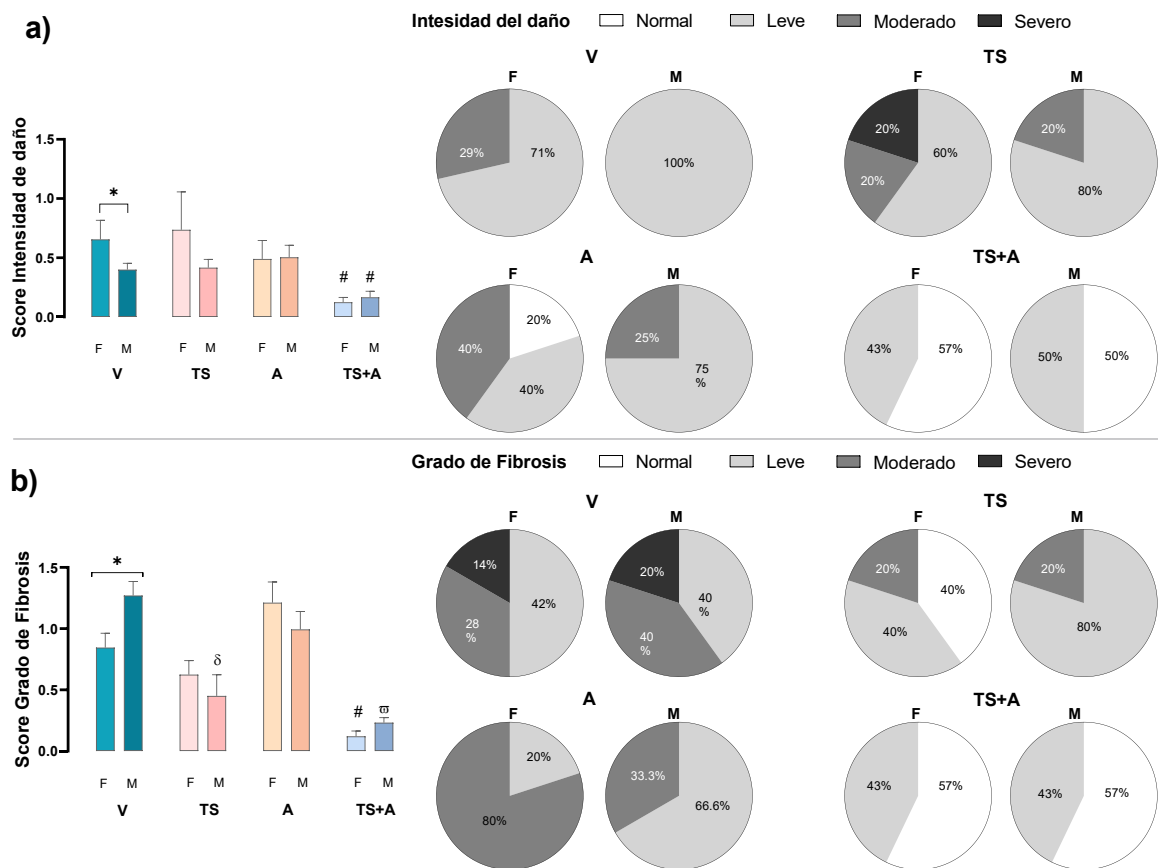
**Figura 21: Efecto de la vacunación sobre el desarrollo de miocarditis chagásica crónica en animales de ambos sexos.**

a) En el panel izquierdo, los gráficos de barras representan la media de la intensidad de los infiltrados inflamatorios en el tejido cardíaco por grupo, evaluados mediante tinción con H&E. El puntaje (Score) del daño se determinó según la magnitud del daño observado en 4-6 cortes histológicos seriados por animal. En el panel derecho, los gráficos de torta ilustran la distribución proporcional de las lesiones en cada grupo experimental.

b) En el panel izquierdo, los gráficos de barras representan la media del grado de fibrosis en el tejido cardíaco, evaluado mediante tinción con Picosirius red. El Score se calculó en función del grado de fibrosis observado en 4-6 cortes histológicos seriados por animal. En el panel derecho, los gráficos de torta representan la proporción de fibrosis en cada grupo.

Datos representativos de dos vueltas experimentales. En los gráficos de barra, los datos se expresan como media+SEM. #p<0,05 TS+A vs. resto.

F: Hembras / M: Machos    **V** Vehículo +     **TS** Transialidasa +     **A** di-AMP-c +     **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c + 



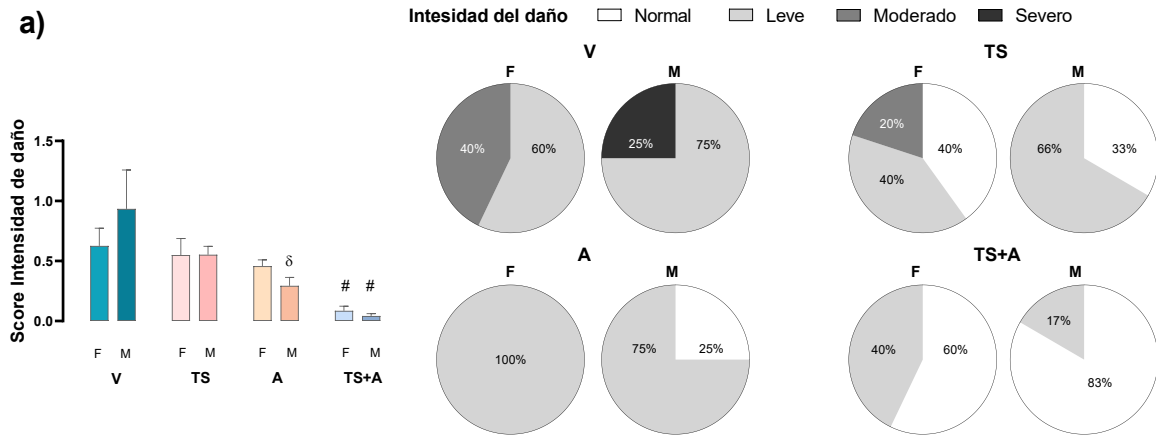
**Figura 22: Daño en músculo esquelético durante la fase crónica de la infección en animales vacunados de ambos sexos.**

a) En el panel izquierdo, los gráficos de barras representan la media de la intensidad de los infiltrados inflamatorios en músculo esquelético por grupo, evaluados mediante tinción con H&E. El puntaje (Score) del daño se determinó según la magnitud del daño observado en 4-6 cortes histológicos seriados por animal. En el panel derecho, los gráficos de torta ilustran la distribución proporcional de las lesiones en cada grupo experimental.

b) En el panel izquierdo, los gráficos de barras representan la media del grado de fibrosis en músculo esquelético, evaluado mediante tinción con Picrosirius red. El Score se calculó en función del grado de fibrosis observado en 4-6 cortes histológicos seriados por animal. En el panel derecho, los gráficos de torta representan la proporción de fibrosis en cada grupo.

Datos representativos de dos vueltas experimentales. Datos representativos de dos vueltas experimentales. En los gráficos de barra, los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs.  $M$ ; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\square p < 0,05 = TS+A$  vs.  $V$  y  $A$ ;  $\delta p < 0,05 = TS$  vs.  $V$ .

F: Hembras / M: Machos **V** Vehículo + **TS** Transialidasa + **A** di-AMP-c + **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +



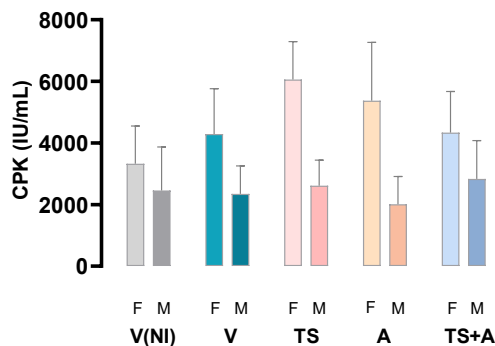
**Figura 23: Evaluación del daño en tejido adiposo durante la fase crónica en animales vacunados e infectados en fase crónica.**

a) Los gráficos de barras representan la media de la intensidad de los infiltrados inflamatorios en tejido adiposo por grupo, evaluados mediante tinción con H&E. El puntaje (Score) del daño se determinó según la magnitud del daño observado en 4-6 cortes histológicos seriados por animal. En el panel derecho, los gráficos de torta ilustran la distribución proporcional de las lesiones en cada grupo experimental.

Datos representativos de dos vueltas experimentales. En los gráficos de barra, los datos se expresan como media+SEM. #p<0,05= TS+A vs. resto; δ p<0,05= A vs. V.

Como puede observarse en la Fig. 24, no se existen diferencias significativas en relación a los niveles de la enzima muscular cardiaca CPK entre los grupos vacunados, si bien los machos tendieron a tener valores inferiores que las hembras (Valores normales: 1000-9000 IU/mL para machos y 1000-14000 IU/mL para hembras BALB/c según bibliografía) (Kurtz and Travlos, 2018).

F: Hembras / M: Machos **V(NI)** Vehículo **V** Vehículo + **TS** Transialidasa + **A** di-AMP-c + **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +



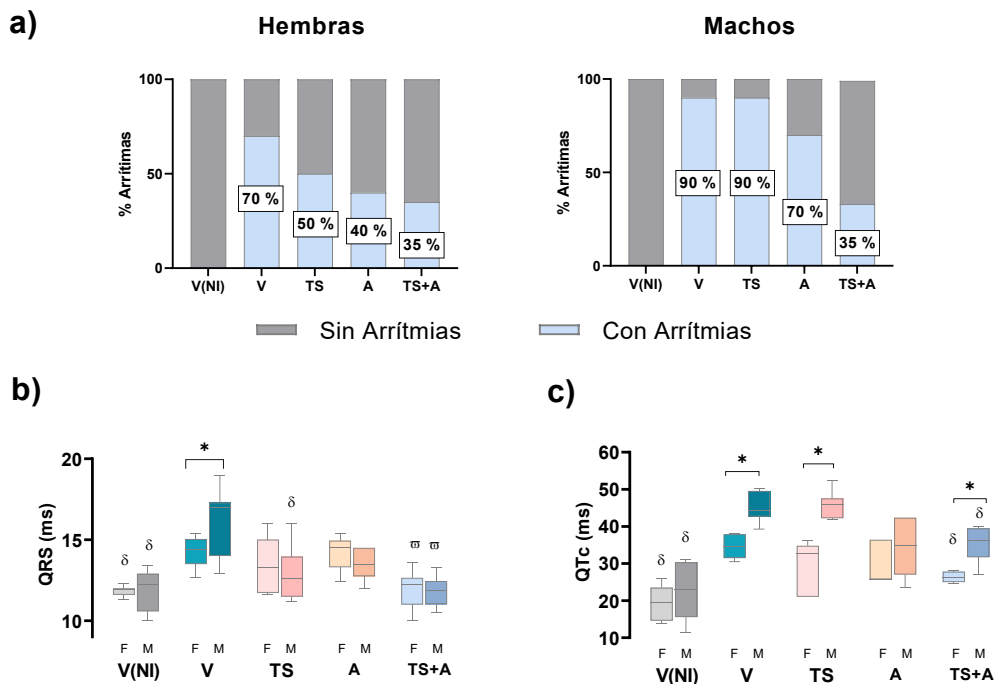
**Figura 24: Niveles de Creatina Fosfo-Kinasa (CPK) plasmática en la fase crónica de la infección.** La enzima CPK plasmática fue evaluada al día 110 post-infección en ratones vacunados de ambos sexos. Datos representativos de dos vueltas experimentales. Los datos se expresan como media+SEM.

#### 5.1.2.3.2 Evaluación funcional de la actividad cardíaca mediante electrocardiografía

Si bien se sabe que la miocarditis murina no refleja exactamente todas las alteraciones descritas en la MCC humana, se ha verificado que los ratones BALB/c infectados con Tulahuen presentan alteraciones electrocardiográficas durante el período crónico y que, en particular, la prolongación del intervalo QTc es un claro indicador de daño histológico y funcional (Eickhoff *et al.*, 2010).

Teniendo en consideración lo anterior, se evaluó mediante electrocardiografía la presencia de anomalías eléctricas tales como alteraciones en el ritmo cardíaco (arritmias) o bloqueos de rama. El resultado del análisis de los ECGs reveló que los animales que habían sido previamente inmunizados con TS+A presentaron una menor proporción de alteraciones electrocardiográficas en comparación con aquellos que habían recibido V y TS, independientemente del sexo del animal. Incluso, en machos esta diferencia también se verificó en relación al grupo A (Fig. 25a).

Los machos del grupo V presentaron valores más pronunciados del QRS que las hembras (Fig. 25b), reflejando un mayor compromiso cardíaco. Sin embargo, la administración de TS+A evitó el incremento del complejo QRS que se observa en animales infectados no vacunados, y de manera similar en ambos sexos. Asimismo, la administración de TS+A mantuvo los valores del QTc dentro de los parámetros considerados normales en las hembras, mientras que en los machos solo evitó de manera parcial el aumento del mismo (Fig. 25c). Cabe mencionar que los animales que recibieron TS o A exhibieron un comportamiento intermedio entre lo observado para los grupos V y TS+A en términos de alteraciones eléctricas globales.



**Figura 25: Alteraciones funcionales cardíacas en ratones vacunados de ambos sexos durante la fase crónica de la infección.** Las evaluaciones se realizaron a los 110 días post-infección mediante un electrocardiograma especial para ratones. a) Porcentaje de animales con arritmias registrados en cada grupo en hembras (izquierda) y machos (derecha). b) Complejo QRS expresado en milisegundos. c) Intervalo QT corregido según la frecuencia cardíaca aplicando la fórmula descrita en Mitchell y col. (Mitchell *et al.*, 1998), expresados en milisegundos. Datos representativos de dos vueltas experimentales.

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs.  $M$ ;  $\delta$   $p < 0,05 = V(NI)$ ,  $TS$  o  $TS+A$  vs.  $V$ ;  $\omega$   $p < 0,05 = TS+A$  vs.  $V$  y  $A$ .

### 5.1.2.3.3 Análisis del perfil de citocinas en plasma y tejido cardíaco durante la fase crónica

Al evaluar las citocinas presentes en el plasma de los animales luego de 110 días pi, se constató que todos los animales infectados que recibieron alguna de las formulaciones presentaron un aumento generalizado de todas las citocinas en comparación con el grupo V(NI) (Fig. 26a-h). Cabe mencionar que el nivel de citocinas de los animales infectados y vacunados con TS+A fue similar al de los que solo recibieron el V, mientras que los animales que recibieron TS o A, tendieron a mostrar un aumento por encima del resto de los grupos. Al comparar entre sexos, solo se observaron diferencias significativas en relación a IL-4 en los animales vacunados con TS+A, en donde se evidenciaron niveles superiores en las hembras, mientras que esto no se observó en el grupo V (Fig. 26f).

F: Hembras / M: Machos

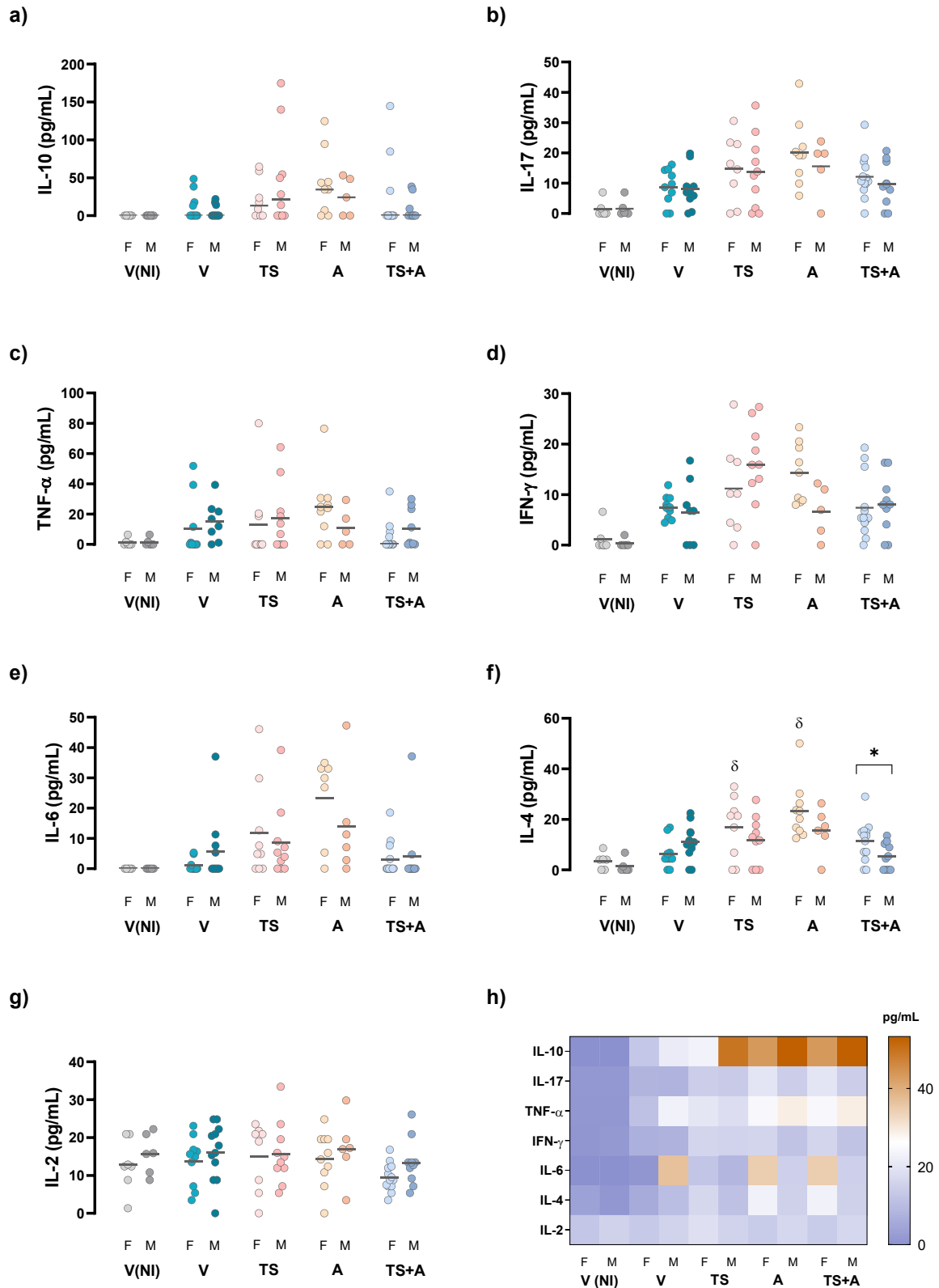
V(NI) Vehículo

V Vehículo +

TS Transialidasa +

A di-AMP-c +

TS+A Transialidasa+di-AMP-c +



**Figura 26: Perfil de citocinas plasmáticas en animales vacunados de ambos sexos durante la fase crónica de la infección.** a-g) Perfil de citocinas en el plasma de animales vacunados tras 110 días de infección oral. Las mismas se determinaron en plasma mediante *Cytometric Bead Array*. h) Mapa de calor que muestra la abundancia media de cada citocina/grupo. Datos representativos de dos vueltas experimentales.

Los datos en los gráficos de puntos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05$  = F vs. M;  $\delta$   $p < 0,05$  = A o TS vs. V;  $\omega$   $p < 0,05$  = TS+A vs. V y A.

A fin de evaluar si la vacuna inducía un cambio en el perfil de citocinas a nivel cardíaco durante la fase crónica, se avaluó la expresión de distintos ARNm en tejido miocárdico obtenido a los 110 días pi. Los resultados mostraron que independientemente del sexo, los animales infectados a los que solo se le había administrado el V, incrementaban en el miocardio los niveles de expresión de IL-1 $\beta$ , IL-17A, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  respecto de los no infectados no vacunados V(NI). Tanto machos como hembras que recibieron la vacuna TS+A, mostraron niveles significativamente menores de TGF- $\beta$  respecto del grupo V. Una tendencia similar se observó en la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sin embargo, solo alcanzó significado estadístico en el caso de los machos (V vs. TS+A  $p < 0.05$ ). Respecto de los animales inmunizados con TS+A, solo se observó que los niveles de IL-1 $\beta$  eran menores en machos que en hembras (Fig. 27a-f).

*Continúa en la página siguiente ---*

F: Hembras / M: Machos

V(NI) Vehículo

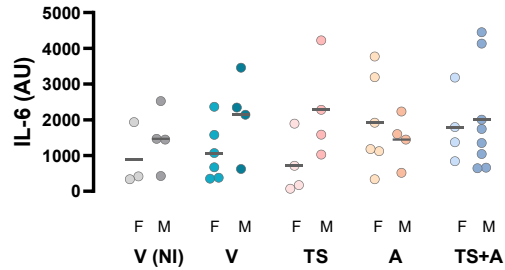
V Vehículo +

TS Transialidasa +

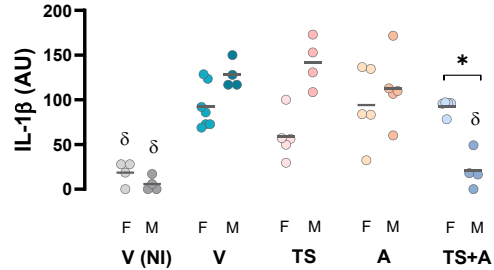
A di-AMP-c +

TS+A Transialidasa+di-AMP-c +

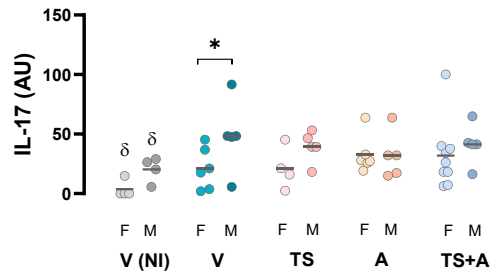
a)



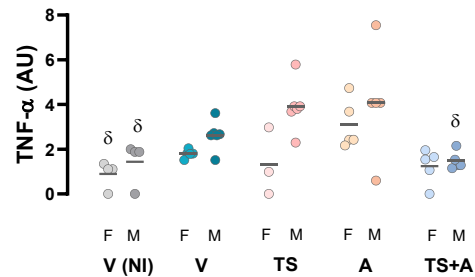
b)



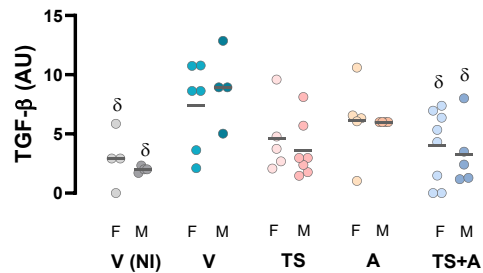
c)



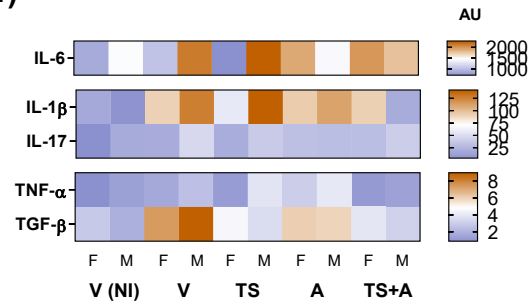
d)



e)



f)



**Figura 27: Perfil de citocinas en tejido cardíaco de animales vacunados de ambos sexos durante la fase crónica de la infección.** La expresión de citocinas se evaluó mediante RT-qPCR en tejido cardíaco obtenido al día 110 post-infección. a-e) Perfil de expresión del ARNm de citocinas. f) Mapa de calor que muestra la abundancia media del ARNm de cada citocina/grupo, donde las concentraciones aumentan a medida que el color cambia de azul a naranja oscuro. Datos representativos de dos vueltas experimentales.

Los datos en los gráficos de puntos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05$  = F vs. M;  $\delta$   $p < 0,05$  = V(NI) o TS+A vs. V.

## **5.2 CAPÍTULO II**

### **Evaluación del rol de la testosterona en la inmunogenicidad y eficacia vacunal.**

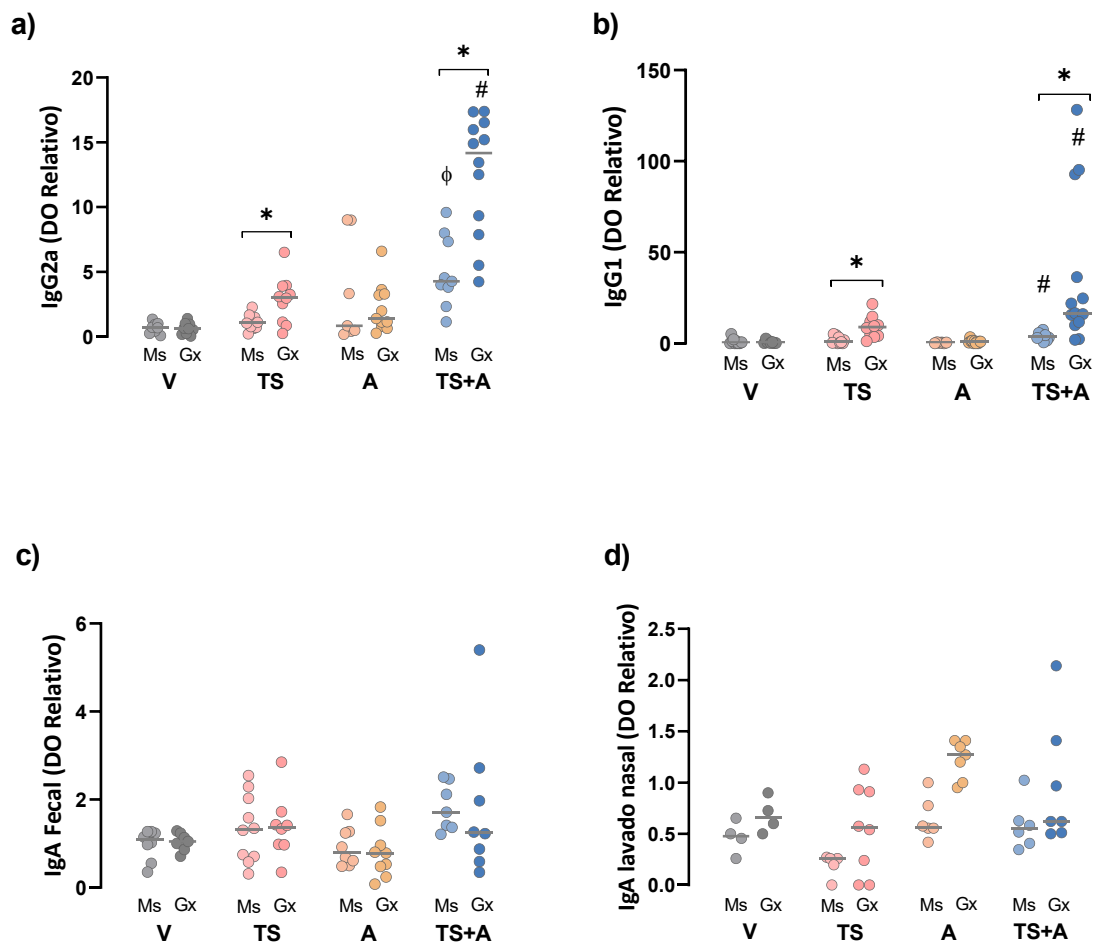
Dado que los machos presentan una mayor susceptibilidad a la infección y una inmunogenicidad con características diferentes a las de las hembras, se evaluó el posible rol de la testosterona -como factor regulatorio extrínseco- que pudiese incidir en dichas diferencias. Para examinar esta cuestión, los ratones machos fueron castrados quirúrgicamente (Gx) u operados de forma simulada (Ms) un mes antes de comenzar con la vacunación. Para corroborar que la castración disminuía los niveles de testosterona en menos de 0,03 ng/mL, se chequeó el nivel de la hormona en un grupo de animales castrados en forma previa a la inmunización. Los procedimientos para evaluar la inmunogenicidad y la eficacia protectora se llevaron a cabo siguiendo el mismo esquema que en la Fig. 6.

#### **5.2.1 Rol de la testosterona en la inmunogenicidad vacunal**

##### **5.2.1.1 Inmunogenicidad: Respuesta Humoral específica**

Cuando se comparó la respuesta humoral sistémica desencadenada por la administración de TS+A entre Gx y Ms, se observó que los animales Gx mostraron una mejor respuesta que los Ms en términos de producción de IgG2a e IgG1 específicas (Fig. 28a-b), sin diferencias en la producción de IgA en mucosas, estimada a partir de muestras fecales o de lavado nasal (Fig. 28c-d). El grupo Gx-TS presentó también un incremento en la respuesta de IgG2a e IgG1, pero menor que la observada en los Gx-TS+A (Fig. 28a-b). Por otra parte, si bien los niveles de IgA tienden a incrementarse en los grupos vacunados con TS+A respecto del resto, no se observan diferencias entre los animales Gx y Ms, independientemente de la formulación recibida (Fig. 28d).

Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados V Vehículo TS Transialidasa A di-AMP-c TS+A Transialidasa + di-AMP-c



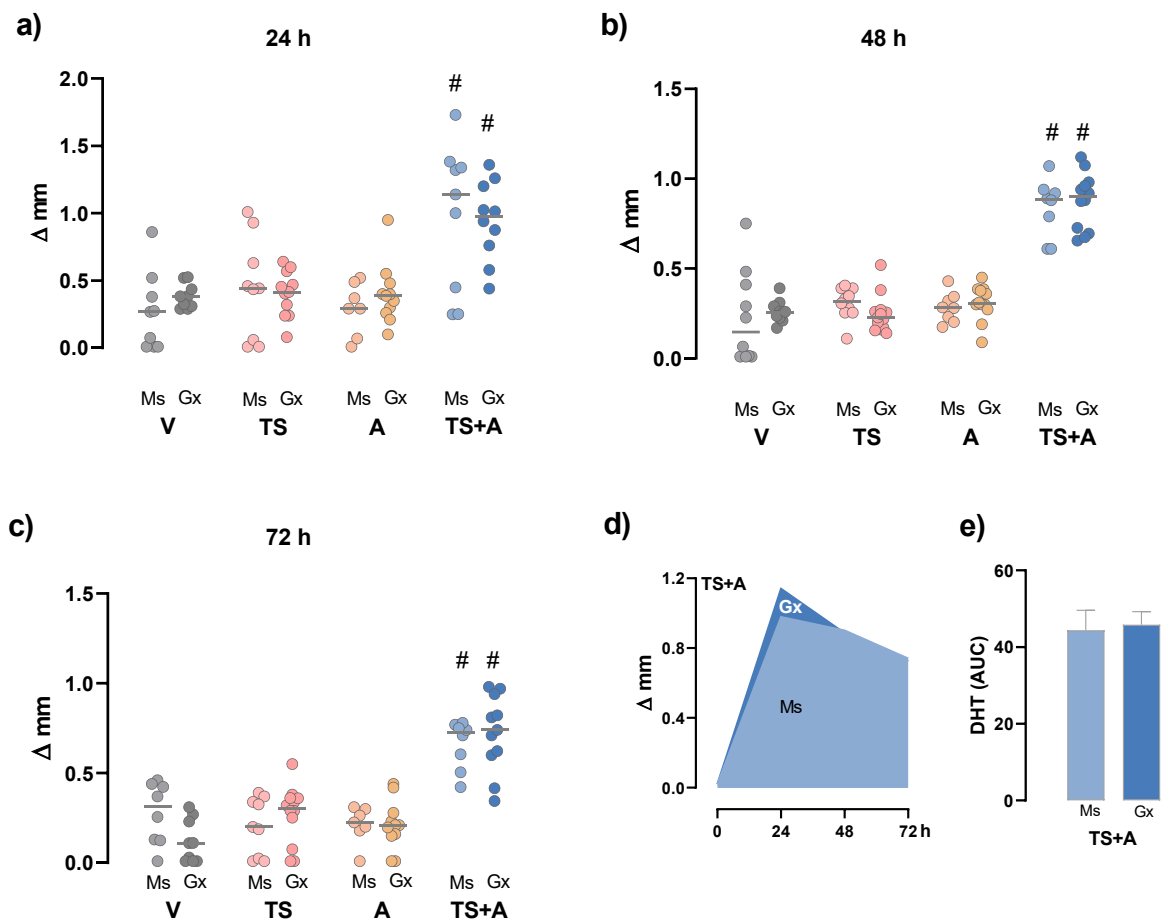
**Figura 28: Respuesta humoral específica contra la TS gatillada por la inmunización en ratones Ms y Gx.** La inmunogenicidad se analizó 15 días después de completar el esquema de vacunación con V, TS, A o TS+A. Se analizó el plasma para detectar anticuerpos IgG2a e IgG1 específicos de TS (a y b, respectivamente), mientras que las muestras de heces y lavado nasal se analizaron para detectar anticuerpos IgA específicos de TS (c y d, respectivamente).

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M; #  $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto; φ  $p < 0,05 = TS+A$  vs. V y TS.

### 5.2.1.2 Inmunogenicidad: Respuesta Celular específica y citocinas plasmáticas

Mientras que los machos inmunizados con TS+A incrementaron el grosor de la almohadilla plantar tras el desafío con TS tanto a las 24, 48 como a las 72 horas, no se evidenciaron diferencias entre Gx y Ms (Fig. 29a-e).

Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados V Vehículo TS Transialidasa A di-AMP-c TS+A Transialidasa + di-AMP-c

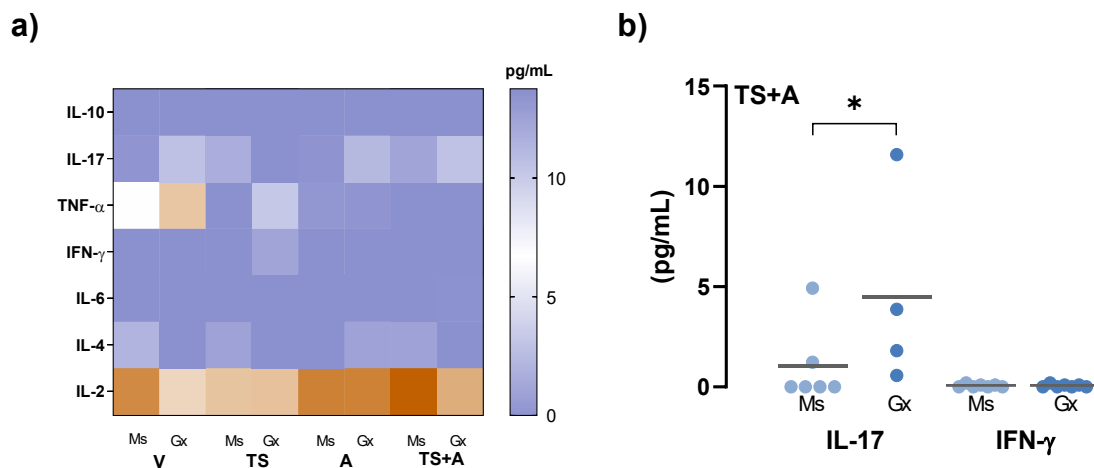


**Figura 29: Respuesta celular específica contra la TS gatillada por la inmunización en ratones Ms y Gx.** La inmunogenicidad celular específica se analizó mediante una prueba de hipersensibilidad de tipo retardada (DHT) 15 días después de completar el esquema de vacunación con V, TS, A o TS+A. Tras la inoculación de 5  $\mu$ g de TS en la almohadilla plantar, se midió el espesor de la misma antes y después de 24, 48 y 72 horas post-inoculación. Los valores se informan como  $\Delta$  (en mm) (a, b y c, relativamente). d) Representación de la variación de la DHT ( $\Delta$ , en mm) entre los grupos Gx y Ms vacunados con TS+A durante el período evaluado. e) Valores del AUC para los grupos Gx y Ms vacunados con TS+A, informados como área bajo la curva (AUC).

Los datos se expresan como media+SEM. #  $p < 0.05 =$  TS+A vs. resto.

La evaluación de la producción de citocinas en ausencia de testosterona, solo evidenció un incremento significativo en los niveles plasmáticos de IL-17, mientras que, al contrario de lo que se esperaba (dado que esta citocina incrementa la respuesta celular), los niveles de IFN- $\gamma$  fueron prácticamente indetectables tanto en los animales Gx como en los Ms (Fig. 30a,b).

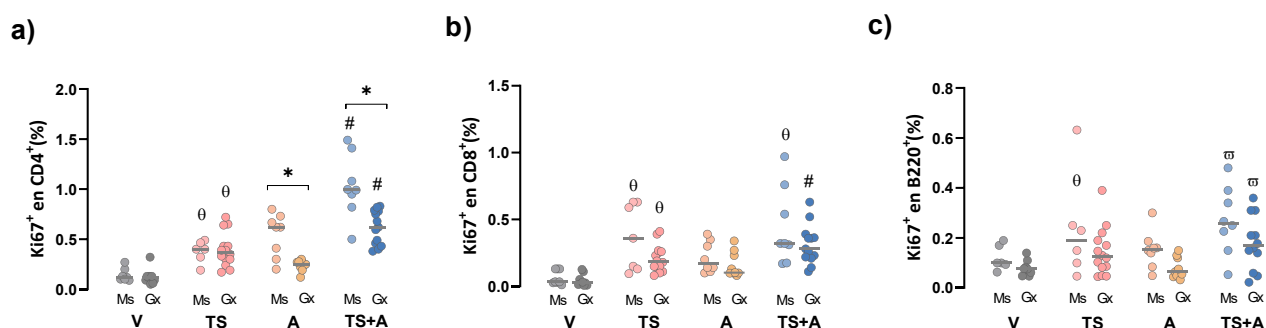
Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados V Vehículo TS Transialidasa A di-AMP-c TS+A Transialidasa + di-AMP-c



**Figura 30: Perfil de citocinas provocada por la inmunización en animales machos Ms y Gx.** El perfil de citocinas plasmáticas se analizó mediante *Cytometric Bead Array* 15 días luego de finalizado el esquema de inmunización. Los resultados se muestran como mapa de calor, donde las concentraciones medias de citocinas en plasma aumentan a medida que el color cambia de azul a naranja oscuro (a). Valores individuales de IL-17 e IFN- $\gamma$  en plasma de machos Ms y Gx inmunizados con TS+A (b). Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M.

Por otra parte, la gonadectomía indujo en los animales inmunizados con TS+A y A una disminución significativa en la proliferación de los linfocitos T CD4+ esplénicos en comparación con lo observado en el respectivo grupo Ms (Fig. 31a). Si bien se observa una tendencia similar en cuanto a la proliferación de los linfocitos T CD8+ y los B220+, esta disminución no llega a ser significativa (Fig. 31b-c).

Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados V Vehículo TS Transialidasa A di-AMP-c TS+A Transialidasa + di-AMP-c



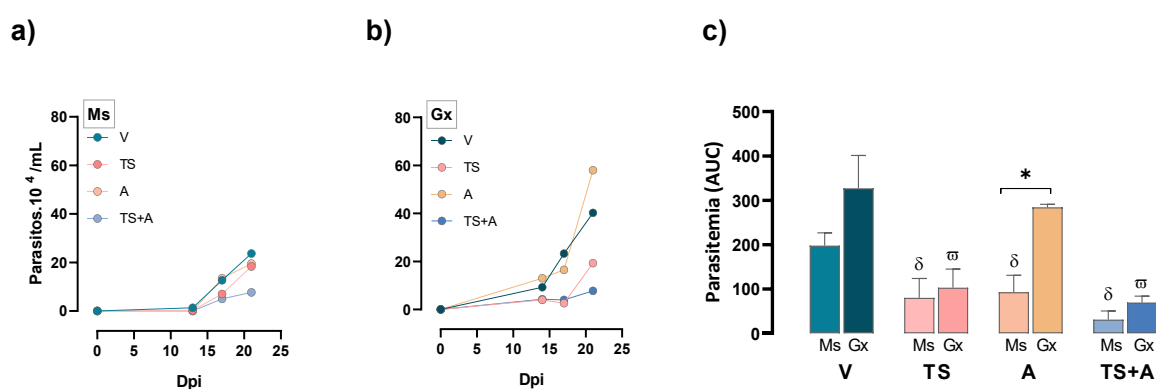
**Figura 31: Análisis de la proliferación linfocitaria en ausencia de testosterona.** La proliferación se estimó como la frecuencia de linfocitos Ki67+ en las siguientes poblaciones esplénicas: a) T CD4+, b) T CD8+, c) B220+. Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto; □ $p < 0,05 = TS+A$  vs. V y A; θ $p < 0,05 = TS$  o  $TS+A$  vs. V.

## 5.2.2 Rol de la testosterona sobre la protección vacunal

### 5.2.2.1 Carga parasitaria y Score clínico

Los animales Gx vacunados con TS, A o TS+A tienden a aumentar las parasitemias al día 21 pi, si bien es evidente que tanto los Gx como los Ms que recibieron TS+A logran el mejor nivel de protección (Fig. 32a-c).

Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados **V** Vehículo + **TS** Transialidasa + **A** di-AMP-c + **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +

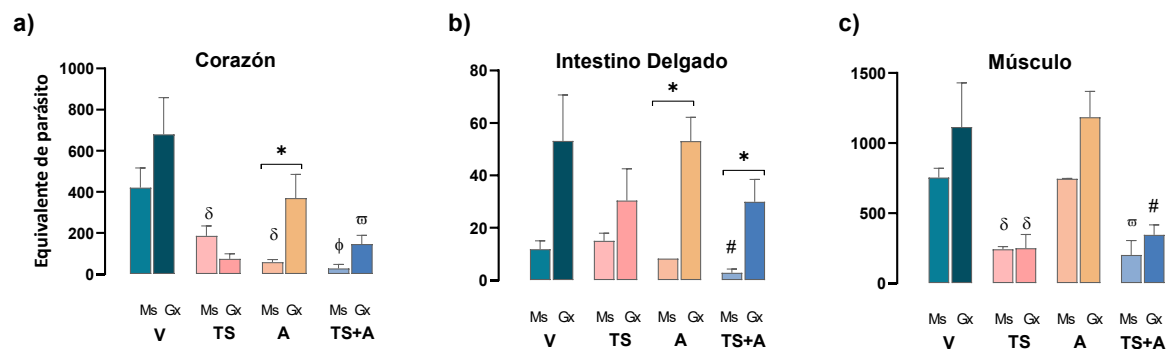


**Figura 32: Parasitemia en machos Gx y Ms vacunados.** Los ratones inmunizados fueron infectados por vía oral con 3000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Parasitemia entre animales de Ms y Gx inmunizados con V, TS, A y TS+A (a y b, respectivamente). c) Parasitemia acumulada hasta el día 21 post-infección expresada como área bajo la curva (AUC).

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M;  $\square p < 0,05 = TS+A$  o TS vs. V y A;  $\delta p < 0,05 = TS, A$  o TS+A vs. V.

Estos resultados se vieron reforzados por los datos obtenidos a partir de las qPCR realizadas en distintos tejidos, donde se evidenció que la ausencia de testosterona estaba asociada a un incremento en la carga parasitaria tisular, independientemente de la formulación vacunal recibida. Nuevamente, el mejor control de la carga parasitaria se observó en los grupos que recibieron TS+A, y en menor medida los que solo recibieron TS. Los animales Gx-TS+A tienden a ser menos efectivos en controlar la carga parasitaria en corazón y músculo esquelético que los Ms-TS+A, mientras que se evidencian diferencias significativas en el intestino delgado (Fig. 33a-c).

Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados **V** Vehículo + **TS** Transialidasa + **A** di-AMP-c + **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +

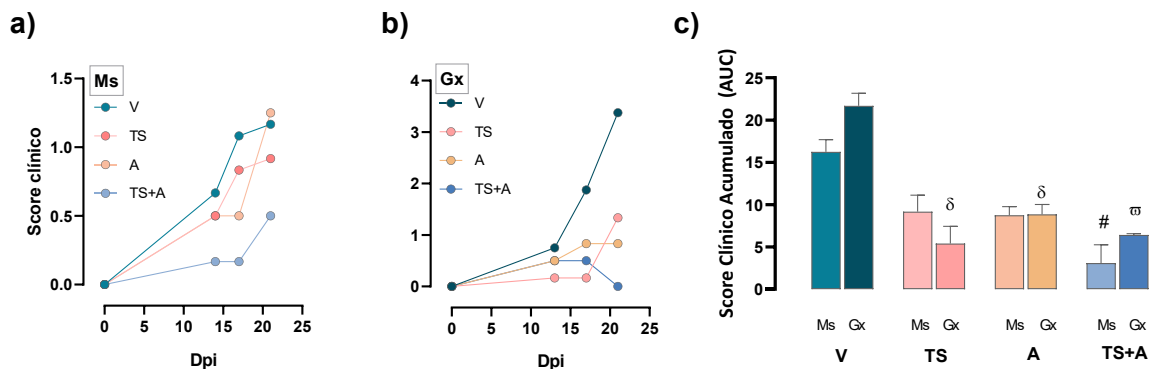


**Figura 33: Carga parasitaria en diferentes tejidos diana en machos Ms y Gx vacunados.** Carga de parásitos tisulares en: a) corazón, b) intestino delgado y c) músculo a los 21 días post-infección. Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\omega p < 0,05 = TS+A$  vs. V y A;  $\delta p < 0,05 = TS$  o A vs. V;  $\phi p < 0,05 = TS+A$  vs. V y TS.

En cuanto al curso clínico de la infección, si bien la gonadectomía tendió a aumentar el score clínico en los grupos que recibieron V y en el TS+A, en ningún caso se observaron diferencias significativas entre animales Gx y Ms (Fig. 34a-c).

Continúa en la página siguiente ---

Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados **V** Vehículo + **TS** Transialidasa + **A** di-AMP-c + **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +



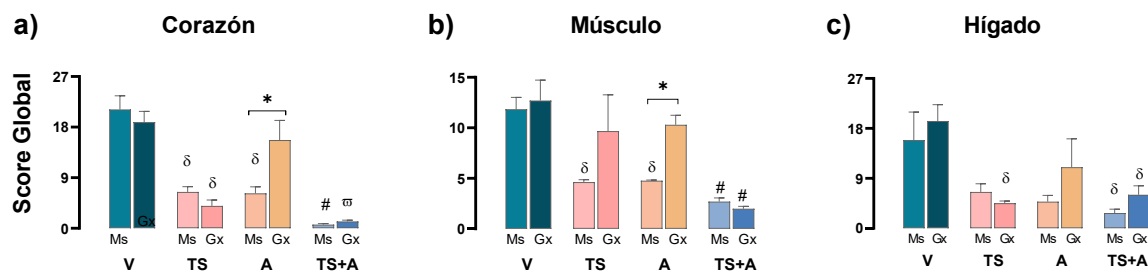
**Figura 34: Score clínico en machos Ms y Gx vacunados e infectados.** La evaluación clínica de los animales inmunizados e infectados se realizó diariamente desde el día 13 hasta el día 21 post-infección. Los animales fueron examinados en relación a la ausencia o presencia de los siguientes signos: ausencia de signos (puntuación 0), piloerección (puntuación 1), postura encorvada (puntuación 1,5), secreción ocular (puntuación 2), disminución de la actividad locomotora (puntuación 2,5) y diarrea (puntuación 3). La suma de las puntuaciones observadas da la puntuación diaria de cada animal en Ms y Gx (a y b, respectivamente). c) La puntuación clínica acumulada de cada grupo se evaluó como *área bajo la curva* (AUC).

Los datos se expresan como media+SEM. #p<0,05= TS+A vs. resto; <sup>□</sup>p<0,05= TS+A vs. V y A; <sup>δ</sup>p<0,05= TS o A vs. V.

### 5.2.2.2 Evaluación del daño tisular y citocinas en ausencia de testosterona

El análisis histológico realizado en tejidos obtenidos tras 21 días pi, mostró que los machos Gx y Ms inmunizados con TS y TS+A presentaban un menor daño tisular que los respectivos grupos V, mientras que, por el contrario, se observó un aumento del daño tisular en el grupo Gx que solo había sido inmunizado con A. Por otra parte, los animales TS+A, independientemente de si habían sido o no gonadectomizados, mostraron en corazón, músculo e hígado un menor score de daño que el resto de los grupos (Fig. 35a-c).

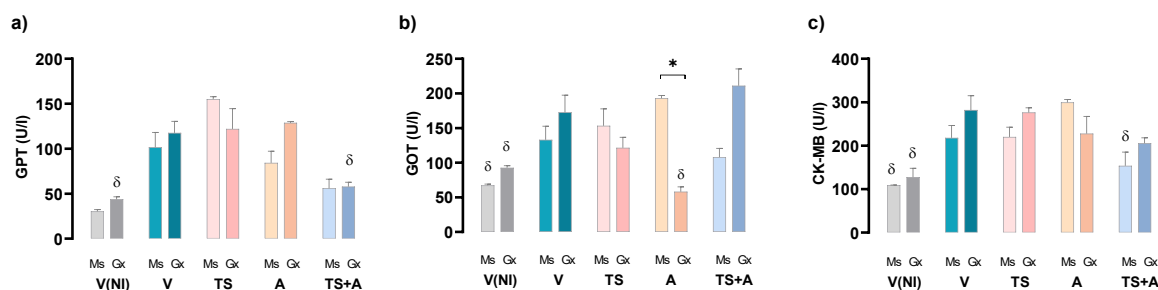
Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados **V** Vehículo + **TS** Transialidasa + **A** di-AMP-c + **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +



**Figura 35: Evaluación del daño tisular en animales macho Gx y Ms vacunados e infectados:** Análisis anatomopatológico de secciones histológicas de distintos órganos obtenidos al día 21 post-infección. Los datos se muestran como un score histológico global correspondiente a tejido cardíaco (a), músculo esquelético (b) e hígado (c), que se calculó como la proporción de infiltrado inflamatorio (área infiltrada/área total) multiplicada por la puntuación de severidad asignada (1-leve-, 2-moderado- o 3-severo).

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\delta p < 0,05 = TS+A$  vs. V y A;  $\delta p < 0,05 = TS, A$  o  $TS+A$  vs. V.

Ms: Machos sham / Gx: Machos castrados **V(NI)** Vehículo **V** Vehículo + **TS** Transialidasa + **A** di-AMP-c + **TS+A** Transialidasa+di-AMP-c +



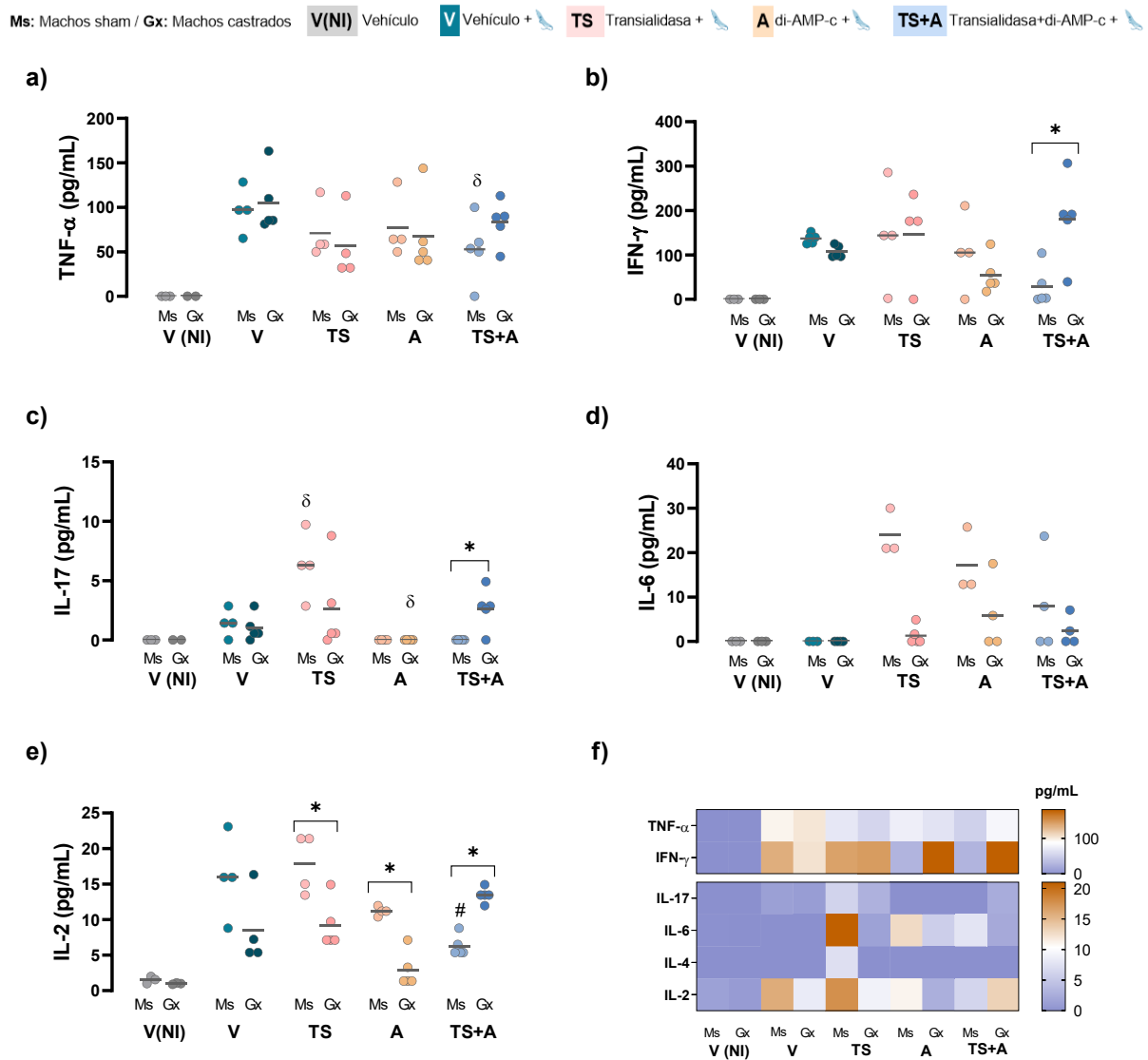
**Figura 36: Enzimas de daño hepático, muscular y cardíaco en machos Gx y Ms.** Niveles de enzimas plasmáticas al día 21 post-infección en animales Gx y Ms vacunados: a) Glutamato piruvato transaminasa (GPT); b) Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT); c) Creatina Kinasa MB (CK-MB).

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M;  $\delta p < 0,05 = V(NI), A$  o  $TS+A$  vs. V.

La ausencia de testosterona no modificó de manera significativa el nivel de las enzimas de daño cardíaco, muscular y hepático en la fase aguda de la infección, independientemente de la formulación vacunal recibida (con excepción de GOT entre los grupos Gx-A y Ms-A). Cabe destacar que los valores de GPT y CK-MB en los grupos tratados con TS+A se mantienen en el rango de los valores normales (Fig. 36a,c).

Con el fin de verificar si durante el curso de la infección se presentaban cambios en el perfil de citocinas en ausencia de testosterona, las mismas se analizaron en plasma. Los animales del grupo Gx-TS+A mostraron un aumento en los niveles de IFN- $\gamma$  acompañado de

un ligero incremento en IL-17 e IL-2 en relación a los Ms-TS+A. Particularmente, pudo observarse que IL-2 disminuyó visiblemente en los grupos Gx-V, -TS y -A (Fig. 37<sup>a-f</sup>). No se observaron diferencias en IL-4 (Fig.37f).



**Figura 37: Perfil de citocinas plasmáticas en animales Ms y Gx durante la fase aguda.** Se realizó la cuantificación de distintas citocinas al día 21 post-infección mediante *Cytometric Bead Array*. (a-e). Mapa de calor representativo de las medias obtenidas para cada citocina (f). Datos representativos de dos vueltas experimentales.

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M; # $p < 0,05 = TS+A$  vs. resto;  $\delta p < 0,05 = TS, A$  o  $TS+A$  vs. V.

## **5.3 CAPÍTULO III**

### **Análisis de la dinámica de las poblaciones reguladoras innatas y adaptativas en animales inmunizados y desafiados con *T. cruzi*.**

El análisis de la dinámica de las poblaciones reguladoras, tanto innatas como adaptativas, en el contexto de la inmunización y el desafío con *T. cruzi*, es fundamental para comprender los mecanismos inmunológicos intrínsecos que median la protección o la susceptibilidad frente a esta infección. Las células reguladoras, como las MDSCs y las Tregs, desempeñan un papel clave en la modulación de la respuesta inmunitaria, controlando la inflamación y evitando el daño tisular excesivo. Estudiar cómo estas poblaciones se comportan tras la inmunización y el posterior desafío con el parásito puede aportar información crucial para el desarrollo de vacunas y terapias más efectivas contra la ECh.

#### **5.3.1 Células supresoras de origen mieloide en animales de ambos sexos vacunados e infectados**

Las vacunas podrían inducir, en paralelo a una respuesta de memoria, una respuesta regulatoria que ayude a prevenir reacciones exageradas del sistema inmunitario tras el encuentro con el patógeno, evitando daños a los tejidos, así como también reacciones potencialmente autoinmunes.

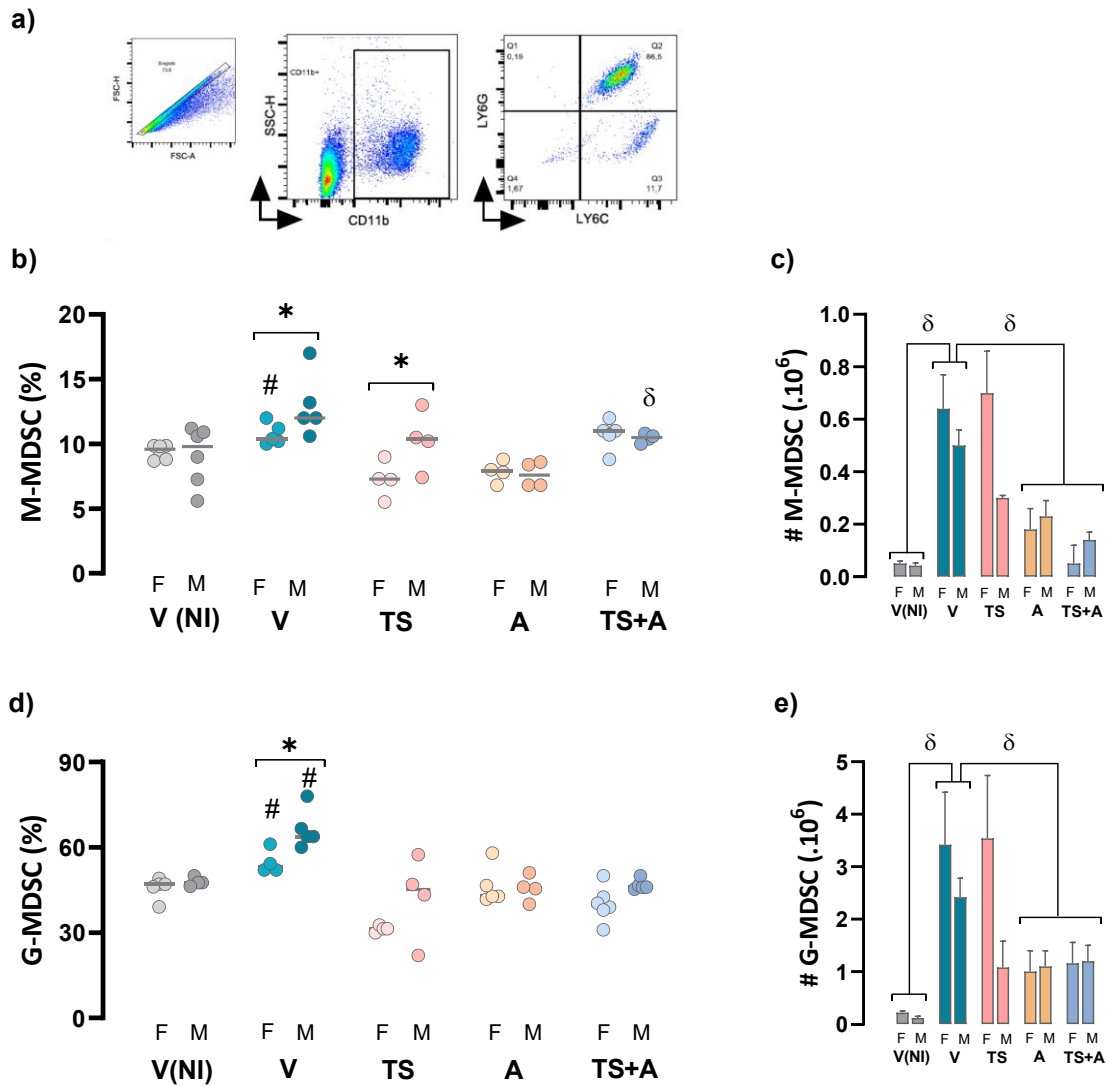
Para analizar la influencia de las formulaciones vacunales sobre la dinámica de la respuesta reguladora intrínseca, se evaluó la frecuencia y número absoluto de las MDSCs esplénicas y la frecuencia de MDSCs circulantes en ambos sexos durante el curso de la infección. Dado que las MDSCs se desarrollan principalmente en contextos inflamatorios, se agregó un grupo al que se le administró el V, pero que no se infectó (V-(NI)), como control interno.

### 5.3.1.1 Células supresoras de origen mieloide esplénicas

La estrategia de *gating* y los resultados de la evaluación de las MDSCs esplénicas se muestran en la Fig. 38a-e. Tanto la frecuencia como el número absoluto de las M-MDSCs (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>) y G-MDSCs (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+/<sup>low</sup></sup>) esplénicas aumentan en los animales V respecto de los no infectados V(NI). Además, los machos del grupo V muestran frecuencias –pero no números absolutos- levemente mayores pero significativas de M-MDSCs y G-MDSCs en relación a las respectivas hembras del grupo V (Fig. 38b-e).

En cuanto al impacto de las vacunas, puede observarse que durante el curso de la infección los animales de ambos sexos vacunados con TS, A o TS+A presentaron frecuencias de MDSCs similares a los de sus respectivos grupos V(NI). Sin embargo, en términos de números absolutos, solo los grupos A y TS+A fueron significativamente menores que el V. Globalmente esto sugiere que las formulaciones vacunales -incluso solo el adyuvante- previenen el aumento de MDSCs esplénicas inducido por la infección parasitaria. Por otra parte, comparaciones entre sexos entre los grupos vacunados con TS, A o TS+A, solo muestran una diferencia en el grupo TS, con valores más elevados de M-MDSCs en machos.

*Continúa en la página siguiente ---*



**Figura 38: Células supresoras de origen mieloide esplénicas en ratones vacunados e infectados de ambos sexos.** a) Estrategia de *gating* a partir de esplenocitos totales; b-c) Frecuencia y número absoluto de células supresoras de origen mieloide monocíticas esplénicas (M-MDSC) Ly6G-Ly6C<sup>+</sup> dentro de la población CD11b<sup>+</sup>. d-e) Frecuencia y número absoluto de células supresoras de origen mieloide granulocíticas (G-MDSC) Ly6G+Ly6C<sup>+</sup>/low dentro de la población CD11b<sup>+</sup>.

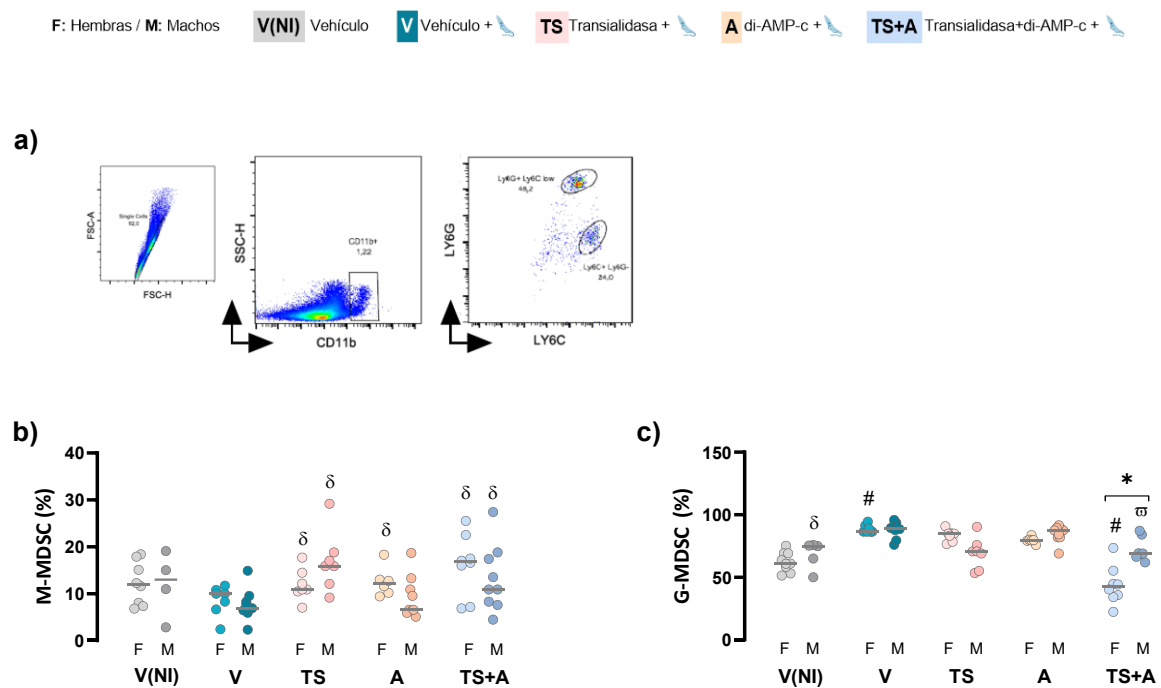
Los datos se expresan como media+SEM. \*p<0,05= F vs. M; #p<0,05= V vs. resto; δp<0,05= TS+A vs. V.

### 5.3.1.2 Células supresoras de origen mieloide circulantes

La frecuencia de las MDSCs también se evaluó en sangre. Como puede observarse en la Fig. 39, a diferencia de lo observado en bazo, no se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de las M-MDSCs y G-MDSCs entre los grupos V y V(NI), si bien las M-MDSCs circulantes tendieron a disminuir en el grupo V. En estos grupos tampoco se observaron

diferencias entre sexos. La frecuencia de las G-MDSCs tendió a aumentar en los animales que solo recibieron el V, pero este aumento solo fue significativo en el caso de las hembras.

Por otra parte, e independientemente de la formulación recibida -TS, A, o TS+A- se observó en ambos sexos un aumento de la frecuencia de las M-MDSCs respecto del grupo que solo recibió el vehículo (Fig. 39b). Las G-MDSC en los grupos TS y A no se diferenciaron del grupo V ni del V(NI). Sin embargo, las hembras del grupo TS+A presentaron una disminución significativa en relación al resto de los grupos (Fig. 39c).



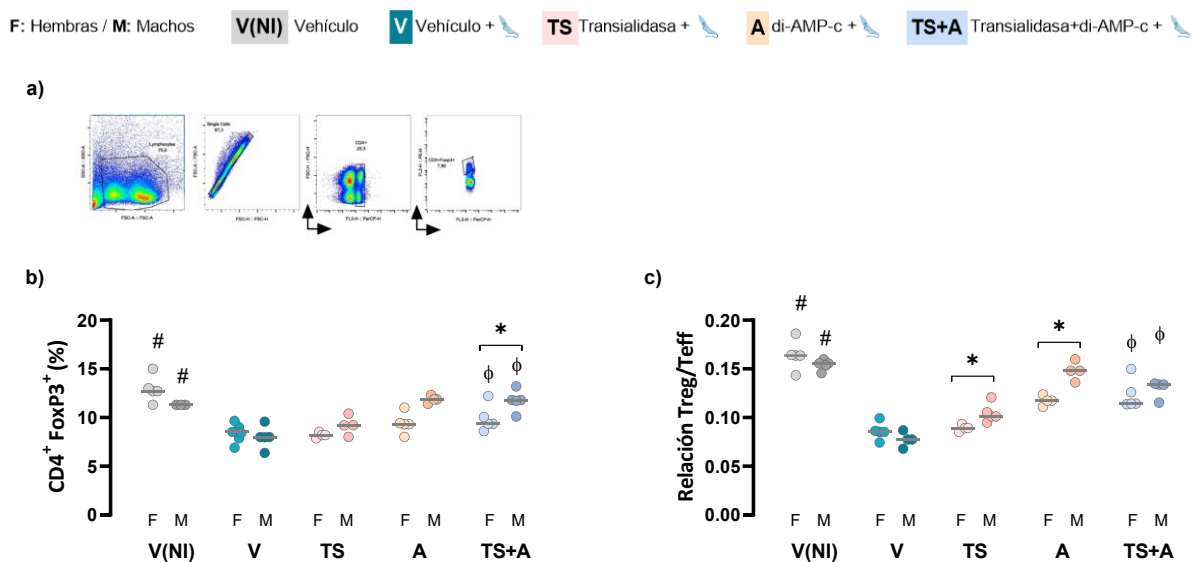
**Figura 39: Células supresoras de origen mieloide detectadas en sangre de ratones de ambos sexos vacunados e infectados.** a) Estrategia de *gating* a partir de sangre. b) Frecuencia de células supresoras de origen mieloide monocíticas circulantes Ly6G-Ly6C<sup>+</sup> dentro de la población CD11b<sup>+</sup> (M-MDSC). c) Frecuencia de células supresoras de origen mieloide granulocíticas circulantes Ly6G+Ly6C<sup>+/low</sup> dentro de la población CD11b<sup>+</sup> (G-MDSC).

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05$  = F vs. M; # $p < 0,05$  = TS+A o V vs. resto;  $\delta p < 0,05$  = TS, A o TS+A vs. V;  $\omega p < 0,05$  = TS+A vs. V y A.

### 5.3.2 Frecuencia de células T reguladoras en animales de ambos sexos vacunados e infectados

La evaluación de las células Treg esplénicas (Fig. 40a) mostró que su frecuencia (Fig. 40b) disminuye significativamente en los animales infectados que solo recibieron el V en relación a los V(NI), independientemente del sexo. Esto se asocia con un aumento en la relación Treg/Teff (Fig. 40c), probablemente como resultado de la proliferación exacerbada de Teff en el contexto de la infección. Resultados similares se observaron en los grupos TS y A. Tampoco se observaron diferencias entre sexos en estos grupos.

En los animales vacunados con TS+A, donde la infección está mejor controlada, no se observa la reducción en la frecuencia de Tregs, siendo este efecto incluso más pronunciado en los machos (Fig. 40b). Por otra parte, la relación Tregs/Teff tiende a normalizarse en los animales vacunados con TS+A, mientras que los grupos TS y A muestran un comportamiento intermedio, con valores más altos en los machos que en las hembras (Fig. 40c).



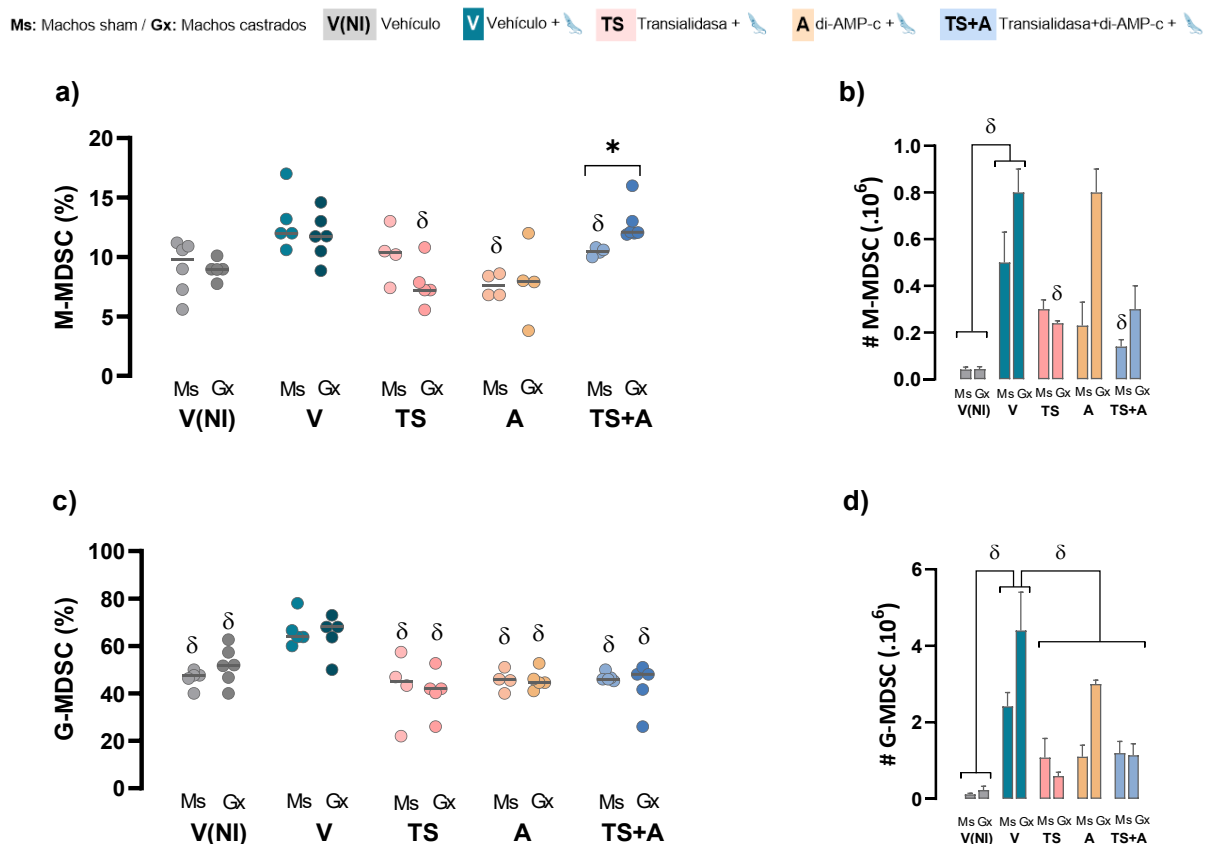
**Figura 40: Modulación de los linfocitos T reguladores esplénicos en ratones de ambos sexos vacunados e infectados.** Los linfocitos Treg se analizaron mediante citometría de flujo de la siguiente manera: a) Estrategia de *gating* a partir de esplenocitos totales; b) Frecuencia de células Tregs FoxP3+ dentro de CD4+; c) Relación Treg/linfocitos T efectores (Treg/Teff).

Los datos se expresan como media+SEM. \*p<0,05= F vs. M; #p<0,05= V(NI) vs. resto; φp<0,05= TS+A vs. V y TS.

Posteriormente se evaluó en ratones macho si la testosterona estaría asociada a la dinámica diferencial que presentan en la respuesta regulatoria de MDSC y Tregs.

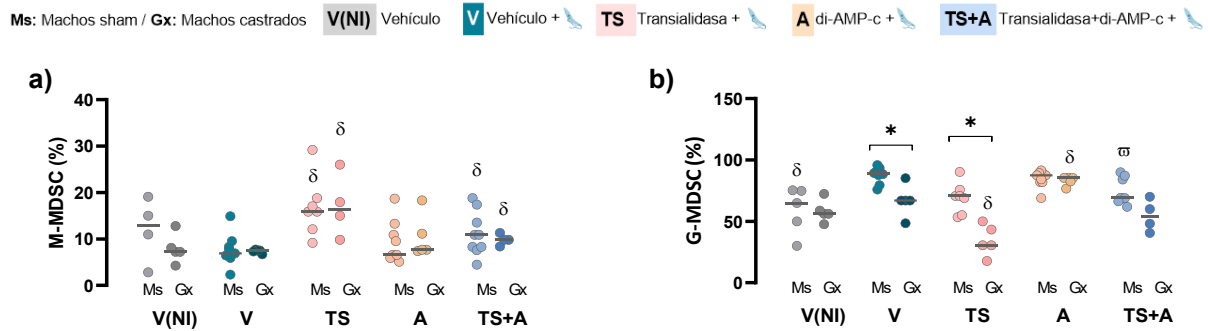
### 5.3.3 Efecto de la castración sobre ambas poblaciones reguladoras durante el curso de la infección

En relación a las MDSC, se observó que la gonadectomía impacta principalmente a nivel de las M-MDSC esplénicas en el grupo TS+A. Los machos gonadectomizados Gx-TS+A incrementan la frecuencia de las M-MDSC en comparación con los animales con gónadas intactas (Ms), y pierden el efecto conferido por la vacunación, alcanzando valores similares a los del grupo V (Fig. 41a,b).



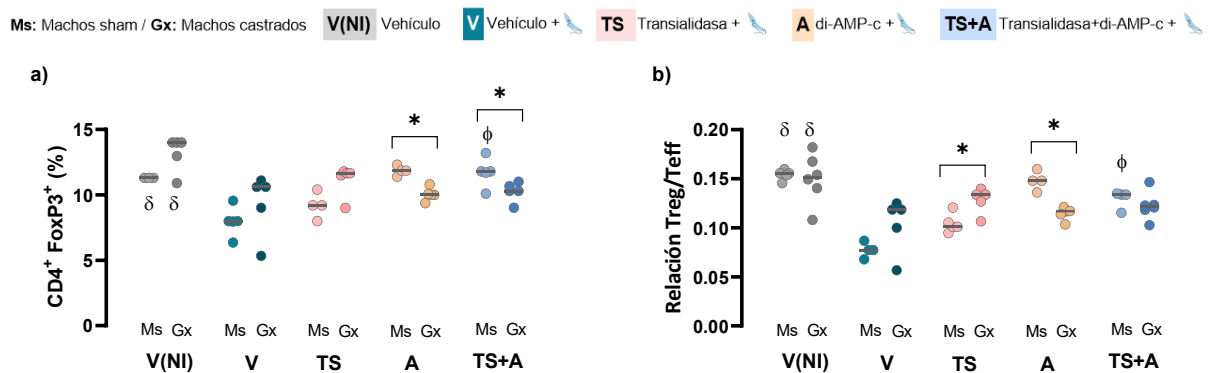
**Figura 41: Modulación de las células supresoras de origen mieloide esplénicas en ratones infectados con *T. cruzi* de Ms y Gx en fase aguda.** Las MDSC esplénicas se analizaron mediante citometría de flujo de la siguiente manera: a-b) Frecuencia de células monocíticas circulantes Ly6G-Ly6C<sup>+</sup> dentro de CD11b<sup>+</sup> (M-MDSC). c-d) Frecuencia de células granulocíticas circulantes Ly6G+Ly6C<sup>+</sup>/low dentro de CD11b<sup>+</sup> (G-MDSC). MDSC: Células supresoras de origen mieloide.

Los datos se expresan como media+SEM. \* $p < 0,05 = F$  vs. M;  $\delta p < 0,05 = V(NI), TS, A$  o TS+A vs. V.



**Figura 42: Modulación de las células supresoras de origen mieloide circulantes en ratones Ms y Gx infectados con *T. cruzi*** Las MDSC circulantes se analizaron al día 21 post-infección mediante citometría de flujo de la siguiente manera: a) Frecuencia de células monocíticas circulantes Ly6G-Ly6C+ dentro de CD11b+ (M-MDSC). cb) Frecuencia de células granulocíticas circulantes Ly6G+Ly6C+/low dentro de CD11b+ (G-MDSC). MDSC: Células supresoras de origen mieloide. Los datos se expresan como media+SEM. \*p<0,05= F vs. M; δ p<0,05= V(NI), TS, A o TS+A vs. V; ϕ p<0,05= TS+A vs. V y A.

Por otra parte, los números absolutos de M-MDSCs en los animales Gx-A y Gx-TS+A tienden a aumentar, sin alcanzar significado estadístico. No se observan cambios significativos en las poblaciones G-MDSC esplénicas ni en las MDSCs en sangre (Fig. 41c,d y Fig. 42). Al analizar las células Treg FoxP3+ en el bazo, se observó que en los animales vacunados con A y TS+A, la ausencia de hormonas masculinas ocasiona una disminución en la frecuencia de las Tregs esplénicas. También se observó una disminución de la relación Treg/Teff en Gx-A y Gx-TS+A en comparación con los Ms respectivos, aunque solo en el grupo Gx-A alcanzó significado estadístico (Fig. 43a,b). De todas maneras, en los grupos Gx-TS+A y Gx-A los cambios en frecuencia y en la relación Treg/Teff no alcanzaron los valores del grupo V respectivo.



**Figura 43: Modulación de las Treg esplénicas en ratones Ms y Gx infectados con *T. cruzi* en fase aguda.** Las Treg se analizaron mediante citometría de flujo de la siguiente manera: a) Frecuencia de células Tregs FoxP3+ dentro de CD4+; b) Relación Treg/Teffector. Los datos se expresan como media+SEM. \*p<0,05= F vs. M; ϕ p<0,05= TS+A vs. V y TS; δ p<0,05= V(NI) vs. V

## 6. DISCUSIÓN

Los efectos del dimorfismo sexual sobre la inmunogenicidad, eficacia y efectividad de las vacunas es una problemática que aún no ha sido suficientemente evaluada. Aquí, particularmente analizamos la inmunogenicidad y la respuesta protectora desarrollada en ambos sexos tras la administración nasal de la vacuna basada en TS. También estimamos el papel potencial de la testosterona como mecanismo regulador extrínseco, así como el de las MDSCs y Tregs como poblaciones reguladoras intrínsecas potencialmente involucradas en la modulación de la respuesta a la vacuna.

➤ En términos de **inmunogenicidad**, nuestros hallazgos muestran que la administración de TS+A desencadena una mejor respuesta humoral específica de TS en las hembras, mientras que la respuesta celular específica de TS parece más favorecida en los machos.

Existen evidencias que demuestran que, tanto en seres humanos como en animales, las hembras tienen una mayor capacidad de producir anticuerpos que los machos luego de una inmunización (Cook, 2008; Živković *et al.*, 2018; Aldakak *et al.*, 2021; Dhakal *et al.*, 2024). De hecho, la mayor susceptibilidad en hombres vacunados contra diversos virus se ha relacionado con la imposibilidad de alcanzar niveles de anticuerpos protectores después de la inmunización (Furman *et al.*, 2014). Por el contrario, se ha observado una mejor respuesta en los hombres vacunados contra infecciones neumocócicas o toxinas bacterianas (Cook, 2008). Aunque desde un punto de vista evolutivo, la testosterona puede suprimir la respuesta inmune para evitar la muerte por inflamación excesiva (Furman *et al.*, 2013), este mecanismo parece afectar la inmunogenicidad, contribuyendo al sesgo sexual observado en la producción de anticuerpos específicos (Furman *et al.*, 2013, 2014). En esta tesis, los niveles elevados de IgG2a plasmática específica observados en las hembras inmunizadas con TS+A

podrían estar relacionados con la capacidad de la vacuna para mejorar los niveles sistémicos de IFN- $\gamma$  e IL-17 en comparación con los machos. Ambas citocinas participan en el cambio de clase de isotipo preferencial a IgG2a, pero también a IgG1 (Mitsdoerffer *et al.*, 2010). Estas diferencias en la respuesta humoral entre hembras y machos probablemente se deban al efecto fisiológicamente inhibitorio de la testosterona (Kanda *et al.*, 1996; Chakraborty, Pramanik and Mahata, 2021), que en parte depende del efecto inhibitorio sobre la producción mediada por BAFF (Wilhelmson *et al.*, 2018). Además, la testosterona puede antagonizar las funciones NF- $\kappa$ B y AP-1 impidiendo la producción de IFN- $\gamma$  (Kallio *et al.*, 1995), y por lo tanto puede influir negativamente en la producción de IgG2a. Coincidentemente, observamos en los machos Gx vacunados con TS+A un aumento adicional en la inmunogenicidad, reflejado por niveles más elevados de IgG2a e IL-17 en comparación con los machos Ms. Y si bien existen reportes de un posible efecto del género en la secreción de IgA de la mucosa (Jafarzadeh *et al.*, 2010), en nuestro modelo, no se evidenció la existencia de dimorfismo sexual en términos de secreción de IgA específica. En relación a hallazgos que indican dimorfismo en las respuestas sistémicas y mucosales ante antígenos vacunales, éstas se han documentado en modelos pre-clínicos de desafíos virales como el HSV-2 genital, el VIH/VIS y el COVID-19 (Bradney *et al.*, 2002; Bhavanam, Snider and Kaushic, 2008; Li *et al.*, 2024), pero aún se desconocen las causas de estas diferencias.

Cabe destacar que, los estudios de inmunogenicidad vacunal se han centrado históricamente en la evaluación de la respuesta humoral, ya que es el parámetro de elección que se correlaciona con protección (comúnmente conocido como “correlato de protección”). Eso ha llevado a un conocimiento más limitado sobre la respuesta celular posterior a la vacunación. Esto ha comenzado a modificarse tras la pandemia de COVID-19, ya que los estudios realizados han demostrado que importancia de este tipo de respuesta en la protección a largo plazo (Sette and Crotty, 2021). Además, la mayoría de los análisis asumen que la respuesta post-vacunal es mejor en mujeres únicamente en función de los niveles de anticuerpos. En nuestro estudio, los machos demuestran una mejor inmunogenicidad celular en comparación con las hembras tras la administración de TS+A. Esto se comprobó por la

inflamación más pronunciada y sostenida que presentaban en la almohadilla plantar, así como por una respuesta proliferativa más evidente de las células T CD4<sup>+</sup> esplénicas, incluida la subpoblación CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>. La ausencia de testosterona en los machos disminuye la respuesta proliferativa en los animales Gx-TS+A, lo que indica que la presencia de la hormona favorecería las vías celulares moduladas por receptores de andrógenos que conducirían a una mayor proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> impulsada por TS+A en los ratones Ms. En este sentido, algunos enfoques sistémicos sobre la eficacia de distintas vacunas han identificado genes humanos específicos involucrados en una respuesta celular y en la neutralización viral deficiente en los hombres, un fenómeno que probablemente esté modulado por las hormonas androgénicas (Furman *et al.*, 2014).

➤ Se ha reportado la existencia de un claro **dimorfismo sexual** en diversos modelos experimentales de infección por *T. cruzi*, que se evidencia principalmente por niveles más altos de parasitemia y/o tiempos de supervivencia más cortos en los machos en comparación con las hembras (Roggero *et al.*, 2016; Reboreda-Hernández *et al.*, 2024). Estas diferencias podrían estar no sólo relacionadas con una respuesta humoral diferencial, sino también con el estado endócrino o incluso con factores psico-neuro-inmunológicos (Schuster and Schaub, 2001; Roggero *et al.*, 2016; Fink and Klein, 2018). En consonancia con estos hallazgos, nuestros resultados también respaldan la existencia de un **dimorfismo sexual basal**, evidenciado por diferencias en la respuesta inmune entre machos y hembras en **el modelo BALB/c de infección oral no letal por *T. cruzi***, fenómeno que no había sido previamente reportado. En particular, las hembras presentaron niveles de parasitemia más bajos, un curso más leve de la infección aguda y una menor incidencia de miocarditis tanto en la fase aguda como en la crónica, en comparación con los machos. En nuestro estudio -no letal-, la mayor susceptibilidad (en términos de carga parasitaria, score clínico y miocarditis) observada en los machos se asocia a una menor inmunogenicidad humoral y a una mayor frecuencia y número absoluto de células MDSCs esplénicas durante el curso de la infección aguda.

➤ En términos de **protección**, nuestro estudio muestra que la profilaxis con TS+A tuvo un efecto favorable no sólo sobre la carga parasitaria, 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 aguda observada en ambos sexos. 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 lograr inmunidad esterilizante tras la infección por *T. cruzi* en animales vacunados aún es un gran desafío, es evidente que la reducción de la carga parasitaria en la fase aguda minimizó en gran medida el daño tisular agudo y crónico (Bonney & Engman, 2008; Wesley *et al.*, 2019).

Vale la pena resaltar que tras el desafío oral con *T. cruzi*, las hembras vacunadas con TS+A presentan un aparente mejor curso clínico de la infección que los machos. A pesar de que estos resultados reflejan en cierta medida lo observado en términos de “correlato de protección” –es decir el nivel previo de anticuerpos-, estos resultados no explican el nivel similar de parasitismo y afectación cardíaca entre hembras y machos vacunados con TS+A. Estos hallazgos podrían en cierta medida estar relacionados con la presencia compensatoria de Tregs esplénicas (González *et al.*, 2015; Araujo Furlan *et al.*, 2018). Incluso, el hecho que la vacuna TS+A evite la caída en la frecuencia de esta población reguladora y module de manera más óptima la relación Treg/Teff, podría también estar relacionada con el hecho que presenten menor fibrosis, ya que se ha reportado que las Tregs prevendrían el daño miocárdico y favorecerían la reparación tisular, incluso en la infección por *T. cruzi* (Bonney *et al.*, 2015; Boccardo *et al.*, 2025).

➤ Los estudios realizados en machos castrados indican que la **testosterona** – como factor extrínseco– está directamente relacionada con la menor producción de anticuerpos en los machos, así como con la mayor proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y producción de IL-17 gatillada por la formulación que contiene TS+A a nivel nasal (Amezcu

Vesely *et al.*, 2020). El deterioro de la inmunidad celular CD4<sup>+</sup> específica de TS a su vez estaría relacionada con un control más deficiente de la carga parasitaria, hecho que llamativamente tiene lugar a pesar del incremento en el nivel anticuerpos específicos que evidencian los Gx-TS+A, ya que esto no parece compensar la respuesta global contra el parásito. Estos resultados refuerzan la noción de la necesidad de montar una respuesta celular eficiente para controlar al parásito, incluso en términos de desarrollo de una formulación vacunal. Por otra parte, los animales Gx-A y en menor medida los Gx-TS+A mostraron un incremento en los marcadores de daño tisular, que podrían estar relacionados con el incremento en el nivel de parasitemia, de IFN- $\gamma$  o bien an algún grado de toxicidad relacionado con el adyuvante, que no se evidenció tan marcadamente en otras pruebas. Lamentablemente, aún no han podido realizarse estudios sobre el papel de la testosterona durante la fase crónica. Sin embargo, un modelo de infección en ratas realizado anteriormente en nuestro instituto indica que la testosterona en la adultez influencia en menor medida la respuesta inmune hacia el parásito que en animales más jóvenes (Pérez *et al.*, 2009). Por otra parte, si bien es este estudio no evaluamos particularmente el papel del E2 en hembras, una serie de artículos señalan que la administración de esta hormona mejora la protección contra *T. cruzi*, evidenciando un efecto contrario a la testosterona (Reboreda-Hernández *et al.*, 2024).

➤ Las **MDSCs** son una población que aumenta en condiciones inflamatorias y también pueden desempeñar un papel perjudicial en la eficacia de la vacuna, ya que pueden amortiguar la respuesta provocada por la formulación, reduciendo así su eficacia (Prochetto, *et al.*, 2022; Sui *et al.*, 2014). De hecho, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que las MDSCs aumentan durante la infección por *T. cruzi* en hembras BALB/c, lo que impacta negativamente en la eficacia de otro prototipo vacunal contra el parásito basado en TS (Prochetto *et al.*, 2017; Gamba *et al.*, 2021). Sin embargo, no se había analizado si esto también ocurría en los machos, independientemente del prototipo vacunal estudiado. Aquí,

demostramos que la infección oral por *T. cruzi* en ratones no vacunados conduce a un aumento más pronunciado en ambos subconjuntos de MDSC esplénicas, independientemente del sexo. Además, la reducción en la frecuencia de MDSC esplénicas después de la inmunización fue consistente con observaciones previas utilizando otras formulaciones de vacunas y otros modelos de infección (Prochetto *et al.*, 2017; Gamba *et al.*, 2021).

Hay que tener en cuenta que el incremento de las poblaciones MDSCs se previene con la vacunación TS+A, lo cual coincide con resultados previos obtenidos tras la administración subcutánea de una vacuna formulada en base a TS+ISPA (Prochetto *et al.*, 2017; Gamba *et al.*, 2021). Posiblemente, la limitación de las MDSCs evite la supresión de la activación y proliferación “*bystander*” de células T y otras células inmunes, impulsadas por TS+A, ya que las MDSC producen citocinas inmunosupresoras que interfieren con la presentación de antígenos por parte de las CDs, impidiendo el cebado eficaz de las células T por la vacuna. Además, las MDSCs a menudo expresan altos niveles de arginasa e iNOS, que pueden agotar los nutrientes esenciales necesarios para la función de las células T y generar especies reactivas de nitrógeno que pueden inhibir aún más la actividad de las células T. Asimismo, se ha reportado que las M-MDSC expresan COX-2 y producen PGE2, lo que contribuye significativamente a la infiltración leucocitaria en el miocardio, con la consiguiente liberación “*in situ*” de mediadores que resultan perjudiciales para el huésped (Guerrero *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, se ha reportado que las MDSCs pueden promover la expansión de **Tregs**, evitando el daño tisular, coincidiendo con lo observado en los animales vacunados con TS+A. Esto no se observa en nuestro modelo, quizás debido a que el desafío con *T. cruzi* vía mucosal gatille algunos mecanismos diferentes de protección que los que se montan vía administración parenteral.

- Globalmente, los resultados aquí obtenidos demuestran que la vacunación nasal con TS+A mejora notablemente los parámetros protectores en ambos sexos, superando eficazmente el dimorfismo sexual en términos de parasitemia, carga parasitaria en los tejidos

junto con la miocarditis en fase aguda y crónica. Estos hallazgos subrayan la utilidad potencial de esta vacuna en ambos sexos, destacando su relevancia clínica en el desarrollo de posibles vacunas para humanos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsohn, I. (1998) 'Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, pp. 117–121. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9686187/>.
- Acevedo, G.R., Girard, M.C. and Gómez, K.A. (2018) 'The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease', *Frontiers in immunology*, 9, p. 1929. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01929>.
- Agostino, P. *et al.* (1999) 'Sex Hormones Modulate Inflammatory Mediators Produced by Macrophages', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876(1), pp. 426–429. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1999.TB07667.X>.
- De Alba-Alvarado, M. *et al.* (2020) 'Response to Infection by *Trypanosoma cruzi* in a Murine Model', *Frontiers in veterinary science*, 7, p. 568745. Available at: <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.568745>.
- De Alba-Alvarado, M.C. *et al.* (2023) 'Immunopathological Mechanisms Underlying Cardiac Damage in Chagas Disease', *Pathogens*, 12(2), p. 335. Available at: <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12020335>.
- Aldakak, L. *et al.* (2021) 'Sex difference in the immunogenicity of the quadrivalent Human Papilloma Virus vaccine: Systematic review and meta-analysis', *Vaccine*, 39(12), pp. 1680–1686. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2021.02.022>.
- Altcheh, J.M. and Freilij, H. (2019) *Chagas Disease*. Edited by J.M. Altcheh and H. Freilij. Cham: Springer International Publishing (Birkhäuser Advances in Infectious Diseases). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7>.
- Amezcuca Vesely, M.C. *et al.* (2020) 'Interleukin-17 mediated immunity during infections with *Trypanosoma cruzi* and other protozoans', *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(5). Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165706>.
- Anunziato, F. and Romagnani, S. (2009) 'Heterogeneity of human effector CD4+ T cells', *Arthritis research & therapy*, 11(6). Available at: <https://doi.org/10.1186/AR2843>.
- Araujo, F.G. and Morein, B. (1991) 'Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigens incorporated into iscoms protects against lethal challenge in mice', *Infection and immunity*, 59(9), pp. 2909–2914. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.59.9.2909-2914.1991>.
- Araujo Furlan, C.L. *et al.* (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', *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), p. 412716. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02555/BIBTEX>.
- Asanuma, H. *et al.* (1997) 'Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue', *Journal of Immunological Methods*, 202(2), pp. 123–131. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(96\)00243-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(96)00243-8).

- Bafica, A. *et al.* (2006) 'Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection', *The Journal of Immunology*, 177(6), pp. 3515–3519. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.6.3515>.
- Barreto-de-Albuquerque, J. *et al.* (2015) 'Trypanosoma cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?', *PLoS neglected tropical diseases*, 9(6). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0003849>.
- Basquiera, A.L. *et al.* (2003) 'Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction', *Heart*, 89(10), pp. 1186–1190. Available at: <https://doi.org/10.1136/HEART.89.10.1186>.
- Basso, B. and 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(3), pp. 428–436. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2014.10.003>.
- Belkaid, Y. and Rouse, B.T. (2005) 'Natural regulatory T cells in infectious disease', *Nature Immunology* 2005 6:4, 6(4), pp. 353–360. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1181>.
- Beloscar, Juan., Perez, A.R. and Ravelli, S. (2013) 'Aportes al conocimiento de la enfermedad de Chagas : una contribución desde la investigación clínica y básica regional', in. Corpus, p. 217. Available at: <https://isbn.cloud/9789871860128/aportes-al-conocimiento-de-la-enfermedad-de-chagas/> (Accessed: 23 February 2025).
- Bemark, M., Boysen, P. and Lycke, N.Y. (2012) 'Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1247(1), pp. 97–116. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2011.06378.X>.
- Beule, A.G. (2010) 'Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses', *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.*, 9, p. Doc07. Available at: <https://doi.org/10.3205/CTO000071>.
- Bhatia, V. *et al.* (2004) 'Utility of the *Trypanosoma cruzi* Sequence Database for Identification of Potential Vaccine Candidates by In Silico and In Vitro Screening', *Infection and Immunity*, 72(11), p. 6245. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6245-6254.2004>.
- Bhavanam, S., Snider, D.P. and Kaushic, C. (2008) 'Intranasal and subcutaneous immunization under the effect of estradiol leads to better protection against genital HSV-2 challenge compared to progesterone', *Vaccine*, 26(48), pp. 6165–6172. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2008.08.045>.
- Bobjer, J. *et al.* (2013) 'Negative association between testosterone concentration and inflammatory markers in young men: a nested cross-sectional study', *PloS one*, 8(4). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061466>.

- Boccardo, S. *et al.* (2025) 'Dynamics of tissue repair regulatory T cells and damage in acute *Trypanosoma cruzi* infection', *PLOS Pathogens*. Edited by I.C. Almeida, 21(1), p. e1012906. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1012906>.
- De Bona, E. *et al.* (2018) 'Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy?', *Frontiers in immunology*, 9, p. 1842. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01842>.
- Bonney, K. and Engman, D. (2008) 'Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?', *Current molecular medicine*, 8(6), pp. 510–518. Available at: <https://doi.org/10.2174/156652408785748004>.
- Bonney, K.M. *et al.* (2015) 'Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease', *Parasitology research*, 114(3), pp. 1167–1178. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00436-014-4300-3>.
- Bonney, K.M. *et al.* (2019) 'Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease', *Annu Rev Pathol*, 14, pp. 421–447. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>.
- Bontempi, I.A. *et al.* (2015) 'Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease', *Vaccine*, 33(10), pp. 1274–1283. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.01.044>.
- Borgna, E. *et al.* (2024) 'Control of myeloid-derived suppressor cell dynamics potentiates vaccine protection in multiple mouse models of *Trypanosoma cruzi* infection', *Frontiers in immunology*, 15. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1484290>.
- Bouman, A., Jan Heineman, M. and Faas, M.M. (2005) 'Sex hormones and the immune response in humans', *Human reproduction update*, 11(4), pp. 411–423. Available at: <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMI008>.
- Bradney, C.P. *et al.* (2002) 'Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization', *Journal of virology*, 76(2), pp. 517–524. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.517-524.2002>.
- Brandan, C.P. *et al.* (2011) 'Knockout of the dhfr-ts gene in *Trypanosoma cruzi* generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge', *PLoS neglected tropical diseases*, 5(12). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001418>.
- Breganó, J.W. *et al.* (2003) 'Phytomonas serpens, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39(3), pp. 257–264. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00256-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00256-6).
- Burdette, D.L. *et al.* (2011) 'STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP', *Nature*, 478(7370), pp. 515–518. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE10429>.

- Butler, W.T., Rossen, R.D. and Wende, R.D. (1970) 'Effect of Physical State and Route of Inoculation of Diphtheria Toxoid on the Formation of Nasal Secretory and Serum Antibodies in Man', *The Journal of Immunology*, 104(6), pp. 1396–1400. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.104.6.1396>.
- Cai, C.W. *et al.* (2016) 'Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*', *PLOS Pathogens*, 12(10), p. e1005902. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005902>.
- Carod-Artal, F.J. and Gascon, J. (2010) 'Chagas disease and stroke', *The Lancet Neurology*, 9(5), pp. 533–542. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70042-9/ASSET/106DA55A-DB16-4771-8FB7-2A3BC16B6553/MAIN.ASSETS/GR2.SML](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70042-9/ASSET/106DA55A-DB16-4771-8FB7-2A3BC16B6553/MAIN.ASSETS/GR2.SML).
- Castro, J.T. *et al.* (2023) 'ASP-2/Trans-sialidase chimeric protein induces robust protective immunity in experimental models of Chagas' disease', *NPJ vaccines*, 8(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41541-023-00676-0>.
- Cazarla, S.I. *et al.* (2010) 'Redirection of the Immune Response to the Functional Catalytic Domain of the Cysteine Proteinase Cruzipain Improves Protective Immunity against *Trypanosoma cruzi* Infection', *The Journal of Infectious Diseases*, 202(1), pp. 136–144. Available at: <https://doi.org/10.1086/652872>.
- Cazorla, S.I. *et al.* (2015) 'Oral Multicomponent DNA Vaccine Delivered by Attenuated *Salmonella* Elicited Immunoprotection Against American Trypanosomiasis', *The Journal of Infectious Diseases*, 211(5), pp. 698–707. Available at: <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIU480>.
- Cerny, N. *et al.* (2020) 'Cruzipain and Its Physiological Inhibitor, Chagasin, as a DNA-Based Therapeutic Vaccine Against *Trypanosoma cruzi*', *Frontiers in immunology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.565142>.
- Cestari, I. *et al.* (2013) 'Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites', *Molecular immunology*, 53(4), pp. 328–334. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2012.08.015>.
- Chagas disease - PAHO/WHO | Pan American Health Organization (no date). Available at: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease> (Accessed: 4 August 2024).
- Chakraborty, S., Pramanik, J. and Mahata, B. (2021) 'Revisiting steroidogenesis and its role in immune regulation with the advanced tools and technologies', *Genes & Immunity* 22:3, 22(3), pp. 125–140. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00139-3>.
- Choi, S.M. *et al.* (2024) 'Characterization of CD8+ virtual memory T cells in IL-4 knockout mice using single-cell RNA sequencing', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 738, p. 150950. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2024.150950>.

- Choudhuri, S. and Garg, N.J. (2020) 'PARP1-cGAS-NF- $\kappa$ B pathway of proinflammatory macrophage activation by extracellular vesicles released during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease', *PLoS Pathogens*, 16(4), p. e1008474. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008474>.
- Cook, I.F. (2008) 'Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines', *Vaccine*, 26(29–30), pp. 3551–3555. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2008.04.054>.
- Corr, S.C., Gahan, C.C.G.M. and Hill, C. (2008) 'M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(1), pp. 2–12. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2007.00359.X>.
- Corrêa-De-Santana, E., Pinto-Mariz, F. and Savino, W. (2006) 'Immunoneuroendocrine Interactions in Chagas Disease', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1088(1), pp. 274–283. Available at: <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1366.005>.
- Costa, F. *et al.* (1998) 'Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice', *Vaccine*, 16(8), pp. 768–774. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00277-6).
- Cummings, K.L. and Tarleton, R.L. (2003) 'Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 129(1), pp. 53–59. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00093-8).
- Dhakal, S. *et al.* (2024) 'Estradiol mediates greater germinal center responses to influenza vaccination in female than male mice', *mBio*, 15(4). Available at: <https://doi.org/10.1128/MBIO.00326-24>.
- Dietz, S. *et al.* (2021) 'Extracellular vesicles released by myeloid-derived suppressor cells from pregnant women modulate adaptive immune responses', *Cellular Immunology*, 361, p. 104276. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2020.104276>.
- Dumonteil, E. and Herrera, C. (2021) 'Tropical Medicine and Infectious Disease The Case for the Development of a Chagas Disease Vaccine: Why? How? When?' Available at: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6010016>.
- Ebensen, T. *et al.* (2011) 'Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant', *Vaccine*, 29(32), pp. 5210–5220. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2011.05.026>.
- Eickhoff, C.S. *et al.* (2010) 'ECG Detection of Murine Chagasic Cardiomyopathy', *Journal of Parasitology*, 96(4), pp. 758–764. Available at: <https://doi.org/10.1645/GE-2396.1>.
- Eickhoff, C.S. *et al.* (2011) 'Co-Administration of a Plasmid DNA Encoding IL-15 Improves Long-Term Protection of a Genetic Vaccine against *Trypanosoma cruzi*', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), p. e983. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000983>.

- Erdmann, H. *et al.* (2013) 'IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment', *Immunobiology*, 218(6), pp. 910–923. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2012.10.005>.
- Erdmann, H., Behrends, J. and Hölscher, C. (2016) 'During acute experimental infection with the reticulotropic *Trypanosoma cruzi* strain Tulahuen IL-22 is induced IL-23-dependently but is dispensable for protection', *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep32927>.
- Exley, C., Siesjö, P. and Eriksson, H. (2010) 'The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work?', *Trends in Immunology*, 31(3), pp. 103–109. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IT.2009.12.009>.
- Fainboim, L. and Geffner, J. (2005) *Introducción a la inmunología humana*, *Introducción a la Inmunología Humana*.v. Médica Panamericana. Available at: [https://books.google.com/books/about/Introducci%C3%B3n\\_a\\_la\\_inmunolog%C3%ADa\\_humana.html?hl=es&id=V2Bds\\_6ubMwC](https://books.google.com/books/about/Introducci%C3%B3n_a_la_inmunolog%C3%ADa_humana.html?hl=es&id=V2Bds_6ubMwC).
- Fairbairn, D.J. and Cox, R.M. (2024) 'Sexual Dimorphism', *Reference Module in Life Sciences* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15750-9.00008-2>.
- Fan, D. *et al.* (2012) 'Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease', *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(1), p. 15. Available at: <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-15>.
- Farani, P.S.G., Jones, K.M. and Poveda, C. (2024) 'Treatments and the Perspectives of Developing a Vaccine for Chagas Disease', *Vaccines*, 12(8), p. 870. Available at: <https://doi.org/10.3390/VACCINES12080870>.
- Fernandes, M.C. and Andrews, N.W. (2012) 'Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence', *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), pp. 734–747. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2012.00333.X>.
- Fink, A.L. and Klein, S.L. (2018) 'The evolution of greater humoral immunity in females than males: implications for vaccine efficacy', *Current opinion in physiology*, 6, pp. 16–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COPHYS.2018.03.010>.
- Fischinger, S. *et al.* (2019) 'Sex differences in vaccine-induced humoral immunity', *Seminars in immunopathology*, 41(2), pp. 239–249. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00281-018-0726-5>.
- Fish, E.N. (2008) 'The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses', *Nature reviews. Immunology*, 8(9), pp. 737–744. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRI2394>.
- Flanagan, K.L. *et al.* (2017) 'Sex and gender differences in the outcomes of vaccination over the life course', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33, pp. 577–599. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100616-060718/CITE/REFWORKS>.
- Fletcher, M. *et al.* (2014) 'L-Arginine depletion blunts anti-tumor T cell responses by inducing myeloid-derived suppressor cells', *Cancer research*, 75(2), p. 275. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1491>.

- Fontanella, G.H. *et al.* (2008) 'Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate', *Vaccine*, 26(19), pp. 2322–2334. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2008.02.060>.
- Furman, D. *et al.* (2013) 'Apoptosis and other immune biomarkers predict influenza vaccine responsiveness', *Molecular Systems Biology*, 9, p. 659. Available at: <https://doi.org/10.1038/MSB.2013.15>.
- Furman, D. *et al.* (2014) 'Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(2), pp. 869–874. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1321060111>.
- Gabrilovich, D.I. (2017) 'Myeloid-derived suppressor cells', *Cancer Immunology Research*, 5(1), pp. 3–8. Available at: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>.
- Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. (2009) 'Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system', *Nature reviews. Immunology*, 9(3), pp. 162–174. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRI2506>.
- Gamba, J.C. *et al.* (2021) 'Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Enhance a Trans-Sialidase-Based Vaccine Against *Trypanosoma cruzi*', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.671104>.
- Gazzinelli, R.T., Ropert, C. and 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*, 201(1), pp. 9–25. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2004.00174.X>.
- Giddings, O.K. *et al.* (2010) 'Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges', *Infection and Immunity*, 78(3), pp. 1333–1338. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00278-09/ASSET/E58C0BDE-7495-4641-A3E6-83CCF280CDE5/ASSETS/GRAPHIC/ZII9990984870004.JPEG>.
- Goldmann, O. *et al.* (2024) 'Mechanisms underlying immunosuppression by regulatory cells', *Frontiers in Immunology*, 15, p. 1328193. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1328193/BIBTEX>.
- González, F.B. *et al.* (2015) 'Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled *T. cruzi* infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3(+) T cells', *Brain, behavior, and immunity*, 45, pp. 219–232. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2014.11.016>.
- Graefe, S.E.B. *et al.* (2003) 'Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice', *Microbes and Infection*, 5(10), pp. 833–839. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00176-X).
- Gravina, H.D. *et al.* (2013) 'Differential Use of TLR2 and TLR9 in the Regulation of Immune Responses during the Infection with *Trypanosoma cruzi*', *PLoS ONE*, 8(5), p. e63100. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0063100>.

- Guerrero, N.A. *et al.* (2015) 'Correction: Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Signaling through Prostaglandin Receptor EP-2 Favor the Development of Myocarditis during Acute *Trypanosoma cruzi* Infection', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), p. e0004175. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004175>.
- Haks, M.C. *et al.* (2017) 'Molecular Signatures of Immunity and Immunogenicity in Infection and Vaccination', 8(November). Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01563>.
- Haluszczak, C. *et al.* (2009) 'The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion', *The Journal of experimental medicine*, 206(2), pp. 435–448. Available at: <https://doi.org/10.1084/JEM.20081829>.
- Hao, S. *et al.* (2007) 'Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors', *International immunopharmacology*, 7(13), pp. 1765–1775. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2007.09.017>.
- Heritage, P.L. *et al.* (1997) 'Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches', *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(4 Pt 1), pp. 1256–1262. Available at: <https://doi.org/10.1164/AJRCCM.156.4.97-03017>.
- Hoft, D.F. *et al.* (2000) 'Involvement of CD4+ Th1 Cells in Systemic Immunity Protective against Primary and Secondary Challenges with *Trypanosoma cruzi*', *Infection and Immunity*, 68(1), pp. 197–204. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.1.197-204.2000>.
- Hoft, D.F. *et al.* (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', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(10), pp. 6889–6900. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.10.6889>.
- Hoft, D.F. and Eickhoff, C.S. (2005) 'Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen', *Infection and immunity*, 73(8), pp. 4934–4940. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4934-4940.2005>.
- Hölscher, C. *et al.* (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.', *Infection and Immunity*, 66(3), pp. 1208–1215. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.66.3.1208-1215.1998>.
- Hou, J. and Wu, F.Z. (1988) 'Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice', *International journal of immunopharmacology*, 10(1), pp. 15–22. Available at: [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(88\)90145-2](https://doi.org/10.1016/0192-0561(88)90145-2).
- Jafarzadeh, A. *et al.* (2010) 'Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender', *Brazilian oral research*, 24(1), pp. 21–27. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1806-83242010000100004>.

- Jilma, B. *et al.* (1994) 'Effects of 17 beta-estradiol on circulating adhesion molecules', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 79(6), pp. 1619–1624. Available at: <https://doi.org/10.1210/JCEM.79.6.7527406>.
- Kallio, P.J. *et al.* (1995) 'Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element', *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 9(8), pp. 1017–1028. Available at: <https://doi.org/10.1210/MEND.9.8.7476976>.
- Kanda, N., Tsuchida, T. and Tamaki, K. (1996) 'Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells', *Clinical and Experimental Immunology*, 106(2), p. 410. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.1996.D01-842.X>.
- Kierszenbaum, F. *et al.* (1974) 'Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*.', *Journal of Immunology*, 112(5), pp. 1839–1844. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.112.5.1839>.
- Kierszenbaum, F. and Pienkowski, M.M. (1979) 'Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection', *Infection and immunity*, 24(1), pp. 117–120. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.24.1.117-120.1979>.
- Kierszenbaum, P. and Howard, J.G. (1976) 'Mechanisms of Resistance Against Experimental *Trypanosoma Cruzi* Infection: The Importance of Antibodies and Antibody-Forming Capacity in the Biozzi High and Low Responder Mice', *The Journal of Immunology*, 116(5), pp. 1208–1211. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.116.5.1208>.
- Kissick, H.T. *et al.* (2014) 'Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(27), pp. 9887–9892. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1402468111/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- Köstlin-Gille, N. and Gille, C. (2020) 'Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period', *Frontiers in Immunology*, 11, p. 584712. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.584712/BIBTEX>.
- Kovats, S. (2015) 'Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways', *Cellular immunology*, 294(2), pp. 63–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2015.01.018>.
- Kumar, S. and Tarleton, R.L. (2001) ' Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice ', *The Journal of Immunology*, 166(7), pp. 4596–4603. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.7.4596>.
- Kurtz, D.M. and Travlos, G.S. (2018) *CLINICAL CHEMISTRY OF LABORATORY ANIMALS*. 3rd Edition. CRC PRESS. Available at: <https://www.routledge.com/The-Clinical-Chemistry-of-Laboratory-Animals/Kurtz-Travlos/p/book/9780367570354>.
- Li, J. *et al.* (2024) 'Sex-biased immunogenicity of a mucosal subunit vaccine against SARS-CoV-2 in mice', *Frontiers in Immunology*, 15, p. 1386243. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1386243/BIBTEX>.

- Lieberman, A.C. *et al.* (2018) 'Regulatory and mechanistic actions of glucocorticoids on T and inflammatory cells', *Frontiers in Endocrinology*, 9, p. 235. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00235>.
- Lidani, K.C.F. *et al.* (2017) 'The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*', *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 607. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>.
- Limon-Flores, A.Y. *et al.* (2010) 'Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4+ and CD8+ T cells', *Vaccine*, 28(46), pp. 7414–7419. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2010.08.104>.
- Lirussi, D. *et al.* (2017) 'Type I IFN and not TNF, is Essential for Cyclic Di-nucleotide-elicited CTL by a Cytosolic Cross-presentation Pathway', *EBioMedicine*, 22, pp. 100–111. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2017.07.016>.
- Liva, S.M. and Voskuhl, R.R. (2001) 'Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production', *Journal of immunology*, 167(4), pp. 2060–2067. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.4.2060>.
- Lotter, H. *et al.* (2013) 'Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFN $\gamma$  secretion in natural killer T cells', *PloS one*, 8(2), p. e55694. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055694>.
- Luhrs, K.A., Fouts, D.L. and Manning, J.E. (2003) 'Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection', *Vaccine*, 21(21–22), pp. 3058–3069. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00108-7).
- MacDonald, T.T. (1998) 'T cell immunity to oral allergens', *Current opinion in immunology*, 10(6), pp. 620–627. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80079-4](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80079-4).
- Machado, A. V. *et al.* (2006) 'Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase', *Human Gene Therapy*, 17(9), pp. 898–908. Available at: <https://doi.org/10.1089/HUM.2006.17.898>.
- Malkin, C.J. *et al.* (2004) 'The Effect of Testosterone Replacement on Endogenous Inflammatory Cytokines and Lipid Profiles in Hypogonadal Men', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(7), pp. 3313–3318. Available at: <https://doi.org/10.1210/JC.2003-031069>.
- Mancino, C. *et al.* (2024) 'Harnessing RNA Technology to Advance Therapeutic Vaccine Antigens against Chagas Disease', *ACS applied materials & interfaces*, 16(13), pp. 15832–15846. Available at: <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.3C18830>.
- Markle, J.G. and Fish, E.N. (2014) 'Sex matters in immunity', *Trends in Immunology*, 35(3), pp. 97–104. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IT.2013.10.006/ASSET/B9D29CAF-9C18-452B-AC5E-11BE456B6109/MAIN.ASSETS/GR1.SML>.

- Martin, D. and Tarleton, R. (2004) 'Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection', *Immunological Reviews*, 201(1), pp. 304–317. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2004.00183.X>.
- Martin, D.L. *et al.* (2006) 'CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes', *PLoS pathogens*, 2(8), pp. 0731–0740. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.0020077>.
- Masip, Y.E. *et al.* (2024) 'Vaccination with parasite-specific TcTASV proteins combined with recombinant baculovirus as a delivery platform protects against acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infection', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 14. Available at: <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2024.1297321>.
- De Meis, J. *et al.* (2013) 'Trypanosoma cruzi Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice', *Frontiers in Immunology*, 4, p. 216. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00216>.
- Melo, R.C.N. (2008) 'Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(2), p. 279. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2008.00388.X>.
- Mesnick, S. and Ralls, K. (2018) 'Sexual Dimorphism', *Encyclopedia of Marine Mammals, Third Edition*. Academic Press. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804327-1.00226-0>.
- Mitchell, G.F., Jeron, A. and Koren, G. (1998) 'Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse', *The American journal of physiology*, 274(3). Available at: <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.1998.274.3.H747>.
- Mitsdoerffer, M. *et al.* (2010) 'Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), pp. 14292–14297. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1009234107>.
- Moreno-Medina, E., Valerio-Campos, I. and Goyenaga-Castro, P. (2007) 'Miocarditis y miocardiopatía dilatada por *Trypanosoma cruzi*: Reporte de un caso', *Parasitología latinoamericana*, 62(3–4), pp. 148–153. Available at: <https://doi.org/10.4067/S0717-77122007000200008>.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) 'TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties', *Annual review of immunology*, 7, pp. 145–173. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IY.07.040189.001045>.
- MOUNTFORD, A.P., FISHER, A. and WILSON, R.A. (1994) 'The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*', *Parasite immunology*, 16(10), pp. 521–527. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.1994.TB00306.X>.
- Müller, U. *et al.* (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', *European Journal of Immunology*, 33(1), pp. 70–78. Available at: <https://doi.org/10.1002/IMMU.200390009>.

- Nakaya, M., Tachibana, H. and Yamada, K. (2006) 'Effect of estrogens on the interferon-gamma producing cell population of mouse splenocytes', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(1), pp. 47–53. Available at: <https://doi.org/10.1271/BBB.70.47>.
- Nizard, M. *et al.* (2014) 'Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites', *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(8), pp. 2175–2187. Available at: <https://doi.org/10.4161/HV.29269>.
- de Noya, B.A. *et al.* (2015) 'Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches', *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 110(3), pp. 377–386. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760140285>.
- de Noya, B.A. and González, O.N. (2015) 'An ecological overview on the factors that drives to Trypanosoma cruzi oral transmission', *Acta Tropica*, 151(1), pp. 94–102. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2015.06.004>.
- OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud (2009) *Enfermedad de Chagas: guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos* -. Available at: <https://www.paho.org/es/documentos/enfermedad-chagas-guia-para-vigilancia-prevencion-control-manejo-clinico-enfermedad>.
- Orlando Buendía-González, F. and Legorreta-Herrera, M. (2022) 'The Similarities and Differences between the Effects of Testosterone and DHEA on the Innate and Adaptive Immune Response'. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom12121768>.
- Ostrand-Rosenberg, S., Lamb, T.J. and Pawelec, G. (2023) 'Here, There, and Everywhere: Myeloid-Derived Suppressor Cells in Immunology', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 210(9), pp. 1183–1197. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.2200914>.
- Ouaisi, A. *et al.* (2002) 'The Trypanosoma cruzi Tc52-Released Protein Induces Human Dendritic Cell Maturation, Signals Via Toll-Like Receptor 2, and Confers Protection Against Lethal Infection', *The Journal of Immunology*, 168(12), pp. 6366–6374. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.12.6366>.
- Pacini, M.F. *et al.* (2022) 'Nasal immunization with a L. lactis-derived trans-sialidase antigen plus c-di-AMP protects against acute oral T. cruzi infection', *Vaccine*, 40(15), pp. 2311–2323. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.02.071>.
- Pacini, María F. *et al.* (2023) 'Intranasal trans-sialidase-based vaccine against Trypanosoma cruzi triggers a mixed cytokine profile in the nasopharynx-associated lymphoid tissue and confers local and systemic immunogenicity', *Acta Tropica*, 241. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106889>.
- Pacini, Maria Florencia *et al.* (2023) 'The high identity of the Trypanosoma cruzi Group-I of trans-sialidases points them as promising vaccine immunogens', *Proteins*, 91(10), pp. 1444–1460. Available at: <https://doi.org/10.1002/PROT.26537>.

- Pacini, M.F. *et al.* (2024) 'Intranasal Trans-Sialidase Vaccine Mitigates Acute and Chronic Pathology in a Preclinical Oral Chagas Disease Model', *Vaccines*, 12(10), p. 1171. Available at: <https://doi.org/10.3390/VACCINES12101171>.
- Page, S.T. *et al.* (2006) 'Effect of medical castration on CD4+ CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN-gamma expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 290(5), pp. E856-63. Available at: <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00484.2005>.
- Palatnik-de-sousa, C.B. and Nico, D. (2020) 'The Delay in the Licensing of Protozoal Vaccines : A Comparative History', 11(March), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00204>.
- Papadimitriou, A. and Priftis, K.N. (2009) 'Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis', *Neuroimmunomodulation*, 16(5), pp. 265–271. Available at: <https://doi.org/10.1159/000216184>.
- Pereira, I.R. *et al.* (2014) 'Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease', *Mediators of inflammation*, 2014, p. 798078. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/798078>.
- Pereira, V.R.A. *et al.* (2004) 'Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of Trypanosoma cruzi stimulates a cellular immune response in mice.', *Parasitology*, 129(Pt 5), pp. 563–570. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0031182004006043>.
- Pérez, A.R. *et al.* (2007) 'Thymus atrophy during Trypanosoma cruzi infection is caused by an immuno-endocrine imbalance', *Brain, behavior, and immunity*, 21(7), pp. 890–900. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2007.02.004>.
- Pérez, A.R. *et al.* (2009) 'INFLUENCIA DE LA TESTOSTERONA SOBRE LA INFECCIÓN CAUSADA POR TRYPANOSOMA CRUZI ', *Revista médica de Rosario*, 75, pp. 84–92.
- Peters, C., Kabelitz, D. and Wesch, D. (2018) 'Regulatory functions of  $\gamma\delta$  T cells', *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 75(12), p. 2125. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00018-018-2788-X>.
- Petray, P.B. *et al.* (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', *Immunology letters*, 35(1), pp. 77–80. Available at: [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(93\)90151-Q](https://doi.org/10.1016/0165-2478(93)90151-Q).
- Phiel, K.L. *et al.* (2005) 'Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations', *Immunology letters*, 97(1), pp. 107–113. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2004.10.007>.
- Pillerová, M. *et al.* (2021) 'On the role of sex steroids in biological functions by classical and non-classical pathways. An update', *Frontiers in neuroendocrinology*, 62, p. 100926. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2021.100926>.

- Pinazo, M.J. *et al.* (2024) 'Challenges and advancements in the development of vaccines and therapies against Chagas disease', *The Lancet Microbe*, 5(10). Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LANMIC.2024.100972/ASSET/B898853C-3084-4703-BEEB-454ABC2B650D/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>.
- de Pinho, R.T. *et al.* (2014) 'Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by Trypanosoma cruzi-infected macrophages', *Experimental Parasitology*, 147, pp. 72–80. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2014.09.003>.
- Polanczyk, M.J. *et al.* (2004) 'Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(4), pp. 2227–2230. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.173.4.2227>.
- Poncini, C. V. *et al.* (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.', *Molecular Immunology*, 47(11–12), pp. 1981–1988. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2010.04.016>.
- Poncini, C. V. and González-Cappa, S.M. (2017) 'Dual role of monocyte-derived dendritic cells in Trypanosoma cruzi infection', *European journal of immunology*, 47(11), pp. 1936–1948. Available at: <https://doi.org/10.1002/EJI.201646830>.
- Poveda, C. *et al.* (2023) 'Heterologous mRNA-protein vaccination with Tc24 induces a robust cellular immune response against Trypanosoma cruzi, characterized by an increased level of polyfunctional CD8+ T-cells', *Current research in immunology*, 4. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CRIMMU.2023.100066>.
- Prochetto, E. *et al.* (2017) 'Trans-sialidase-based vaccine candidate protects against Trypanosoma cruzi infection, not only inducing an effector immune response but also affecting cells with regulatory/suppressor phenotype', *Oncotarget*, 8(35), pp. 58003–58020. Available at: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.18217>.
- Prochetto, E., Bontempi, I., *et al.* (2022) 'Assessment of a combined treatment with a therapeutic vaccine and benznidazole for the Trypanosoma cruzi chronic infection', *Acta Tropica*, 229. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106334>.
- Prochetto, E., Borgna, E., *et al.* (2022) 'Myeloid-derived suppressor cells and vaccination against pathogens', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, p. 1003781. Available at: <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.1003781/FULL>.
- Pulendran, B. and Ahmed, R. (2011) 'Immunological mechanisms of vaccination', *Nature Immunology* 2011 12:6, 12(6), pp. 509–517. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.2039>.
- Pulendran, B., S. Arunachalam, P. and O'Hagan, D.T. (2021) 'Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants', *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:6, 20(6), pp. 454–475. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>.

- Quintana, I. *et al.* (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', *Frontiers in microbiology*, 9(SEP). Available at: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02100>.
- Rassi, A., Rassi, A. and Little, W.C. (2000) 'Chagas' Heart Disease', *Clinical Cardiology*, 23(12), pp. 883–889. Available at: <https://doi.org/10.1002/CLC.4960231205>.
- Rassi, A., Rassi, A. and Marin-Neto, J.A. (2010) 'Chagas disease', *Lancet*, 375(9723), pp. 1388–1402. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- Reboreda-Hernández, Ó.A. *et al.* (2024) 'Influence of sexual hormones on Chagas disease', *Archivos de cardiología de Mexico*, 94(2), pp. 127–132. Available at: <https://doi.org/10.24875/ACM.23000018>.
- Reed, S. *et al.* (1994) 'IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection', *J Immunol*, 153(7), pp. 3134–3140. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8089491/>.
- Rettew, J.A., Huet, Y.M. and Marriott, I. (2009) 'Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo', *Endocrinology*, 150(8), pp. 3877–3884. Available at: <https://doi.org/10.1210/EN.2009-0098>.
- Rettew, J.A., Huet-Hudson, Y.M. and Marriott, I. (2008) 'Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity', *Biology of reproduction*, 78(3), pp. 432–437. Available at: <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.107.063545>.
- Riese, P. *et al.* (2014) 'Intranasal formulations: promising strategy to deliver vaccines', *Expert opinion on drug delivery*, 11(10), pp. 1619–1634. Available at: <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.931936>.
- Robertson, L.J. *et al.* (2024) 'The importance of estimating the burden of disease from foodborne transmission of *Trypanosoma cruzi*', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 18(2), p. e0011898. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0011898>.
- Robinson, D.P. *et al.* (2014) '17 $\beta$ -estradiol protects females against influenza by recruiting neutrophils and increasing virus-specific CD8 T cell responses in the lungs', *Journal of virology*, 88(9), pp. 4711–4720. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02081-13>.
- Rocamora-Reverte, L., Villunger, A. and Jan Wieggers, G. (2022) 'Cell-Specific Immune Regulation by Glucocorticoids in Murine Models of Infection and Inflammation', *Cells*, 11(14), p. 2126. Available at: <https://doi.org/10.3390/CELLS11142126>.
- Rodrigues, M.M. *et al.* (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', *Infection and immunity*, 67(8), pp. 3855–3863. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.3855-3863.1999>.

- Rodrigues, M.M., Oliveira, A.C. and Bellio, M. (2012) 'The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development', *Journal of parasitology research*, 2012, p. 507874. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/507874>.
- Rodríguez-Morales, O. *et al.* (2015) 'Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History', *Journal of Immunology Research*, 2015(1), p. 489758. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/489758>.
- Roggero, E. *et al.* (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', *Clinical & Experimental Immunology*, 128(3), pp. 421–428. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.2002.01874.X>.
- Roggero, E. *et al.* (2006) 'Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection', *The Journal of endocrinology*, 190(2), pp. 495–503. Available at: <https://doi.org/10.1677/JOE.1.06642>.
- Roggero, E. *et al.* (2016) 'The sympathetic nervous system affects the susceptibility and course of *Trypanosoma cruzi* infection', *Brain, behavior, and immunity*, 58, pp. 228–236. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2016.07.163>.
- Roland, K.L. and Brenneman, K.E. (2013) 'Salmonella as a vaccine delivery vehicle', *Expert review of vaccines*, 12(9), pp. 1033–1045. Available at: <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.825454>.
- Roncarolo, M.G. *et al.* (2006) 'Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans', *Immunological reviews*, 212, pp. 28–50. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2006.00420.X>.
- Roncarolo, M.G. and Battaglia, M. (2007) 'Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans', *Nature reviews. Immunology*, 7(8), pp. 585–598. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRI2138>.
- Ronco, M.T. *et al.* (2010) 'Tumor necrosis factor alpha induced by *Trypanosoma cruzi* infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice', *Cytokine*, 49(1), pp. 64–72. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2009.09.012>.
- ROTTENBERG, M. *et al.* (1988) 'Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection', *Scandinavian journal of immunology*, 28(5), pp. 573–582. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1365-3083.1988.TB01489.X>.
- Roved, J., Westerdahl, H. and Hasselquist, D. (2017) 'Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences', *Hormones and Behavior*, 88, pp. 95–105. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.017>.
- Ruiz, A.M. *et al.* (1985) 'Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*.', *Acta Tropica*, 42(4), pp. 299–309. Available at: <https://europepmc.org/article/MED/2868632>.

- Sakaguchi, S. *et al.* (2008) 'Regulatory T Cells and Immune Tolerance', *Cell*, 133(5), pp. 775–787. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.05.009>.
- Sakurai, F., Tachibana, M. and Mizuguchi, H. (2021) 'Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 42, p. 100432. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.DMPK.2021.100432>.
- Salazar-Schettino, P.M. *et al.* (2016) 'Enfermedad de Chagas en México', *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(3), pp. 6–16. Available at: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0026-17422016000300006&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0026-17422016000300006&script=sci_abstract).
- Sallusto, F. *et al.* (2010) 'From Vaccines to Memory and Back', *Immunity*, 33(4), pp. 451–463. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2010.10.008>.
- Sanchez Alberti, A. *et al.* (2017) 'Engineered trivalent immunogen adjuvanted with a STING agonist confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection', *NPJ vaccines*, 2(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41541-017-0010-Z>.
- Sankaran-Walters, S. *et al.* (2013) 'Sex differences matter in the gut: Effect on mucosal immune activation and inflammation', *Biology of Sex Differences*, 4(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1186/2042-6410-4-10/FIGURES/8>.
- Sato, S. and Kiyono, H. (2012) 'The mucosal immune system of the respiratory tract', *Current opinion in virology*, 2(3), pp. 225–232. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2012.03.009>.
- Schmidt, S. (1935) 'SUR L'IMPORTANCE DE LA COMPOSITION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE POUR LA PRODUCTION DU SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE1', *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 12(1–2), pp. 7–23. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1600-0463.1935.TB05461.X>.
- Schuster, J.P. and Schaub, G.A. (2001) 'Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors', *Parasitology research*, 87(12), pp. 994–1000. Available at: <https://doi.org/10.1007/S004360100474>.
- Seillet, C. *et al.* (2012) 'The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor  $\alpha$  signaling', *Blood*, 119(2), pp. 454–464. Available at: <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-08-371831>.
- Sette, A. and Crotty, S. (2021) 'Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19', *Cell*, 184(4), pp. 861–880. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.01.007>.
- Shahi, S.K. *et al.* (2019) 'Scoring disease in an animal model of multiple sclerosis using a novel infrared-based automated activity-monitoring system', *Scientific Reports*, 9(1), p. 19194. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-019-55713-7>.
- Shikanai-Yasuda, M.A. and Carvalho, N.B. (2012) 'Oral Transmission of Chagas Disease', *Clin Infect Dis*, 54(6), pp. 845–852. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>.

- Silva, G.K. *et al.* (2010) 'Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection', *Journal of immunology*, 184(3), pp. 1148–1152. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0902254>.
- Silva, J.S. *et al.* (1992) 'Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection', *The Journal of experimental medicine*, 175(1), pp. 169–174. Available at: <https://doi.org/10.1084/JEM.175.1.169>.
- Silva-dos-Santos, D. *et al.* (2017) 'Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(4), p. e0005507. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005507>.
- Singh, R.P. and Bischoff, D.S. (2021) 'Sex Hormones and Gender Influence the Expression of Markers of Regulatory T Cells in SLE Patients', *Frontiers in immunology*, 12, p. 619268. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.619268>.
- Sophocleous, A. and Idris, A.I. (2019) 'Ovariectomy/Orchiectomy in Rodents', *Methods Mol Biol*, 1914, pp. 261–267. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_13).
- Staats, H.F. *et al.* (1994) 'Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development', *Current Opinion in Immunology*, 6(4), pp. 572–583. Available at: [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90144-9).
- Stempin, C. *et al.* (2002) 'Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen.', *Journal of Leukocyte Biology*, 72(4), pp. 727–734. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.72.4.727>.
- Straub, R.H. (2007) 'The complex role of estrogens in inflammation', *Endocrine reviews*, 28(5), pp. 521–574. Available at: <https://doi.org/10.1210/ER.2007-0001>.
- Sui, Y. *et al.* (2014) 'Vaccine-induced myeloid cell population dampens protective immunity to SIV', *The Journal of clinical investigation*, 124(6), pp. 2538–2549. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI73518>.
- Sun, J. and Tarleton, R.L. (1993) 'Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 48(2), pp. 161–169. Available at: <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1993.48.161>.
- Talvani, A. *et al.* (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 and Infection*, 2(8), pp. 851–866. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00388-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00388-9).
- Talvani, A. (2011) 'Effects of *Trypanosoma cruzi* infection on myocardial morphology, single cardiomyocyte contractile function and exercise tolerance in rats', *International Journal of Experimental Pathology*, 92, pp. 299–307. Available at:

- [https://www.academia.edu/17436359/Effects\\_of\\_Trypanosoma\\_cruzi\\_infection\\_on\\_myocardial\\_morphology\\_single\\_cardiomyocyte\\_contractile\\_function\\_and\\_exercise\\_tolerance\\_in\\_rats](https://www.academia.edu/17436359/Effects_of_Trypanosoma_cruzi_infection_on_myocardial_morphology_single_cardiomyocyte_contractile_function_and_exercise_tolerance_in_rats).
- Tarleton, R.L., Grusby, M.J. and Zhang, L. (2000) 'Increased Susceptibility of Stat4-Deficient and Enhanced Resistance in Stat6-Deficient Mice to Infection with *Trypanosoma cruzi*', *The Journal of Immunology*, 165(3), pp. 1520–1525. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.165.3.1520>.
- Tomljenovic, L. and A. Shaw, C. (2011) 'Aluminum vaccine adjuvants: are they safe?', *Current medicinal chemistry*, 18(17), pp. 2630–2637. Available at: <https://doi.org/10.2174/092986711795933740>.
- Torrico, F. *et al.* (1991) 'Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice.', *The Journal of Immunology*, 146(10), pp. 3626–3632. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.146.10.3626>.
- Tracey, M.D, K.J. and Cerami, Ph.D, A. (1994) 'Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target.', *Annual Review of Medicine*, 45(1), pp. 491–503. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MED.45.1.491>.
- Turley, J.L. and Lavelle, E.C. (2022) 'Resolving adjuvant mode of action to enhance vaccine efficacy', *Current opinion in immunology*, 77. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COI.2022.102229>.
- Tyagi, A.M. *et al.* (2012) 'Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis', *PloS one*, 7(9), p. e44552. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0044552>.
- Tzelepis, F. *et al.* (2008) 'Infection with *Trypanosoma cruzi* Restricts the Repertoire of Parasite-Specific CD8+ T Cells Leading to Immunodominance<sup>1</sup>', *Journal of Immunology*, 180(3), pp. 1737–1748. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.3.1737>.
- Vasconcelos, J.R.C. *et al.* (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', *Immunology and cell biology*, 81(2), pp. 121–129. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.0818-9641.2002.01136.X>.
- Veglia, F., Perego, M. and Gabrilovich, D. (2018) 'Myeloid-derived suppressor cells coming of age', *Nature immunology*, 19(2), pp. 108–119. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41590-017-0022-X>.
- Veglia, F., Sanseviero, E. and Gabrilovich, D.I. (2021) 'Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity', *Nature reviews. Immunology*, 21(8), pp. 485–498. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41577-020-00490-Y>.
- Verbsky, J.W. (2007) 'Therapeutic use of T regulatory cells', *Current opinion in rheumatology*, 19(3), pp. 252–258. Available at: <https://doi.org/10.1097/BOR.0B013E3280AD46BB>.

- Vespa, G.N.R., Cunha, F.Q. and 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*, 62(11), pp. 5177–5182. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.62.11.5177-5182.1994>.
- Viano, M.E. *et al.* (2024) 'Systemic inflammatory Th1 cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection disrupt the typical anatomical cell distribution and phenotypic/functional characteristics of various cell subsets within the thymus', *Microbes and infection*, 26(5–6), pp. 5–6. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2024.105337>.
- Vieira, R. de S. *et al.* (2022) 'STING Signaling Drives Production of Innate Cytokines, Generation of CD8+ T Cells and Enhanced Protection Against *Trypanosoma cruzi* Infection', *Frontiers in Immunology*, 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.775346>.
- Villar, S.R. *et al.* (2013) 'Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates glucocorticoid synthesis in the adrenal glands of *Trypanosoma cruzi* acutely-infected mice. the role of TNF-R1', *PloS one*, 8(5). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0063814>.
- Wesley, M. *et al.* (2019) 'Correlation of Parasite Burden, kDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease', *Frontiers in microbiology*, 10(AUG). Available at: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01856>.
- White, J.T., Cross, E.W. and Kedl, R.M. (2017) 'Antigen-inexperienced memory CD8+ T cells: where they come from and why we need them', *Nature reviews. Immunology*, 17(6), pp. 391–400. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRI.2017.34>.
- Wilhelmson, A.S. *et al.* (2018) 'Testosterone is an endogenous regulator of BAFF and splenic B cell number', *Nature Communications 2018 9:1*, 9(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04408-0>.
- World Health Organization (2006) *Temperature sensitivity of vaccines*. Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/69387>.
- Yang, Y. *et al.* (2020) 'Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation', *Frontiers in immunology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01371>.
- Youn, J.-I. *et al.* (2008) 'Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(8), p. 5791. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.8.5791>.
- Zamboni, D.S. and Lima-Junior, D.S. (2015) 'Inflammasomes in host response to protozoan parasites', *Immunological Reviews*, 265(1), pp. 156–171. Available at: <https://doi.org/10.1111/IMR.12291>.
- Živković, I. *et al.* (2018) 'Sex bias in mouse humoral immune response to influenza vaccine depends on the vaccine type.', *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 52, pp. 18–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIOLOGICALS.2018.01.007>.

Zuercher, A.W. and Cebra, J.J. (2002) 'Structural and functional differences between putative mucosal inductive sites of the rat.', *European Journal of Immunology*, 32(11), pp. 3191–3196. Available at: [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).