

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



**Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas**

**DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA  
INMUNOMODULADORA PARA EL CONTROL  
DE LA INFECCIÓN GENERADA POR  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

**Iván Alejandro Bontempi**

Director de Tesis:

**Iván Sergio Marcipar**

**Laboratorio de Tecnología Inmunológica - Facultad de Bioquímica y Ciencias  
Biológica - Universidad Nacional del Litoral**

**- 2015 -**

---

# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO I:</b> .....	<b>17</b>
I.1 INTRODUCCIÓN .....	18
I.1.1. El Agente etiológico de la enfermedad de Chagas .....	18
I.1.1.1. El parásito. ....	18
I.1.1.2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	20
I.1.1.3. Vías de transmisión .....	22
I.1.1.4. El genoma de <i>T. cruzi</i> y su clasificación en unidades discretas de tipificación.....	22
I.1.1.5. Inmunidad contra <i>T. cruzi</i> .....	23
I.1.2. Enfermedad de Chagas .....	26
I.1.2.1. Etapas de la enfermedad de Chagas .....	26
I.1.2.1.1. Fase aguda .....	26
I.1.2.1.2. Fase Crónica sin patología demostrada .....	26
I.1.2.1.3. Fase crónica con patología demostrada.....	26
I.1.2.2. La enfermedad de Chagas en el actual contexto socioeconómico .....	27
I.1.2.3. Tratamiento .....	28
I.1.3. Diseño de vacunas para humanos .....	29
I.1.3.1. Definición de vacuna .....	29
I.1.3.2. Tipos de vacunas .....	31
I.1.4. Desafíos en la producción de una vacuna contra <i>T. cruzi</i> .....	32
I.1.5. Avances en la vacuna contra <i>T. cruzi</i> .....	33
I.1.5.1. Vacunas vivas atenuadas .....	34
I.1.5.2. Vacunas de subunidad.....	34
I.1.5.3. Vacunas de ADN .....	35
I.1.5.4. Vacunas a virus y bacterias .....	37

---

I.1.5.5. Candidatos vacunales de <i>T. cruzi</i> .....	37
I.1.6. Estrategias de la formulación de la vacuna y desarrollo de la hipótesis.....	38
I.2. HIPÓTESIS .....	40
I.3. OBJETIVOS.....	41
Objetivo general .....	41
Objetivos específicos.....	41
<b>CAPÍTULO II:.....</b>	<b>42</b>
II.1 INTRODUCCIÓN.....	43
II.1.1. Proteínas con repeticiones en tándem como inmunógenos.....	43
II.1.2. Enzimas claves de vías metabólicas de <i>T. cruzi</i> como inmunógenos .....	46
II.1.3. Desarrollo de este capítulo .....	47
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
II.2.1. Antígenos recombinantes utilizados .....	49
II.2.1.1. Proteínas con repeticiones en tándem .....	49
II.2.1.1.1. Expresión de las proteínas recombinantes FRA, Tc3 y Tc6 .....	49
II.2.1.1.2. Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) .....	50
II.2.1.1.3. Análisis de proteínas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	50
II.2.1.1.4. Cuantificación de proteínas totales .....	51
II.2.1.1.5. Corte enzimático de las proteínas FRA, Tc3 y Tc6 .....	52
II.2.1.2. Enzimas pertenecientes a vías metabólicas de <i>T. cruzi</i> .....	53
II.2.1.3. Enzima Transialidasa de <i>T. cruzi</i> .....	53
II.2.2. Cepa de ratones .....	53
II.2.3. Cepa de parásitos de <i>T. cruzi</i> .....	54
II.2.3.1. Mantenimiento de la cepa de <i>T. cruzi</i> en el estadio trypomastigote .....	54
II.2.3.2. Obtención de parásitos para el desafío con <i>T. cruzi</i> .....	54
II.2.3.3. Lisado de parásitos de <i>T. cruzi</i> .....	55
II.2.4. Plan de inoculación .....	55
II.2.5. Desafío de los grupos inmunizados con <i>T. cruzi</i> .....	55
II.2.6. Evaluación de anticuerpos específicos .....	56
II.2.7. Medición de la parasitemia .....	57
II.2.8. Análisis estadístico .....	57
II.3. RESULTADOS.....	58

II.3.1. Obtención de las proteínas recombinantes para emplearlas como inmunógenos.....	58
II.3.1.1. Expresión y corte enzimático de las proteínas recombinantes FRA, Tc3 y Tc6.....	58
II.3.1.2. Análisis de la calidad de las proteínas CPX, TXN y TS.....	59
II.3.2. Puesta a punto del modelo de infección con <i>T. cruzi</i> .....	60
II.3.3. Evaluación de la respuesta humoral luego de la inmunización.....	61
II.3.3.1. Proteínas con repeticiones en tándem.....	61
II.3.3.2. Evaluación de la TRX como inmunopotenciador.....	62
II.3.3.3. Enzimas proveniente de vías metabólicas.....	63
II.3.4. Desafío con <i>T. cruzi</i> .....	64
II.3.4.1. Parasitemia de los ratones inmunizados a los 14 dpi.....	64
II.3.4.1.1. Proteínas con repeticiones en tándem.....	64
II.3.4.1.2. Enzimas proveniente de vías metabólicas.....	65
II.3.4.2 Evaluación de la supervivencia de los grupos inmunizados.....	66
II.3.4.2.1. Proteínas con repeticiones en tándem.....	66
II.3.4.2.2. Evaluación de la TRX como inmunopotenciador en el inmunógeno FRA.....	67
II.3.4.2.3. Enzimas proveniente de vías metabólicas.....	68
II.4.    DISCUSIÓN.....	69
II.5.    CONCLUSIONES PARCIALES.....	75
<b>CAPÍTULO III:.....</b>	<b>76</b>
III.1.    INTRODUCCIÓN.....	77
III.1.1. Adyuvantes tradicionales.....	78
III.1.2. Adyuvante de nueva generación.....	79
III.1.3. Adyuvantes evaluados para vacunas contra <i>T. cruzi</i> .....	82
III.1.4. Desarrollo de este capítulo.....	82
III.2.    MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
III.2.1. Inmunógenos utilizados.....	84
III.2.2. Cepa de ratones y parásitos de <i>T. cruzi</i> .....	84
III.2.3 Adyuvantes evaluados.....	84
III.2.4. Plan de inoculación.....	85
III.2.5. Desafío de los grupos inmunizados con <i>T. cruzi</i> .....	86
III.2.6. Evaluación de Anticuerpos específicos.....	86
III.2.7. Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH).....	86

---

III.2.8. Medición de la parasitemia y peso relativo porcentual .....	87
III.2.9. Análisis estadístico .....	87
III.3. RESULTADOS .....	88
III.3.1. Evaluación de la respuesta humoral de cada adyuvante .....	88
III.3.2. Evaluación de la respuesta celular <i>in vivo</i> antes del desafío con <i>T. cruzi</i> .....	91
III.3.3. Desafío con <i>T. cruzi</i> .....	92
III.3.3.1. Evaluación del peso relativo porcentual .....	92
III.3.3.2. Evaluación de la parasitemia durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	93
III.3.3.3. Curva de supervivencia de los grupos evaluados con los diferentes adyuvantes .....	95
III.3.4. Reevaluación de antígenos de <i>T. cruzi</i> potencialmente protectivos con el adyuvante ISCOMATRIX .....	95
III.3.4.1. Evaluación de la respuesta humoral .....	96
III.3.4.2. Evaluación de la respuesta celular <i>in vivo</i> antes del desafío con <i>T. cruzi</i> .....	97
III.3.4.3. Evaluación de la parasitemia durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	98
III.3.4.4. Curva de supervivencia de los grupos evaluados .....	100
III.4. DISCUSIÓN .....	101
III.5. CONCLUSIONES PARCIALES .....	107
<b>CAPÍTULO IV:.....</b>	<b>108</b>
IV.1. INTRODUCCIÓN.....	109
IV.1.1. El Inmunógeno Transialidasa .....	109
IV.1.2. El adyuvante ISCOMATRIX.....	111
IV.1.3. Desarrollo de este capítulo .....	111
IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
IV.2.1. Antígeno y adyuvante empleado .....	113
IV.2.2. Cepa de ratones y parásitos de <i>T. cruzi</i> .....	113
IV.2.3. Plan de inoculación .....	113
IV.2.4. Medición de citoquinas mediante sobrenadante de cultivo .....	114
IV.2.5. Marcación de células T CD4+ y CD8+ e IFN- $\gamma$ intracelular mediante citometría .....	115
IV.2.6. Medición de daño cardíaco .....	115
IV.2.6.1. Obtención de preparados histológicos de corazón .....	115
IV.2.6.2. Coloración de los cortes histológicos .....	117
IV.2.6.3. Cálculo del daño histológico .....	117
IV.2.7. Carga parasitaria en tejido cardíaco mediante PCR en tiempo real .....	119

---

IV.2.7.1 Purificación del ADN.....	119
IV.2.7.2 Generación de los estándares de PCR.....	120
IV.2.7.3. PCR cuantitativa en tiempo real .....	120
IV.2.8. Análisis estadístico .....	122
IV.3. RESULTADOS.....	123
IV.3.1. Evaluación de la respuesta celular luego de la inmunización .....	123
IV.3.1.1. Citoquinas de sobrenadante de cultivo.....	123
IV.3.1.2. Células T y producción de IFN- $\gamma$ intracelular .....	124
IV.3.2. Evaluación de los grupos inmunizados durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	126
IV.3.2.1 Evaluación de la respuesta celular en el estadio agudo de la infección .....	126
IV.3.2.2. Evaluación del daño cardiaco en el estadio agudo de la infección .....	127
IV.3.2.3. Carga parasitaria en el tejido cardiaco en el estadio agudo de la infección .....	129
IV.3.3. Evaluación de los grupos inmunizados durante la etapa crónica de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	131
IV.3.3.1 Evaluación de la respuesta celular en el estadio crónico de la infección .....	132
IV.3.3.2. Evaluación del daño cardiaco en el estadio crónico de la infección.....	133
IV.3.3.3. Carga parasitaria en el tejido cardiaco en el estadio crónico de la infección .....	136
IV.4. DISCUSIÓN.....	138
IV.5. CONCLUSIONES PARCIALES .....	144
<b>CONCLUSIONES FINALES .....</b>	<b>145</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>165</b>

## Agradecimientos

- En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Iván Marcipar, por darme la posibilidad de arrancar con este nuevo tema en el laboratorio, que disfruté enormemente a pesar de los inconvenientes y puestas a punto que tuve que afrontar. Por su confianza, sabiduría, perseverancia y gran optimismo, que transmitía aun cuando las cosas andaban mal. Gracias por las incontables charlas de trabajo en donde con un simple papel y lápiz diseñábamos el mundo entero
- A la Facultad de Bioquímica y Ciencias. Biológicas de la UNL por permitirme realizar mi doctorado.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científico y Técnicas que me otorgó las becas para la realización de mi posgrado
- A los Dres. Diego Arias y Sergio Guerrero por cederme gentilmente las proteínas que utilicé en este trabajo
- Al Dr. Alejandro Montaner por cederme gentilmente el adyuvante IMT504
- Al Dr. Paul Ameloot por aceptar trabajar con nosotros y cedernos la proteína Transialidasa
- A la Dra. Romina Manarin por enseñarme el modelo de infección con *T. cruzi*
- A la Dra. Ana Rosa Pérez, por abrirme las puertas de su laboratorio y ayudarme incontables veces en los ensayos de cultivo celular y citometría, que enriquecieron enormemente esta Tesis
- A la Dra. Silvina Villar y a la Lic. Florencia González por la gran ayuda en los experimentos de cultivo celular
- Al Dr. Eduardo Roggero por la realización del cálculo de la miocarditis en los preparados histológicos
- Al Lic. Pedro Fleitas que realizó su tesina junto con mi doctorado y me ayudó con las primeras evaluaciones de los antígenos

- A todos mis compañeros del laboratorio de tecnología inmunológica que estuvieron en estos 5 años. Son tantas las charlas y anécdotas que hicieron mucho más amena la vida en el laboratorio. En especial a la Meli, Nare, Migue y Gabi que tanto me ayudaron durante el doctorado.
- A mis amigos que me acompañaron durante estos años, a pesar de no estar tan a favor del método experimental, me respetaban porque sabían que era para un bien mayor. No puedo dejar de mencionar a mi gran amigo Rodrigo, que no solo me ayudó cuando se lo he pedido, sino que me auxilió enormemente con las compu es estos meses de escritura.
- Finalmente este viaje no lo hubiese podido realizar sin la ayuda de mi compañera de la vida. Nare, gracias por haberme acompañado día a día en esta empresa, hiciste del laboratorio un hogar y de casa un lugar donde se podía compartir experiencias del día a día. Y sobre todo gracias por haber aceptado estar junto a mí durante toda mi vida.

## Abreviaturas

- $\mu$ l: microlitro
- A: Adenosina
- aa: aminoácidos
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- adyuvante completo de Freund (AF)
- Amp: Ampicilina
- APC: células presentadoras de antígeno profesionales (APC)
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- AS: sistemas de adyuvantes
- ASP2: de su siglas en ingles Proteína de superficie de amastigotes 2
- AVPP: años de vida potencialmente perdidos (AVPP)
- C: Citocina
- CCC: Cardiopatía Chagastica Crónica (CCC)
- CpG: oligonucleótidos que contienen pares de citosina y guanina
- CPX: Tryparredoxina peroxidasa citosolica
- CTL: de sus siglas en ingles linfocito T citotóxico
- Ctrl: control
- CZ: Cruzipaína
- DAMPS: de sus siglas en ingles patrones moleculares asociados a peligro

- DL50: Dosis letal 50
- DO: Densidad Óptica
- Dpi: Días post infección
- DSP: procesamientos estándar downstream (DSP)
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- EDTA: ácido etildiaminotetraacético
- Eff%: Eficiencia
- ELISA: Enzimoimmunoensayo
- G: guanidina
- GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
- GSK: GlaxoSmithKline
- H&E: Hetatoxilina y Eosina
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno
- IFN- $\gamma$ : Interferón gamma
- IgG: inmunoglobulina G
- IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 beta
- IL-12: Interleuquina 12
- IL-18: Interleuquina 18
- IL-4: Interleuquina 4
- IMT504: oligodeoxinucleotidos PyNTTTTGT (ODNs)
- IMX: ISCOMATRIX
- ISCOM: complejo inmuno estimulante
- ISCOMATRIX: complejo inmuno estimulante libre del antígeno
- KCl: Cloruro de potasio
- KDal: kilo Dalton

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : Fosfato diácido de potasio
- LB: medio Luria Bertani
- MASP: de sus siglas en ingles proteínas de superficie asociada a la mucinas
- MHCI: de sus siglas en ingles complejo mayor de histocompatibilidad I
- MHCII: de sus siglas en ingles complejo mayor de histocompatibilidad II
- MLP: lipopolisacarido
- MO: Microscopio
- MPX: Tryparredoxina peroxidasa mitocondrial
- MTP-PE: muramil tripéptido fosfatidil etanolamina
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  : Carbonato de sodio
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : Fosfato dibasico de sodio
- NaCl: Cloruro de sodio
- $\text{NaHCO}_3$  : Bicarbonato de sodio
- NK: células natural killers
- NLR: de sus siglas en ingles receptores tipo NOD
- NO: óxido nitroso
- NOD: Dominios de oligomerización de unión a nucleótidos
- $\text{O}_2^-$ : superóxido
- ODN: oligodesoxinucleótidos
- OMS: organización mundial de la salud
- ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito
- *P. pastoris*: *Pichia pastoris*
- PAMP: de sus siglas en ingles patrones moleculares asociados a patógenos
- PBS: de sus siglas en ingles buffer fosfato salino
- PCR: de sus siglas en ingles Reacción en cadena de la polimerasa

- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- R. Picosirius: rojo de picosirius
- r.p.m: revoluciones por minuto.
- ROOH: hidroperóxidos de cadena corta
- ROS: de sus siglas en ingles especies reactivas de oxígeno
- RRP: receptores de reconocimiento de patrones
- SAPA: de sus siglas en ingles Antígeno circulante de fase aguda
- SDS: : dodecilsulfato de sódio
- SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- STS: superfamilia de la transialidasa (STS)
- T CD8: Linfocitos T CD8
- T(SH<sub>2</sub>): Trypanotiol
- *T. Cruzi*: El *Trypanosoma cruzi*
- T: Timidina
- T<sub>CM</sub>: células T de memoria central
- TCR: receptor de linfocitos T
- T<sub>EM</sub>: células T de memoria efectoras
- Th1: T helper 1
- TLR: de sus siglas en ingles receptores tipo Toll
- TMB: tetrametilbencidina
- TNF- $\alpha$  : de sus siglas en ingles Factor de Necrosis Tumoral
- TR: Trypanothione reductasa
- TRX: tiorredoxina
- TS: Transialidasa
- TXN: enzima Tryparredoxina

- UDT: unidad discreta de tipificación
- vs: versus

## Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), representa un grave problema de salud en América Latina. Alrededor de 8 millones de personas se estima que están infectadas, causando 11.000 muertes por año. Actualmente existen medidas de control de la transmisión de la infección, como la desinsectación de las viviendas o el control de sangre transfundida, que han sido muy efectivas para disminuir su prevalencia. Por otro lado, existe un tratamiento que permite la cura parasitológica en la fase aguda de la infección. Sin embargo, dicha terapia resulta de baja eficiencia en la fase crónica en la que habitualmente es detectada la infección. Esto es así ya que la misma presenta manifestaciones silenciosas en la fase aguda. Por eso, disminuir la prevalencia de enfermos de Chagas sigue siendo un desafío. En ese sentido las vacunas profilácticas y terapéuticas podrían ser una alternativa adecuadas para la prevención y tratamiento de dicha enfermedad.

En la investigación de vacunas para *T. cruzi*, se ha profundizado extensamente el uso de los sistemas que faciliten una respuesta celular, como vacunas de ADN desnudo o adenovirus. Si bien esta estrategia presenta resultados prometedores, se requieren aun varios años de evaluación para la incorporación de estas plataformas en vacunas humanas. El objetivo de esta tesis fue diseñar un prototipo vacunal utilizando proteínas recombinantes del parásito como antígeno, formuladas con adyuvantes de última generación. La ventaja de este candidato vacunal, en relación a los evaluados hasta el momento, es que este enfoque tiene mayor potencialidad para ser evaluado en ensayos clínicos en un corto plazo, ya que presenta menos objeciones con respecto a la seguridad, y es ampliamente aceptado por los organismos reguladores.

Como candidatos antigénicos se evaluaron distintos antígenos del parásito, presente en la bibliografía, los cuales no se habían incluido como candidatos vacunales. A su vez se evaluó a la proteína TS, por ser unos de los principales candidatos extensamente evaluados en vacunas de ADN. Se diseñó un modelo de infección animal con *T. cruzi*, utilizando ratones Balb/c inmunizados con tres dosis de cada antígeno formulados con adyuvante de Freund y finalmente se infectó con parásitos de la cepa Tulahuen clon 2. Luego se midió respuesta humoral, parasitemia y supervivencia.

como marcadores principales de protección. De las proteínas evaluadas: FRA, Tc3, TS, Tc6, TXN y CPX, la TS presentó mayor protección y en menor medida la Tc3. Seleccionando a la TS como candidato proteico, para la evaluación de los adyuvantes de nueva generación. Se evaluó el adyuvante IMT505 (IMT), que consiste en un oligonucleótido que no presenta regiones CpG y el adyuvante ISCOMATRIX (IMX), que está compuesto por fosfolípidos, colesterol y saponina. También se evaluó el adyuvante de Freund (AF). De los parámetros de protección medidos anteriormente, se adicionó la prueba de respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH, por sus siglas en ingles) que presentó una mayor respuesta para este grupo. La formulación TS-IMX presentó mayor protección obteniéndose un 100 % de supervivencia en comparación al 20 % del grupo control.

Con los datos obtenidos, se seleccionó a la formulación TS-IMX y se decidió hacer una extensa evaluación de parámetros humorales y celulares luego de la inmunización. Además, luego de la infección se evaluó la respuesta celular así como daño cardiaco y carga parasitaria en tejido en el estadio agudo (a los 15 días de la infección) y en el estadio crónico (a los 100 días de la infección). Los resultados obtenidos indican que la inmunización con la formulación TS-IMX generó una respuesta celular con producción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ +, altos títulos de IgG2a, baja parasitemia y carga parasitaria en tejido cardiaco, así como una muy baja miocarditis y fibrosis en comparación con el grupo control tanto en el estadio agudo como en el crónico.

De los resultados obtenido, se concluye que luego de evaluar distintos antígenos y adyuvantes, la formulación TS-IMX presentó protección frente a la infección con *T. cruzi*, generando una activación celular del sistema inmune en el estadio agudo con un perfil proinflamatorio. En el estadio crónico de la infección se evidenció una disminución de la generación de miocarditis medida en términos de infiltrado inflamatorio y de fibrosis. Este resultado es destacable ya que la miocarditis es la principal manifestación patológica de la enfermedad de Chagas. Los resultados obtenidos indican que es factible el desarrollo de una vacuna a subunidades formulada con un adyuvante de probada seguridad para su uso en humanos. Los resultados son muy prometedores para continuar el estudio de esta formulación en vistas de avanzar hacia pruebas clínicas en pacientes.

## Abstract

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is a serious health problem in Latin America. About 8 million people are estimated to be infected, causing 11000 deaths per year. Although Chagas disease can be treated with benznidazole or nifurtimox, both drugs have very limited efficiency in chronic phase, when the infection is normally detected. Thus, prophylactic and therapeutic vaccines would be suitable alternatives for preventing and treating Chagas disease.

Naked DNA and adenovirus have been widely used in preclinical *T. cruzi* vaccine to facilitate cellular response. Although these strategies have been promising results, they still require several years of evaluation to be incorporated in human vaccines. The aim of this thesis was to design a prototypical vaccine using recombinant proteins from *T. cruzi* as antigen formulated with a new generation adjuvant. The advantage of this vaccine approach in relation to the others mentioned before is that this methodology has greater potential to be evaluated in clinical trials at short time.

Different parasite antigens, not yet assessed as vaccine candidates were evaluated in the present work. The extensively evaluated antigen candidate in DNA vaccines, TS protein, was also assessed using our approach. A *T. cruzi* infection murine model was optimized using Balb/c mice and Tulahuen clone 2 *T. cruzi* strain. The Immunization schedules and infection protocol consisted in three doses of each antigen formulated with Freund's adjuvant and finally infected with 1000 parasite. Then humoral response was measured. Parasitemia and survival rate were measured as key markers of protection. The proteins assessed were: FRA, Tc3, TS, Tc6, TXN and CPX. Only he TS, followed by Tc3, presented high protection. Thus, TS which had displayed the highest antigenic performance was selected as candidate protein for the selection of a new generation adjuvant. The IMT505 (IMT) and the ISCOMATRIX (IMX) were assessed as adjuvant. The IMT consists in a no-

CpG oligonucleotide and IMX is made by phospholipids, cholesterol and saponin. Freund's adjuvant (FA) was also evaluated considering that although it is not potentially applicable in humans, its high performance as adjuvant is useful to control experimental conditions and compare other adjuvant performances. In addition to the previously protection parameters, the delayed type hypersensitivity response (DTH) was higher for this formulation. TS-IMX infected-immunized mice presented higher protection than the control group allowing 100% of survival rate.

Taking in mind the archived results, humoral and cellular immune response after immunization with TS-IMX formulation was extensively evaluated to analyze the immune correlate of the protection. Furthermore, the cellular response was evaluated during the acute stage (15 days post infection) and in the chronic stage (100 days post infection). Damage and parasite burden in cardiac tissue were also assessed. The immunization with TS-IMX vaccine generated a cellular response with CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  T cell production, high titers of IgG2a, low parasitemia and low parasite burden in cardiac tissue cells. Furthermore TS-IMX vaccine present a really lower fibrosis and myocarditis compared to the control group in both acute and chronic stage.

From the obtained results, we concluded that after evaluating different antigens and adjuvants, the formulation TS-IMX presented the best protection against *T. cruzi* infection. TS-IMX formulation generated a cellular immune response in the acute stage with a proinflammatory profile. In the chronic stage of infection, the TS-IMX vaccine reduced the generation of myocarditis in terms of inflammatory infiltrate and fibrosis. This result is outstanding taking in mind that myocarditis is the hallmark of Chagas disease. The obtained results indicate that the development of a subunit vaccine formulated with already assessed and approved adjuvants suitable for human use could be feasible. The results are very promising for further study of this formulation towards clinical trials.

**Capítulo I:**

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

## I.1 INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), fue descrito por primera vez por el Dr. Carlos Chagas en el año 1909 en Minas Gerais Brasil bajo el nombre de *Schizotrypanum cruzi*, debido a su creencia de su multiplicación por esquizogonia. Este nombre se basaba en un concepto errado y fue retirado, por el mismo Chagas, incluyendo a la especie en el género *Trypanosoma*. Este parásito es el causante de la enfermedad de Chagas que constituye la principal endemia de América Latina, siendo la sexta enfermedad tropical más importante del mundo. Se estima que entre 15 y 16 millones de personas están infectados y que, actualmente, entre 75 y 90 millones de personas están en riesgo de infectarse (Coura y Días, 2009). A causa de las migraciones, la enfermedad se ha propagado a zonas no endémicas como EEUU, Canadá, Europa, Japón y Australia (Schmunis y Yadon, 2010). Dicha enfermedad supone un grave problema social y económico en las áreas endémicas, causando un impacto considerable en la salud pública de los países latinoamericanos. La enfermedad de Chagas persiste en forma crónica, causando problemas cardiacos e intestinales que resultan en una reducción de la calidad de vida y capacidad laboral de adultos jóvenes, conduciendo a graves problemas económicos en las áreas endémicas (Martins-Melo y col., 2012).

### I.1.1. El Agente etiológico de la enfermedad de Chagas

#### I.1.1.1. El parásito.

El parásito *Trypanosoma cruzi*, es un protista del orden Kinetoplastida, de la familia Tripanosomatidae (Tabla 1). Dicha familia está caracterizada por poseer un solo flagelo y un mitocondrión, dentro del mismo se encuentra ordenada una compleja y compacta red de ADN extranuclear denominada kinetoplasto.

**Tabla 1:** Taxonomía de *Trypanosoma cruzi*

	<b>Taxonomía</b>	<b>Característica</b>
<b>Súper Reino</b>	Eucariota	Posee núcleo verdadero.
<b>Reino</b>	Protista	Seres unicelulares.
<b>Filum</b>	Sarcomastigophora	Movilidad por flagelos o pseudópodos.
<b>Subfilum</b>	Mastigophora	Movilidad por flagelos.
<b>Clase</b>	Zoomastigophora	Huésped animal.
<b>Orden</b>	Kinetoplastida	Presencia de kinetoplasto.
<b>Familia</b>	Tripanosomatidae	Posee un único flagelo libre, que nace cerca del kinetoplasto.
<b>Genero</b>	Trypanosoma	Requiere de dos huéspedes, uno invertebrado y el otro vertebrado para completar su ciclo biológico.
<b>Especie</b>	cruzi	Reproducción celular en el huésped vertebrado. Causante de la enfermedad de Chagas.

*T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo y adopta diferentes formas en su evolución. Estas poseen características propias que reflejan su adaptación a los distintos hábitats por los que deben pasar durante su ciclo evolutivo, en el que alterna entre hospederos multicelulares, uno invertebrado y otro vertebrado. Los principales estadios del parásito son:

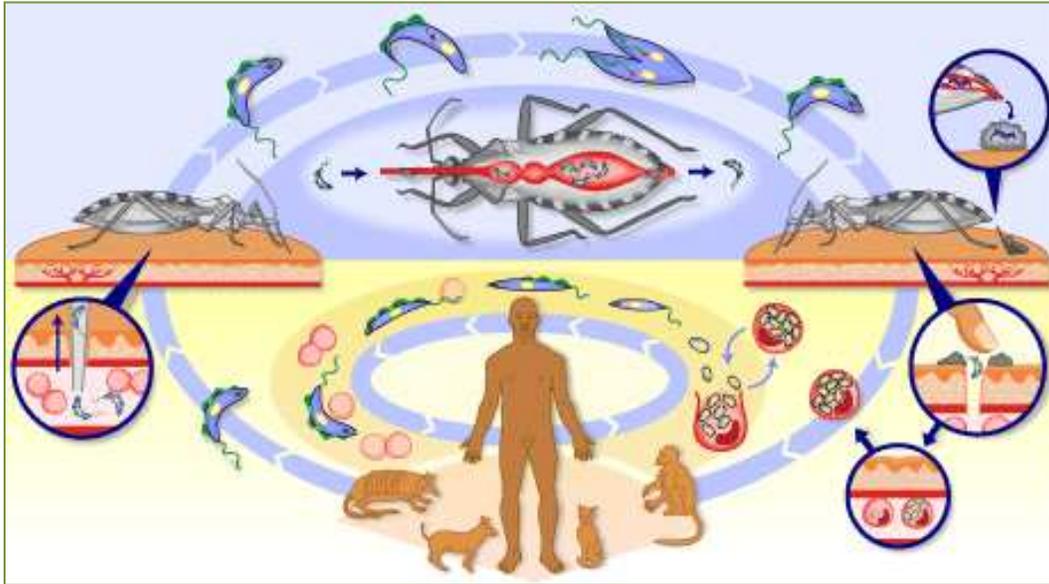
**Tripomastigote:** Forma alargada con el kinetoplasto situado detrás del núcleo. Es la forma infectiva del parásito. Dicho estadio está presente en circulación sanguínea en el mamífero (tripomastigotes sanguíneos) y en la ampolla rectal en el vector y carece de capacidad replicativa (tripomastigotes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

**Amastigote:** Forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre, este estadio es de localización intracelular y es la forma replicativa en el mamífero.

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

#### **I.1.1.2. Ciclo de vida de *T. cruzi***

El ciclo comienza cuando insectos hematófagos de la familia Reduviidae, succionan la sangre de los vertebrados infectados con el tripomastigotes (Figura 1). Una vez ingerida, la mayoría de los parásitos se lisan en el estómago del insecto. Algunos tripomastigotes se transforman ya sea en la etapa esférica (conocida como esferomastigotes) o en epimastigotes, migran al intestino donde se dividen intensamente y se pegan a la membrana perimicroviliar. Esta etapa de adhesión parece ser importante para desencadenar el proceso de transformación de los epimastigotes no infecciosos en tripomastigotes altamente infecciosos. En la región posterior del intestino y en el recto, muchos epimastigotes se desprenden de la superficie intestinal y se transforman en tripomastigotes metacíclicos, siendo liberados junto con las heces y orina. Esta etapa es altamente infecciosa para varias especies de mamíferos, incluyendo al humano. Por lo general, la infección de mamíferos tiene lugar a través de la inoculación directa de éstas formas a través de la mucosa ocular o de la piel lesionada durante la ingesta del insecto (de Souza y col., 2010).



**Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*.** Se muestran las diversas formas del protozooario en el invertebrado (triatominos) y huéspedes vertebrados (mamíferos) (WHO, 2006).

Una vez en el huésped vertebrado, los tripomastigotes invaden células en el sitio de la inoculación, como fibroblastos, macrófagos y células epiteliales, en un proceso que implica una gran variedad de moléculas presentes tanto del parásito como de la célula del hospedero. *T. cruzi* es internalizado por las células del huésped a través de múltiples vías endocíticas. Estudios morfológicos han demostrado que, después de la interacción de las formas infectivas de *T. cruzi* con células fagocíticas o del tipo no fagocíticas, la membrana plasmática (PM) pueden formar salientes similares a las observadas durante los eventos de macropinocitosis (Barrias y col., 2013). Además, se ha demostrado que varias moléculas conocidas como marcadores moleculares de membrana, macropinocitosis y fagocitosis, están presentes en el sitio de invasión. Después de la penetración, los componentes del sistema endosomal-lisosomal, tales como los endosomas tempranos, tardíos y lisosomas, participan en la formación de la vacuola parasitófora. Una vez desarrollada, los tripomastigotes se transforman en la forma amastigote y lisan la membrana de la vacuola con enzimas secretada por el parásito (de Carvalho y col., 1989). De este modo los amastigotes entran en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped, dando lugar a la reproducción asexual por fisión binaria. Luego pasan al estadio tripomastigotes y son liberados durante la ruptura celular, infectando otras células o re-ingresando al torrente sanguíneo (Figura 1).

### **I.1.1.3. Vías de transmisión**

La transmisión vectorial, descrita anteriormente, es la principal vía de transmisión de *T. cruzi*. Sin embargo, la transmisión vertical, que se produce desde una madre infectada a su hijo, es la que prevalece en lugares donde el vector ha sido erradicado. Otras vías de transmisión pueden darse por transfusión de sangre y trasplante de órganos. Hoy en día estos mecanismos son menos frecuentes debido al diagnóstico de Chagas en los análisis de los donantes de sangre y tejidos. Sin embargo, se ha demostrado que la vía oral es altamente infecciosa (Yoshida, 2009), habiéndose reportado numerosos casos por ingesta de alimentos contaminados por heces de los triatomos infectados, generando Chagas agudo por vía oral en el norte de Brasil (Nóbrega y col., 2009) y Venezuela (Pereira y col., 2009).

### **I.1.1.4. El genoma de *T. cruzi* y su clasificación en unidades discretas de tipificación**

Al comparar los pocos genomas de *T. cruzi* que se han secuenciados hasta la fecha, puede observarse la importante variabilidad genética que presentan entre sí. El primer genoma secuenciado fue el de la cepa CL-Brener. Dicho organismo es diploides, con 28 cromosomas 22.570 genes, contando con aproximadamente 12000 genes cada genoma haploide (El-Sayed y col., 2005). Estos genes se encuentran organizados en grandes núcleos policistrónicos de diez a cientos de genes codificados por un solo promotor. Hay regiones variables y repetitivas de familias de genes que codifican proteínas de superficie como la transialidasa, mucinas, MASP, entre otros.

En la secuenciación de la segunda cepa de *T. cruzi* indexada, la cepa Sylvio X10, el análisis comparativo arrojó que varias familias de genes multicopia incluyendo la mucina, MASP y GP63, contenían sustancialmente menos número de genes en Sylvio X10/1 que en la cepa CL-Brener (Franzén y col., 2011). Este estudio proporciona un marco para profundizar el análisis comparativo de dos grandes linajes de *T. cruzi* y también destaca la necesidad de que la secuenciación de más cepas para entender completamente la composición genómica de este parásito.

La estructura poblacional de *T. cruzi* ha sido examinada en múltiples niveles, con las mas poderosas heramientas de cada época. Con el pasar de los años las diferentes denominaciones utilizadas para poder clasificar a *T. cruzi*, ha reflejado la biología única que presenta este organismo (Sturm y Campbell, 2010). De este modo, *T. cruzi* fue clasificado en zimodemas (Miles y

col., 1977), schizodemás (Morel y col., 1980), biodemas, clones, linajes (Souto y col., 1996), clades y finalmente unidad discreta de tipificación (UDT) (Zingales y col., 2009). Así, dada la diversidad genética de *T. cruzi*, se clasificó el género en seis Unidades discretas de tipificación (UDT), UDT I-VI compartiendo cada UDT patrones característicos al ser evaluados con diferentes técnicas de tipificación (Zingales y col., 2009). Cabe destacar que, a excepción de la UDT IV, se han aislado todas las UDT restantes en pacientes infectados, no habiéndose podido establecer una correlación entre la UDT y las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

#### **I.1.1.5. Inmunidad contra *T. cruzi***

El reconocimiento innato de patógenos intracelulares como *T. cruzi* debe funcionar en al menos tres niveles en el control de la infección: (1) la detección y destrucción directa de los parásitos por las células del sistema inmune innato, en particular los macrófagos y las células dendríticas (DC), (2) la activación de células dendríticas y macrófagos para convertirse en presentadoras de antígenos y activadores potentes de la respuesta inmune adaptativa y (3) la detección de la infección por células no hemapoyéticas, siendo estas células las primeras presentes en la invasión por el parásito (Tarleton, 2007).

La respuesta inmune innata implicada en el reconocimiento del parásito incluye los receptores de reconocimiento de patrones (RRP), siendo los TLR (de sus siglas en inglés receptores tipo Toll) los más estudiados hasta la fecha y aquellos más implicados en el reconocimiento del parásito son los TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9 (Caetano y col., 2011; Tarleton y col., 2007). Una respuesta inflamatoria eficaz contra *T. cruzi* implica vías dependientes de activación de la molécula MyD88, siendo dichas moléculas, junto a los receptores TLR2 y TLR9 fundamentales para la detección y el control de la infección por *T. cruzi* (Bafica y col., 2006). También se ha descrito la participación de los receptores solubles NLR (de sus siglas en inglés receptores tipo NOD) en el montaje de la respuesta inmune contra el parásito. Entre estos se encuentran los constituidos por las proteínas NOD1 (Dominios de oligomerización de unión a nucleótidos 1) y el inflamasoma NLRP3/ASC/caspasa-1. Estos receptores solubles también parecen estar implicados en la detección del parásito y la generación de una respuesta inflamatoria (Clay y col., 2014).

Las células natural killers (NK) parecen ser la primera fuente de IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  y otras citoquinas proinflamatorias (Aliberti y col., 2001; Almeida y Gazzinelli, 2001). Estas citoquinas

activan las vías del estallido oxidativo, como la producción de especies reactivas de oxígeno (de sus siglas en inglés ROS), producción de óxido nítrico por los macrófagos activados y la producción mieloperoxidasas producidas por los neutrófilos, siendo los componentes esenciales del sistema inmune innato para eliminar al parásito. Se sugiere que el IFN- $\gamma$  de origen NK y la IL-12, provista por los macrófagos, sesgan la diferenciación de células T helper hacia un fenotipo protector Th1. Las células T CD4 específicas hacia el parásito son necesarias, ya que ayudan en el control de *T. cruzi* a través de la secreción de citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2), la amplificación de la actividad fagocítica de los macrófagos, la estimulación de la proliferación de células B y la producción de anticuerpos y la diferenciación y activación de células T CD8 (Vázquez-Chagoyán y col., 2011). Una fuerte respuesta de anticuerpos líticos, es necesaria para aumentar la opsonización, fagocitosis y la destrucción de los parásitos mediada por complemento (Krautz y col., 2000).

Se ha demostrado que las citoquinas inmuno reguladora IL-10 y TGF- $\beta$  generan susceptibilidad a la infección aguda (Cardillo y col., 1996). La neutralización endógena de la IL-10 conduce a un aumento de la producción inducida por *T. cruzi* de IFN- $\gamma$  y a la eliminación del parásito, aunque la ausencia total de citoquinas antiinflamatorias generó graves efectos negativos en el huésped infectado. Ratones deficientes en IL-10 infectados con *T. cruzi* desarrollaron un síndrome de shock endotóxico debido a la gran producción de TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  (Hölscher y col., 2000).

En conjunto, estos resultados subrayan la importancia de las dos respuestas inflamatorias y anti-inflamatorias durante la infección por *T. cruzi*, e indican que la relación IL-4 + IL-10 / TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  puede ser un determinante importante en el resultado de la infección con *T. cruzi* (Machado y col., 2012).

Una vez que se activa la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> específica para *T. cruzi*, se observa una cinética similar a la descrita para muchas infecciones virales y bacterianas. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son cruciales para el control de la infección por el parásito, aunque son indispensable para la supervivencia del huésped, su acción no elimina completamente al parásito (Padilla y col., 2009). La activación inicial de células citotóxicas no se evidencia hasta más de una semana luego de la introducción del parásito. Se cree que esta demora está relacionada con la capacidad de *T. cruzi* de realizar una infección inicial "silenciosa" y que la activación de la respuesta innata y, posteriormente, la respuesta inmune adaptativa no se produce hasta después de la primera ronda de replicación del parásito y reinvasión. Sumado a esta característica, el sistema inmune controla

al parásito en la mayoría de los sitios de los tejidos, aunque es incapaz de eliminarlo en el músculo y el tejido adiposo. Curiosamente estos tejidos son similares en que preferentemente almacenan y utilizan los ácidos grasos como fuentes de energía y es posible que esta condición metabólica proporciona una ligera ventaja de supervivencia para *T. cruzi* en estos sitios (Padilla y col., 2009).

En la infección crónica por *T. cruzi*, la generación sostenida de las ROS de origen inflamatorio en el corazón, junto con una respuesta inadecuada antioxidante, conduce al estrés oxidativo a largo plazo. Así, mientras las ROS son esenciales para la activación de las respuestas inflamatorias y control del patógeno en una fase aguda, el estrés oxidativo persistente, niega el control del estado inflamatorio en el huésped. Además, *T. cruzi* intracelular, o los antígenos que persisten durante la infección crónica, puede/n interactuar con las células inmunes y no inmunes en el miocardio y, posteriormente, activan las cascadas de señalización que desencadenan la producción de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Estas citoquinas junto con las ROS, generan hipertrofia de los miocitos cardíacos, desempeñando un papel importante en la remodelación cardíaca y la evolución de la enfermedad crónica de Chagas (revisado por Machado y col., 2012).

En relación a las células T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi*, luego de la infección aguda, se contraen y forman una población de memoria, que se mantienen principalmente por la presencia del antígeno, y por lo tanto tienen el fenotipo de células de memoria efectoras (T<sub>EM</sub>) (Bixby y Tarleton, 2008). Una subpoblación de células CD8<sup>+</sup> de memoria central (T<sub>CM</sub>) apenas es detectada al final de la fase aguda de la infección, pero aumenta en frecuencia a medida que la infección se hace más crónica. Estas células T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> son una población poco reactiva frente a la estimulación del TCR (receptor de linfocitos T) a pesar de la persistencia del parásito (Bixby y Tarleton, 2008). Cuando las infecciones duran décadas, tal como la infección humana con *T. cruzi*, los pacientes crónicos tienen niveles bajos y a veces no detectables de respuestas de células T específicas de *T. cruzi*. Las mismas son propensas a la apoptosis, conduciendo al agotamiento (exhausting) impulsado por la persistencia antigénica (Padilla y col., 2009). En conjunto, la infección por *T. cruzi* se controla suficientemente bien en las infecciones a corto plazo manteniendo una respuesta altamente eficaz de células T CD8<sup>+</sup>, pero que cuando la infección se extendió a décadas, incluso un bajo nivel de persistencia del patógeno puede comprometer la preservación de las respuestas de células T CD8<sup>+</sup>.

## **I.1.2. Enfermedad de Chagas**

### **I.1.2.1. Etapas de la enfermedad de Chagas**

#### **I.1.2.1.1. Fase aguda**

Una vez que ingresa el parásito al organismo, se desarrolla la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Esta se caracteriza por una elevada parasitemia, pudiendo durar entre seis y ocho semanas. Se puede presentar, en la zona de inoculación, una reacción local cutánea (chagoma), y si es en las cercanías de los ojos, un edema orbital unilateral (Signo de Romaña). Los pacientes también pueden presentar fiebre, malestar, adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia. En muy pocos casos desarrollan problemas más severos como miocarditis aguda o meningoencefalitis que puede ser fatal, siendo su prevalencia más alta en menores de 5 años, ancianos, inmunocomprometidos o en los casos de una elevada ingesta de parásitos (Yoshida y col., 2011). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos presenta escasa sintomatología por lo que la infección pasa desapercibida al huésped, siendo comúnmente diagnosticada en el estadio crónico de la enfermedad. (Moncayo y Ortiz, 2006).

#### **I.1.2.1.2. Fase Crónica sin patología demostrada**

Luego de dos meses de infección, la parasitemia disminuye a niveles indetectables y los individuos ingresan en una fase crónica sin patología demostrada, en la cual no hay manifestaciones de daño hacia un órgano y los estudios de electrocardiograma, radiología del corazón, esófago y colon son normales. Esta etapa de la infección se caracteriza por la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*. Alrededor del 60 y 70 % de los individuos infectados permanecen en este estadio asintomático toda su vida e incluso nunca se enteran de la infección (Moncayo y Ortiz Yanine, 2006).

#### **I.1.2.1.3. Fase crónica con patología demostrada**

El 30-40% de las personas infectadas evolucionan lentamente hacia los signos patológicos propios de la enfermedad de Chagas. En esta etapa, la patología subyacente está determinada por manifestaciones clínicas y funcionales tales como lesiones inflamatorias y degenerativas sumadas

a la fibrosis generada en las estructuras afectadas. Las diferentes formas clínicas pueden presentarse como:

**Forma Cardíaca:** Entre el 20 y 30 % de las personas crónicas desarrollan la Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC). Esta es la forma más común y se manifiesta por la insuficiencia cardíaca congestiva, las tromboembolias y la muerte súbita cardíaca, donde el 90 % de los casos con CCC mueren dentro del lapso de 5 años. En estadios avanzados presenta un marcado agrandamiento de las cavidades cardíacas, hipertrofia y arritmias. En el tejido miocárdico se genera necrosis, siendo reparado por tejido conectivo denso (fibrosis) acompañado de infiltrado celular inflamatorio.

**Forma Digestiva:** Entre un 10 y 15 % de los infectados sufren daño digestivo, principalmente megavísceras. Los pacientes presentan dilatación del esófago y/o colon (megaesófago y megacolon) debido probablemente a las disfunciones neuronales ocasionadas por el parásito. La asociación de la enfermedad cardíaca con megaesófago o megacolon, define la forma cardiodigestiva de la enfermedad de Chagas, aunque su prevalencia exacta no se conoce debido a la escasez de estudios apropiados (Rassi y col., 2010; Vicco y col., 2012).

### **I.1.2.2. La enfermedad de Chagas en el actual contexto socioeconómico**

Existe un consenso creciente de que la enfermedad de Chagas ya no se limita a un mal de las zonas rurales pobres de América Latina, sino que constituye un problema de salud pública en todo el mundo y que lo seguirá siendo en el futuro previsible (Bonney, 2014).

Según algunas estimaciones, el número de personas infectadas por *T. cruzi* en América Latina se ha reducido en un 50% o más en los últimos 25 años, desde un máximo del 30 millones en 1990 (Dias y col., 2008), a un total actual de 10 a 15 millones (Coura y Días, 2009). El control del insecto vector que transmite la infección ha sido históricamente el principal objetivo de los programas de salud, los cuales ayudaron a reducir en gran medida la prevalencia de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, en los Estados Unidos y varios países no endémicos de Europa y la región del Pacífico Occidental han experimentado un aumento considerable en el número de individuos infectados con *T. cruzi*, siendo de más de 300,000 el número de pacientes infectados en los Estados Unidos, más de 80.000 en Europa y más de 10.000 en otros países no endémicos, especialmente Australia, Canadá y Japón (revisado por Bonney, 2014). El costo económico total atribuido a la enfermedad cada año se estima en más de \$ 7 mil millones de dólares, con más del

10% de este costo se incurre en los Estados Unidos y Canadá. Para enfatizar en la problemática de dicha enfermedad, algunos autores la etiquetaron como " El nuevo SIDA de la Américas " debido a una serie de similitudes en la epidemiología y el impacto social entre las dos enfermedades (Hotez y col., 2012). Dentro de dicha comparación se puede destacar que la enfermedad de Chagas y el SIDA son afecciones crónicas causadas por patógenos transmitidos por la sangre, que requieren costosos tratamientos a largo plazo, existe una cura eficaz o una vacuna preventiva. Ambas enfermedades afectan a un gran número de personas y tienen un costo social y económico considerable. Ambas enfermedades presentan riesgos de infección en transfusiones de sangre, donación de órganos y de madres infectadas no tratadas a los hijos. Por otra parte, ambas enfermedades son altamente estigmatizantes y afectan de manera desproporcionada a las personas que viven en la pobreza y con menos posibilidades de acceder a la asistencia médica y social (Hotez y col., 2012). Si bien es interesante dicha comparación, otros autores rápidamente refutaron esta asociación como una comparación forzada e inexacta (Tarleton y Curran, 2012) o remarcando que la misma terminología no se puede utilizar para asociarlas, ya que presta a la confusión, distorsionando la realidad (Pays, 2012).

Un método que adoptó la OMS en los informes anuales de salud mundial, para referirse al impacto socioeconómico que aportan las enfermedades crónicas, son los años de vida potencialmente perdidos (AVPP). El AVPP es un indicador que se define como la suma algebraica de los años perdidos de los individuos, debido a la mala salud, discapacidad o muerte prematura, desde el momento en que sufren la patología de la enfermedad hasta haber cumplido con la esperanza de vida del país o región. En la enfermedad de Chagas el AVPP, está estimado en 662 mil años de vida a partir de 2008, casi seis veces la cifra de la malaria, y diez veces más comparada con el dengue o leishmaniosis, dato calculado para América Central y Sur (Hotez y col., 2008). Debido a que afecta de manera desproporcionada a las personas de bajos ingresos, tiene un efecto considerablemente perjudicial sobre la capacidad de las personas a continuar su educación, obtener y ahorrar sus ingresos, siendo esta enfermedad parte de un ciclo de auto-reproducción de la pobreza en muchas regiones endémicas (Bonney, 2014).

### **I.1.2.3. Tratamiento**

Los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la infección por *T. cruzi* son el nifurtimox y benznidazol. Sin embargo dichos tratamientos cuentan con diversas limitaciones:

en muchos países no están disponibles porque no están registrados o cuentan con precios de difícil acceso, además ambos tienen efectos secundarios frecuentes y graves. Además, los medicamentos anti-parasitarios no son eficaces una vez que los pacientes entran en la fase crónica de la infección, siendo su eficacia del 80% en casos agudos con total seroconversión, mientras que es menor al 20 % en casos crónicos (Coura y Borges-Pereira, 2012). Actualmente se está estudiando si el uso de benznidazol es beneficioso para el tratamiento de pacientes crónicos sintomáticos. Dicho estudio, llamado “the Benefit Project-Evaluación del Benznidazol para la interrupción de la Tripanosomiasis”, es un estudio multicéntrico internacional que evalúa el efecto del benznidazol en pacientes crónicos con cardiopatía chagásica crónica. El mismo se encuentra actualmente en curso (Marin-Neto y col., 2009; Marin-Neto y col., 2008). El nifurtimox es un nitrofurano con un mecanismo de acción que implica, en presencia de oxígeno, la producción del radical nitro-anión que actúan sobre *T. cruzi* debido a la incapacidad del parásito de desintoxicar los radicales libres. Por otro lado, la acción del benznidazol se basa en la unión de sus metabolitos en el ADN del parásito, sus lípidos y proteínas. Existen otros fármacos, por ejemplo, el posaconazol, amiodarona, Tak-187, K777 y el albaconazol, que han demostrado ser eficaces en modelos experimentales y estudios preclínicos (Ribeiro y col., 2010), pero que aún no han sido empleados en ensayos clínicos a gran escala.

Actualmente el tratamiento de los pacientes cardíacos crónicos es sintomático, requiriendo un seguimiento continuo del paciente. Para la evaluación de la enfermedad y el tratamiento a los pacientes, se debe disponer de una infraestructura clínica especializada. Esto, genera un problema a los individuos que habitan en comunidades alejadas de las grandes ciudades o en regiones rurales, lo que deriva en la interrupción del seguimiento y/o del tratamiento de la enfermedad.

### **I.1.3. Diseño de vacunas para humanos**

#### **I.1.3.1. Definición de vacuna**

Se cree que los primeros intentos de vacunar se remontan a la antigüedad, habiendo registros documentados en China para la inmunización contra la viruela en el siglo VI. Sin embargo el primer intento científico de controlar una enfermedad infecciosa por inoculación sistemática deliberada es el trabajo de Edward Jenner con la vacuna de la viruela bovina (Criado y col., 2008).

El siguiente avance en vacunación fue conseguido por Pasteur con sus estudios de vacunación con el virus del cólera aviar entre otras. En los últimos 200 años, la vacunación ha conseguido controlar varias enfermedades importantes, al menos en ciertas partes del mundo: viruela, difteria, tétanos, poliomielitis y sarampión, entre otras. A excepción de la potabilización del agua, ninguna otra actuación del hombre, ni siquiera el uso de los antibióticos, ha tenido tan gran efecto en la reducción de la mortalidad y el crecimiento de la población (Jimenez, 2001).

Las vacunas están compuestas por tres elementos fundamentales: I) el **Inmunógeno**, sustancia capaz de producir una respuesta inmune específica frente a un determinado patógeno, puede tratarse de todo el microorganismo vivo, componentes del mismo como proteínas y/o polisacáridos o del material genético del patógeno; II) los **adyuvantes**, son sustancias que aumentan y modulan la respuesta del inmunógeno, a través del reconocimiento específico de receptores de la respuesta innata y III) el **Sistema de Administración Controlada (delivery)**, estos eventualmente también permiten transportar al inmunógeno y generar su liberación y presentación al sistema inmune del hospedador en forma controlada (Figura 2).

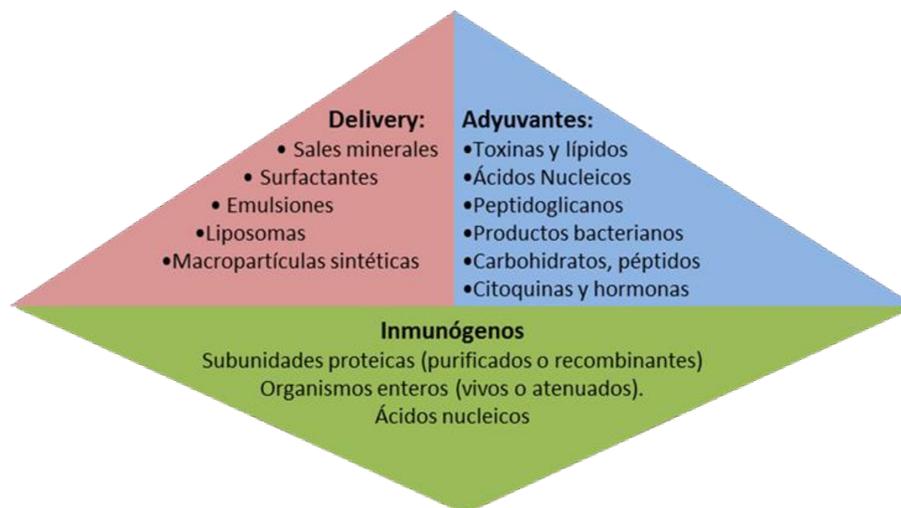


Figura 2: Esquema de los componentes de una vacuna. Se indican ejemplos de cada sección.

### I.1.3.2. Tipos de vacunas

Existen diferentes clasificaciones para las vacunas, siendo la más utilizada por los autores que han revisado el tema la siguiente:

**Vacunas vivas:** Contienen microorganismos vivos que infectan al huésped de una forma similar a como ocurre en la infección natural, aunque sin la virulencia de ésta y provocando así una respuesta inmune similar a la inducida por el microorganismo de tipo salvaje, durante la infección natural. Dichos microorganismos están atenuados, lo que implica que la capacidad de los mismos de causar enfermedad está virtualmente eliminada por las manipulaciones biológicas o técnicas que se realizan durante la preparación de la vacuna.

**Vacunas muertas:** Poseen microorganismos enteros que han sido inactivados por medios físicos o químicos de manera tal que el mismo no puede multiplicarse o diseminarse para causar la enfermedad. Estos agentes inactivos exponen una gran variedad de inmunógenos al sistema inmune creando una respuesta protectora cuando ingresa el patógeno salvaje.

**Vacunas de ADN, a virus y bacterias:** Las vacunas de ADN desnudo, se basan en inocular intramuscularmente ADN o ARNm que codifique un inmunógeno vacunal, el mismo es captado por las células en donde se produce la síntesis del inmunógeno. Esta proteína foránea es procesada en el citoplasma de las células del huésped (siendo células musculares en su mayoría, por el tipo de inoculación) y presentada en el marco de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, iniciando así el desencadenamiento de la una respuesta inmune. Para el caso de las vacunas a virus, el ADN del antígeno está codificado junto al ADN viral. Estos virus presentan capacidad deficiente o nula de replicación, aunque de igual modo ingresan a las células y liberan el ADN exógeno para ser expresado por el huésped. Las vacunas de bacterias, son bacterias atenuadas que expresan el antígeno vacunal como una proteína propia, siendo procesadas por las células del sistema inmune cuando fagocitan a dichas bacterias. Los modelos de vacunas de virus y de bacterias tienen la ventaja de estimular la respuesta innata mediante la activación de los diferentes TLR, aumentando la inmunogenicidad de los antígenos evaluados.

**Vacunas a subunidades:** Se basan en la producción de una o más proteínas de un agente infeccioso sin la necesidad de incorporar el microorganismo entero. Las proteínas pueden ser obtenidas a partir del microorganismo en cuestión o mediante técnicas de ingeniería genética expresándolas *in vitro* en diferentes vectores de expresión. Estas son consideradas las vacunas

más seguras porque al ser definidas periten un control estricto de la calidad de los insumos y, al no involucrar material genético, no presentan riesgo de inserción en el genoma. A pesar de estas ventajas, las mismas han presentado tradicionalmente la característica de generar respuestas inmunológicas pobres y por lo tanto de baja protección. Sin embargo, el desarrollo actual de nuevos adyuvantes permite revertir esa tendencia por lo que un nuevo panorama se ha abierto para el desarrollo de estas vacunas. Este vuelco de paradigma está apoyado conceptualmente por dos importantes avances recientes de la inmunología: la presentación cruzada y los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos. La descripción a mediados de la década del 90 de la presentación cruzada permitió visualizar que una presentación en el contexto MHC I podía lograrse con antígenos extracelulares y, por otro lado, la descripción también reciente de que la activación de los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos en las células inmunes, permite orientar el tipo de respuesta inmunológica.

#### **I.1.4. Desafíos en la producción de una vacuna contra *T. cruzi***

Después de más de 100 años de la descripción de la enfermedad de Chagas, no se ha podido establecer una explicación clara al largo período de latencia entre la infección y el desarrollo de la enfermedad, siendo únicamente un subgrupo de individuos el que progresa a la patología de la enfermedad crónica. Dos mecanismos, la autoinmunidad y la persistencia del parásito, se proponen para responder las patologías inflamatorias en corazones chagásicos.

En un comienzo la teoría autoinmune era el mecanismo más adoptado por los investigadores, para explicar la Miocardiopatía Chagásica crónica, esto era debido a la incapacidad de detectar antiguamente al parásito en los estadios avanzados de la enfermedad. Esta teoría afirma que las reacciones inmunes humorales y celulares, provocadas en respuesta a la infección por *T. cruzi*, se producen contra antígenos propios, lo que llevaría al desarrollo y/o la propagación de lesiones patológicas en la miocarditis Chagásica (Bonney y Engman, 2008). Sin embargo, muchos indicios indican que la enfermedad cardíaca chagásica crónica se produce por un bajo grado de la infección sistémica con reacciones inmunes adversas documentadas (Tarleton y col., 2003). Apoyando esta hipótesis, las nuevas tecnologías de PCR, inmunohistoquímica y microscopía confocal, han detectado antígenos o ADN del parásito en sangre de pacientes infectados y han podido demostrar la persistencia del parásito durante la etapa crónica. Esto se suma a los informes de transmisión de *T. cruzi* por transfusión de sangre y trasplante de órganos infectados,

obtenidos de individuos asintomáticos, y la reactivación de la parasitemia aguda en individuos crónicos inmunodeprimidos después del trasplante de corazón (Campos y col., 2008) o pacientes con VIH (Cordova y col., 2008). De este modo, la persistencia del parásito ofrece antígenos suficientes y consistentes que trabajan como un disparador para establecer un ambiente inflamatorio persistente perjudicial para las fibras miocárdicas, provocando lesiones en el tejido y posteriormente generan la insuficiencia cardíaca.

Dado estos antecedentes que indican que naturalmente el sistema inmune sólo logra disminuir la parasitemia llevando la infección a una fase crónica, una vacuna contra *T. cruzi* debería redirigir la respuesta inmune del huésped para así lograr erradicar definitivamente la infección del parásito. En ese sentido, un control efectivo del parásito debería lograrse mediante una respuesta inmune compleja que involucre anticuerpos líticos, citoquinas asociadas a una respuesta tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) y linfocitos T CD8 citotóxicos. Es esta respuesta la que se pretende lograr en una vacuna contra *T. cruzi* (Dumonteil, 2009; Rodrigues y col., 2009).

En el escenario multivariado que supone la infección y el desarrollo de la enfermedad de Chagas, la elaboración de una vacuna supone la clave para el control de dicha enfermedad. Esto implicaría no solo la eliminación del desarrollo de la infección con *Trypanosoma cruzi*, sino también la reducción de enfermedades cardíacas severas, que van asociadas a la disminución de la calidad de vida, desempleo, y gastos médicos. Una vacuna contra *T. cruzi* podría proporcionar un beneficio económico sustancial, dependiendo del costo de la vacuna en un amplio rango de tasas de infección. Pudiendo ser rentable aún en zonas de baja tasa de infección y con un rango moderado de protección (Lee y col., 2010).

#### **I.1.5. Avances en la vacuna contra *T. cruzi***

En los últimos 20 años, los trabajos publicados en el desarrollo de una vacuna se orientaron hacia obtener una respuesta celular eficaz para la eliminación de *T. cruzi*. Para esto, un amplio rango de formulaciones fue evaluado abarcando principalmente vacunas de ADN hasta vectores virales y bacterianos y en menor medida parásitos vivo y atenuado o proteínas recombinantes (Vázquez-Chagoyán y col., 2011).

### **I.1.5.1. Vacunas vivas atenuadas**

Las vacunas vivas de *T. cruzi*, fueron desarrolladas mediante cepas del parásito atenuadas, ya sea por tratamiento con agentes farmacológicos, pasaje en serie en cultivos in vitro o knockout de genes potencialmente virulentas (Garg y Bhatia, 2005; Pérez Brandan y Basombrío, 2012; Sánchez-Valdéz y col., 2014). Estas han demostrado su potencial en modelos murinos y en perros, logrando un control de las infecciones con cepas virulentas (Pérez Brandan y Basombrío, 2012). Sin embargo, tales vacunas tienen el inconveniente de presentar riesgo de reversión hacia una cepa virulenta y del peligro de que una cepa atenuada sea virulenta en individuos inmunocomprometidos. Por eso, esta estrategia ha sido básicamente propuesta para inmunizar perros y animales domésticos con el objetivo de disminuir la transmisión del ciclo doméstico (Garg y col., 2005; Pérez Brandan y Basombrío, 2012). Más allá de su posible riesgo, estos estudios, demostraron que una vacuna profiláctica es capaz de provocar inmunidad protectora contra la infección por *T. cruzi* durante largos periodos de tiempo.

### **I.1.5.2. Vacunas de subunidad**

Las primeras evaluaciones en proteínas de *T. cruzi* con potencial para una vacuna de subunidad, comprendieron las proteínas GP90, GP82, GP56, Cruzipaína (CZ), FRA, Transialidasa (TS), TC52, CRP y ASP2, entre otras (Tabla 2A, revisado por Dumonteil, 2009; Vázquez-Chagoyán y col., 2011). Como se observa en la tabla 2A, la TS y la CZ son las proteínas que más porcentaje de protección generaron (Fontanella y col., 2008; Frank y col., 2003; Hoft y col., 2007), siendo candidatos habituales en diferentes plataformas vacunales. El empleo de proteínas recombinantes ha logrado importantes avances en la protección contra la infección de *T. cruzi* pero ha sido poco explorado en relación a la implementación de la tecnología de vacunas de ADN o virus recombinantes. Esto es así ya que resultados preliminares han sido muy favorables con estas últimas estrategias y que por otro lado las proteínas aisladas son poco inmunogénicas (por lo que requieren ser coadministradas con adyuvantes efectivos). En consecuencia, durante mucho tiempo se ha trabajado principalmente sobre la base racional de lograr una respuesta inmunológica celular, como la que presentan la inmunización génica o los virus recombinantes. Como se mencionó anteriormente, existe actualmente un cambio de paradigma conceptual que habilita el desarrollo de este tipo de vacunas.

### I.1.5.3. Vacunas de ADN

Debido al concepto generalizado de lograr una activación de la respuesta celular mediante una vacuna de ADN, la principal línea de investigación se enfocó, en los últimos años, hacia esa tecnología (Tabla 2B). Por lo tanto, el enfoque de la inmunización con ADN se vio favorecido y fácilmente fue adoptado por su capacidad para inducir citoquinas Th1 y respuestas inmunes de células T CD8<sup>+</sup> necesarios para el control de *T. cruzi*, sumado a la facilidad de construcción y producción de los vectores, estabilidad del ADN (Dumonteil, 2007). Varias proteínas de *T. cruzi* se han probado como vacunas de ADN,; miembros de la familia de la transialidasa: TSA1, ASP1, Asp2 y TS, TSSA y otros: KMP11, LYT1, CRP, CZ, PFR (revisados por Cazorla y col., 2009; Dumonteil, 2007; Rodrigues y col., 2009; Vázquez-Chagoyán y col., 2011). Con esta metodología se ha logrado gran protección utilizando distintos modelos de ratones y cepas de parásitos, además existe la ventaja de que se puede modular la respuesta con la implementación de citoquinas o moléculas que se coexpresan con el antígeno. Sin embargo dichos resultados no han podido ser reproducidos con el mismo éxito en grandes mamíferos y es actualmente un tema de controversia la posibilidad de la inmunización génica en humanos debido a los riesgos que esta metodología podría implicar por posibles mecanismos de recombinación o inserción en el genoma (Williams y col., 2009). Sumado a que actualmente no existe en el mercado una vacuna de ADN para humanos, los estudios de seguridad de la vacunas podrían durar varios años antes de su aprobación para la evaluación en la fase clínica.

**Tabla 2: Ejemplos de vacunas de *T. cruzi* evaluadas:** se indican en la primera columna el antígeno, seguido del adyuvante (si se utilizó), el tipo de modelo utilizado indicando la cepa de ratón utilizada y la cepa de *T. cruzi* entre paréntesis. En la siguiente columna se indica el porcentaje de supervivencia indicando el tiempo en días de la infección realiza entre paréntesis. Y finalmente la referencia del trabajo. **A.** Vacunas de proteínas nativas purificadas o recombinantes. **B.** Vacunas de ADN. **C.** Vacunas de virus recombinante. (Vázquez-Chagoyán y col., 2011).

Antígeno	Adyuvante	Cepa de Ratón ( <i>T. cruzi</i> )	% de Sobrevida	Referencia
<b>A.</b>				
GP90	Saponina	CBA, Marmoset (Y)	60 (100)	Scott et al. (1985)
GP82	Al(OH) <sub>3</sub> o CpG-ODN	Balb/c (CL)		Eickhoff et al. (2010)
GP56	adyuvante de Freund	Swiss-Webster (Y)	40 (12)	Harth et al. (1994)
Cruzipaina	IL-12, CpG-ODN	C3H/HeN (RA), Balb/c	67–80 (60–100)	Frank et al. (2003),
PFR1, PFR2	Al(OH) <sub>3</sub> , Freund, IL-12	C57BL/6, Balb/c (Peru)	83–100 (30–60)	Luhrs et al. (2003),
TC52	Al(OH) <sub>3</sub> <i>B. pertusis</i>	Balb/c (Y)	62 (120)	Ouaissi et al. (2002)
CRP	adyuvante de Freund	Balb/c (Y)	10 (40)	Sepulveda et al. (2000)
ASP2	Al(OH) <sub>3</sub> , CpG-ODN	A/Sn (Y)	53 (60)	Araujo et al. (2005)
TS	CpG-ODN	Balb/c (Tul)	100 (84), 80 (48)	Giddings et al. (2010)
TS mutante	adyuvante de Freund	Balb/c (Tul)	100 (60)	Fontanella et al. (2008)
<b>B.</b>				
CRP		C3H/HeJ, Balb/c (Y)	100 (40)	Sepulveda et al. (2000)
TSA1	IL-12 + GM-CSF	BALB/c, C3H/HeSnJ, C57BL/6 (Brazil)	60 (140)	Garg and Tarleton (2002) Wizel et al. (1998)
ASP1	IL-12 + GM-CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6	< 60 (140)	Garg and Tarleton (2002)
ASP2	IL-12 + GM-CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6	80 (140)	Garg and Tarleton (2002)
ASP2		Balb/c (Y)	63 (60)	Vasconcelos et al. (2004)
ASP9		Balb/c (Y)	100 (60)	Boscardin et al. (2003)
ASP-3		A/Sn (Col)	80 (120)	Silveira et al. (2008)
TSA1 CTL epitope		C57BL/6 (Tul)	60 (60)	Chou et al. (2008)
TS		Balb/c (Y)	100 (50)	Costa et al. (1998)
TSSA	IL-12, RANK-L, IL-15	BALB/c, C3H/HeJ, C57BL/6	80–100 (40)	Katae et al. (2002)
KMP11	HSP-70	Balb/c (Y)	50 (70)	Planelles et al. (2001)
LYT1	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)	80 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
FCaBP	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)	0 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
TCβ3	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)	0 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
PFR2 or PFR3	HSP70	Balb/c (Y)	100 (35)	Morell et al. (2006)
TcG1	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		Bhatia et al.(2008)
TcG2	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		Bhatia et al.(2008)
TcG4	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		Bhatia et al.(2008)
TcG1 + TcG2 + TcG4	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		Bhatia et al.(2008)
ASP2 + TSA1	None	A/Sn (Y)	86 (60)	Vasconcelos et al. (2004)
ASP1 + ASP2 + TSA1	IL-12 + GM-CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6	83 (140)	Garg and Tarleton (2002)
TS		C57BL/6 (Brazil)	75 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
Mucina		C57BL/6 (Brazil)	25 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
pELI-TcT-E		C3H/HeN (RA)	80 (50)	Tekiel et al. (2009)
<b>C.</b>				
Ad-TSSA/MVA-TSSA	MVA-RANK-L	C57BL/6 (Tulahuen)	100 (50)	Miyahira et al. (2005)
rAD-ASP2		Balb/c (Y)	80 (160)	Machado et al. (2006)
rAD-TS		Balb/c (Y)	50 (160)	Machado et al. (2006)
rSeV-ASP2		C57BL/6 (Tul)	90 (50)	Duan et al. (2009)
rADASP2 + rAD-TS		Balb/c (Y)	100 (160)	Machado et al. (2006)

#### I.1.5.4. Vacunas a virus y bacterias

Los virus humanos recombinantes deficientes en la replicación tienen una capacidad sin precedentes para inducir respuestas inmunes del tipo Th1 (Rocha y col., 2004). Se han realizado varios estudios para evaluar la capacidad de los virus recombinantes que codifican genes de *T. cruzi* en la inducción de la protección contra la infección por este parásito en modelos experimentales (Tabla 2C, revisado por Vázquez-Chagoyán y col., 2011). Los adenovirus recombinantes que codifican antígenos Asp2 y TS, ensayados individualmente o en combinación, permitieron obtener gran cantidad de anticuerpos específicos, fuertes respuestas de células T y proporcionar un alto nivel de protección contra el desafío letal de *T. cruzi* en ratones (de Alencar y col., 2009; Machado y col., 2006). También han sido empleadas bacterias atenuadas como vectores vacúnales contra *T. cruzi*, como el caso de la utilización de *Salmonella entérica*. En dicha bacteria se expresaron diferentes antígenos como la CZ, el Tc52 y la Tc24 (Cazorla y col., 2014; Cazorla y col., 2008; Matos y col., 2014), logrando una importante protección contra la infección con *T. cruzi*, incluso ensayándose como vacuna oral en ratones (Cazorla y col., 2014). Al igual que las vacunas de ADN, la implementación de virus y bacterias atenuadas, debido a su probabilidad de reversión de la patogenicidad o integración en el genoma, generan el interrogante en relación a su seguridad para su uso en humanas. Por lo tanto, un cambio de enfoque, hacia la utilización de proteínas recombinantes con la implementación de adyuvantes de nueva generación, podría disminuir los tiempos de desarrollo a la hora de buscar una vacuna efectiva aprobada en humanos.

#### I.1.5.5. Candidatos vacunales de *T. cruzi*

Como se mencionó en los trabajos presentados sobre vacunas en *T. cruzi*, los candidatos vacunales Transialidasa y Cruzipaína formulados como ADN, proteína recombinante, combinaciones prime-boost, vectores de virus o bacterias se han empleado mayoritaria debido a su eficacia como las vacunas profilácticas y terapéuticas contra la infección por *T. cruzi* en ratones (Cazorla y col., 2014; Dumonteil y col., 2004; Hoft y col., 2007; Machado y col., 2006; Miyahira y col., 2005; Sanchez-Burgos y col., 2007). Algunos de los antígenos candidatos a vacunas (por ejemplo, ASP-2, TSA-1 y TS) también disminuyeron las reacciones inflamatorias y necrosis del músculo esquelético y el corazón en los ratones inmunizados e infectados, lo que es muy prometedor dado que estas lesiones son la principal características de la enfermedad de Chagas.

Los genes de la familia de la transialidasa, constituyen el grupo más grande de genes de *T. cruzi* representando más del 6% de los marcos abiertos de lectura del genoma del parásito (El-Sayed y col., 2005). A nivel inmunológico, estas proteínas se caracterizan por poseer epitopes muy inmunodominantes en el curso de la infección. En ese sentido, en un modelo de infección murino se describió que un único epitope de TS es reconocido hasta un 30% de las células T CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN- $\gamma$  (Martin y col., 2006; Tzelepis y col., 2008), lo que representa una inmunodominancia de células CD8<sup>+</sup> específicas hacia un epitope aun mayor que las descritas hasta el momento infecciones virales. Adicionalmente, se ha descrito que estas proteínas contienen epitopes subdominantes que también permiten desarrollar altos niveles de protección cuando son administrados en ausencia de epitopes dominantes o en ratones tolerizados hacia los antígenos dominantes (Dominguez y col., 2011; Rosenberg y col., 2010). Esta información, sumada a la gran protección que brinda la TS en todos los ensayos de inmunización y desafío, indica la relevancia de este antígeno para el desarrollo de vacunas contra *T. cruzi*.

### **I.1.6. Estrategias de la formulación de la vacuna y desarrollo de la hipótesis**

Tal como se ha mencionado, las vacunas de subunidades han mostrado ser tradicionalmente menos eficientes que otras plataformas, como las vacunas vivas o génicas, en lo referido al tipo de respuesta inmune celular. Sin embargo, la disponibilidad actual de diferentes adyuvantes ha permitido optimizar estas formulaciones. Actualmente existe una explosión bibliográfica referida a la descripción de nuevos adyuvantes, la cual está apoyada conceptualmente por la descripción de los receptores de reconocimiento de patógenos y de las vías de señalización que estos activan (Brown y col., 2011). La descripción de dichos receptores y de los mecanismos que activan ha brindado la posibilidad de direccionar la respuesta inmune mediante el uso de adyuvantes. Esto ha abierto la posibilidad de desarrollar vacunas a subunidades que previamente habían fracasado. En ese sentido, ya en un trabajo publicado por Hoft y col., se había descrito que se lograba la misma protección frente al desafío con *T. cruzi* cuando se inmunizaba con ADN desnudo del gen de la TS o alternativamente la proteína recombinante formulada con motivos CpG como adyuvante (Hoft y col., 2007). Este adyuvante es muy efectivo en ratones para estimular fuertes respuestas proinflamatorias protectoras contra organismos intracelulares. Por eso, en dicho trabajo ya se visualizaba que era posible lograr niveles de protección similares a los obtenidos mediante estrategias de inmunización génica sin el riesgo

que estos conllevan. Otro trabajo relevante en nuestro diseño experimental, fue el trabajo de Fontanella y col. (Fontanella y col., 2008), en el cual inmunizando con TS recombinante y el adyuvante de Freund, lograban una gran protección y prevenían la cardiopatía a los 60 días luego de la infección.

Por lo expuesto anteriormente, esta tesis se centró en la búsqueda de antígenos proteicos de *T. cruzi* y su evaluación al ser formulados con adyuvantes de última generación. Para dicho fin se ha utilizado un modelo murino de infección con *T. cruzi*, y estudiado no solo el tipo de respuesta inmune luego de la inmunización, sino también parámetros clínicos indicativos del nivel de lesión provocada por la infección en las distintas fases de la enfermedad producida.

## I.2. HIPÓTESIS

La inmunización con un prototipo inmunoestimulante compuesto por subunidades proteicas recombinantes de *Trypanosoma cruzi* y adyuvantes de última generación podría permitir generar protección frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*.

### I.3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Formular un prototipo inmunoestimulante compuesto por subunidades proteicas recombinantes del *Trypanosoma cruzi* y un adyuvantes de última generación, que permita generar protección frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*.

#### Objetivos específicos

- A) Seleccionar nuevos candidatos antigénicos para ser incorporados en una vacuna a subunidades en base a distintas hipótesis racionales. Se evaluará dichos candidatos en forma preliminar mediante la protección y respuesta inmune que brindan, al ser administrados formulados con el adyuvante incompleto de Freund, en un modelo de infección con el parásito *T. cruzi*.
- B) Evaluar adyuvantes de última generación con los antígenos candidatos seleccionados en el objetivo A utilizando el modelo de infección con *T. cruzi*.
- C) Evaluar el adyuvante seleccionado en el objetivo B ampliando el número de antígenos potencialmente candidatos.
- D) Seleccionando la formulación antígeno-adyuvante más protectora, realizar un estudio de la respuesta inmune celular, antes de la infección, a los 15 y 100 días post infección respectivamente así como evaluar daño cardíaco en dichos estadios.

**Capítulo II:**

**Selección de candidatos proteicos  
recombinantes de *Trypanosoma cruzi* para ser  
incorporados en una vacuna de subunidades**

## II.1 INTRODUCCIÓN

Desde mediados de la década de los 80's, la identificación y aislamiento de proteínas de *T. cruzi* blancos del sistema inmunológico constituyó una importante línea de trabajo. Esta se orientó principalmente destinada a obtener antígenos útiles para optimizar el diagnóstico serológico o que constituyan marcadores útiles para lograr un mejor seguimiento de los distintos estamentos clínicos que presenta la enfermedad (Marcipar y Lagier, 2012). Estos desarrollos han sido impulsados en gran medida con el surgimiento de las tecnologías del ADN recombinante, la que permitió caracterizar diversos antígenos de *T. cruzi* reconocidos por el sistema inmune en forma sistemática y con alto rendimiento. La técnica generalmente aplicada consistió en construir bibliotecas de expresión del parásito en fagos  $\lambda$ gt11 o  $\lambda$ ZAP y luego seleccionar las moléculas más antigénicas con sueros de pacientes infectados o animales inmunizados con *T. cruzi*. De esta manera se consiguió obtener secuencias codificantes para proteínas antigénicas y estudiar propiedades de las mismas tales como su localización celular, patrones de expresión, y organización genómica. Llamativamente, la mayoría de los antígenos hallados mediante la tecnología de fagos poseen dominios aminoacídicos repetidos en tándem (Da Silveira y col., 1990; Hoft y col., 1989). Dichas proteínas, contienen estas repeticiones en tándem (RT), las cuales constan de un elemento estructural básico (unidad repetitiva), con una longitud (período) que generalmente va desde 5 a 68 aminoácidos en *T. cruzi* (Frasch y col., 1991; Ibañez y col., 1988).

### II.1.1. Proteínas con repeticiones en tándem como inmunógenos

Dentro de los organismos eucariotas, las proteínas que contienen repeticiones son particularmente abundantes entre los parásitos protozoos como los agentes de malaria (*Plasmodium* spp), leishmaniasis (*Leishmania* spp) y tripanosomiasis (*T. cruzi* y *T. brucei*) (Frasch y col., 1994; Hoft y col., 1989; Ibañez col., 1988). Más allá de la diversidad en cuanto a tamaño, número y distribución de los elementos repetitivos, todos ellos comparten ciertas características

como las repeticiones en sí misma, la naturaleza de los aminoácidos presentes (aa polares y/o pequeños, y ausencia de aa hidrofóbicos) y su inmunodominancia. Además de favorecer una respuesta humoral, la presencia de epitopes repetitivos puede también influenciar la respuesta inmune celular. Se ha demostrado que la presentación de antígenos repetitivos lleva al *cross-linking* de los receptores T de membrana conduciendo a una activación de tres a cuatro órdenes mayor que el antígeno sin repetición (Röttschke y col., 1997). Debido a la alta reactividad en ensayos inmunológicos, las proteínas repetitivas de *T. cruzi* han sido muy ensayadas para el desarrollo de ensayos inmunoquímicos pero su desempeño como candidatos para el desarrollo de vacunas ha sido muy escasamente explorado.

En algunos casos, existe información que indica la inconveniencia de usar estos antígenos como inmunógenos vacunales. Esto es así por ejemplo para el antígeno B13. Este promueve una respuesta celular generando auto anticuerpos frente a la miosina cardíaca de la cadena pesada humana. Esto se debe a su homología de secuencia con el epitope (AAAGDK) de la proteína B13 (Cunha-Neto y col., 1996). Hemos reportado recientemente que concentraciones del auto anticuerpos anti-B13 fueron significativamente mayores en pacientes con cardiopatía chagásica en estado avanzado, lo que indicaría que este anticuerpo puede estar involucrado en la progresión de la enfermedad y podría usarse como marcador de pronóstico desfavorable de la enfermedad (Vicco y col., 2013). Estos antecedentes indican la inconveniencia de usar este antígeno en formulaciones vacunales, ya que su uso podría desencadenar la generación de auto anticuerpos con características afines a los desarrollados durante la enfermedad de Chagas.

Otro antígeno con RT que estaría contraindicado para conformar una vacuna es el denominado SAPA (Antígeno circulante de fase aguda). Esta proteína forma parte de la enzima Transialidasa y consta de un extremo amino catalítico que transfiere ácido siálico del hospedador al parásito y en su extremo carboxilo presenta la RT (SAPA), la cual es altamente inmunodominante. Se han reportado que la SAPA tiene capacidad de potenciar o inhibir la actividad catalítica y regular además la vida media de la enzima en sangre *in vivo* (Buscaglia y col., 1998, 1999). La propuesta más aceptada actualmente en relación a la presencia de esta región RT en la transialidasa es que actuaría como señuelo desviando la respuesta humoral hacia sí mismo, impidiendo que se generen anticuerpos que inhiban la actividad de la enzima (Frasch, 1994). Por lo tanto este antígeno no tendría un rol favorable en la inmunoprotección. Hay que destacar, sin embargo, que esta proteína fue evaluada en un modelo de infección con *T. cruzi*, obteniendo

resultados favorables, con una reducción de la parasitemia y mortalidad (Nasser y col., 1997), aunque no se ha reportados nuevos avances desde entonces.

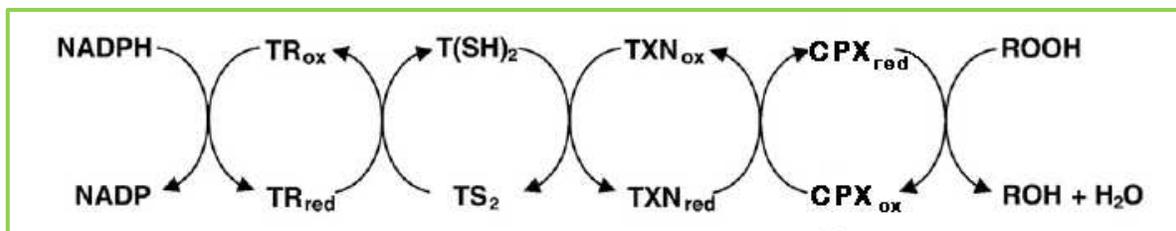
En oposición a estos dos antígenos mencionados, para los demás RT de *T. cruzi* no habría objeciones para evaluar su uso en vacunas ya que son altamente específicos del parásito y no presentan identidad con secuencias humanas (El-Sayed y col., 2005). Dos de los antígenos con RT mas inmunoreactivos en pacientes infectados son los denominados antígeno repetitivo flagelar (FRA) y antígeno repetitivo citoplasmático (CRA) (Lafaille y col., 1989). El antígeno flagelar está presente tanto en epimastigotes y tripomastigotes, pero el citoplasmático no se encuentra en tripomastigotes (Krieger y col., 1990; Lafaille y col., 1989). CRA está compuesto en su totalidad de al menos 23 copias de una repetición de 14 aa y el gen de FRA contiene al menos 14 copias de un motivo de 63 aa. Estudios de inmunización en ratones, con las proteínas FRA y CRA generaron una deficiente respuesta humoral (Pereira y col., 2003), aunque se obtuvo una parcial supervivencia frente a un desafío (Pereira y col., 2005), indicando su posible utilidad para integrar una vacuna a subunidades.

Por otro lado, mediante análisis bioinformático del genoma de *T. cruzi*, se detectaron proteínas con RT que no habían sido descritas previamente (Goto y col., 2008), mediante screening serológico de estas proteínas recombinantes. Entre ellas fueron especialmente reactivas hacia sueros de pacientes chagásicos las proteína Tc3 y Tc6 (Goto y col., 2008). Si bien no se conoce la función ni ubicación celular de estas proteínas, la ausencia de péptido señal o de secuencias transmembrana sugiere que tendrían una ubicación citoplasmática. Ambas poseen un dominio repetitivo en el extremo amino terminal que abarca más de la mitad de la proteína, pero no se ha asignado función alguna a la porción no repetitiva del extremo carboxilo terminal. El gen de Tc3 (Tc00.1047053511821.179) codifica para un polipéptido de 114 KDa, con 21 repeticiones de un motivo de 35 aminoácidos. El gen de Tc6 (Tc00.1047053508119.200) codifica una proteína de 103 KDa, con una región repetitiva compuesta por 14 repeticiones en tándem de una unidad de 39 aminoácidos. Existen otros antígenos con RT que han mostrado ser inmunodominantes tales como MAP o IL18 (Marcipar y Lagier, 2012), los cuales no presentarían objeciones para ser evaluados en función de conocimiento actual de los mismos. Como prueba de concepto para evaluar la capacidad protectora de las RT, en este trabajo hemos seleccionado FRA, Tc3 y Tc6.

### II.1.2. Enzimas claves de vías metabólicas de *T. cruzi* como inmunógenos

Otro grupo de proteínas no exploradas para ser incorporadas en vacunas son las enzimas redox que utiliza el parásito para su supervivencia intracelular. Estas enzimas podrían tener interés ya que presentan altos niveles de expresión en el parásito, por lo que podrían ser sujetas a una alta presentación antigénica en el contexto de los MHCI y MHCII. Una vez que ha ingresado dentro del mamífero, *T. cruzi* procede a invadir diferentes tipos de células incluyendo los macrófagos, células musculares (lisas y estriadas) y fibroblastos. Los macrófagos son una de las primeras defensas celulares de la respuesta inmune innata en los vertebrados que juega un papel central en el control y difusión del parásito (Kierszenbaum y col., 1974). Durante la invasión, los tripomastigotes deben sobrevivir y evadir el ambiente altamente oxidativo de los fagosomas de los macrófagos. Las principales especies oxidantes que participan en esta fase son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Durante la fagocitosis, la NADPH oxidasa presente en la membrana del macrófago se activa produciendo superóxido ( $O_2^-$ ), que luego da lugar al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) dentro del fagosoma. También la óxido nitroso sintetasa produce óxido nitroso (NO) que al difundirse y combinarse con el  $O_2^-$  da lugar al peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), siendo una potente molécula citotóxica efectora contra *T. cruzi* (Alvarez y col., 2004). La capacidad de los parásitos de adaptarse a este ambiente oxidante determina el éxito y la persistencia del proceso infeccioso.

La homeostasis redox en *T. cruzi* está eficientemente regulada ya que estos parásitos pueden resistir el ambiente oxidativo durante la infección del huésped y se adaptan a las diferentes condiciones ambientales y metabólicas. *T. cruzi* posee una defensa particular contra los hidroperóxidos, basada en Tioles de bajo peso molecular. Se han encontrado cinco peroxidases dependientes de Trypanotioles, diferenciándose en su localización subcelular y su especificidad de sustrato. Entre ellas se encuentra la Tryparredoxina peroxidasa citosólica (CPX) y la Tryparredoxina peroxidasa mitocondrial (MPX). Estas enzimas catalizan la reducción de  $H_2O_2$ , hidroperóxidos de cadena corta (ROOH) y de  $ONOO^-$ , usando la enzima Tryparredoxina (TXN) como sustrato reductor, en combinación con el Trypanotiol (T ( $SH_2$ )), Trypanothione reductasa (TR) y NADPH (Figura 3). De esta manera se mantiene el estado redox del parásito (Piacenza y col., 2009).



**Figura 3: Metabolismo de hidropéroxidos mediado por el Trypanothion en Trypanosomas.** La reducción de hidropéroxidos, péroxidos y pernitritos se logra a partir de las Trypanredoxin peroxidases que obtienen sus equivalentes reductores a través de una cascada compuesta por Trypanredoxina (TXN), Trypanothion ( $T(SH)_2$ ), Trypanothion reductasa (TR) y NADPH como fuente primaria de electrones. Los sufijos red y ox se refieren a los estados redox. ( Krauth-Siegel y col., 2008).

Las enzimas CPX así como su dador de electrones TXN juegan un rol particular en el proceso infeccioso de *T. cruzi*, ya que ambas participan de la vía metabólica que confiere resistencia frente a los péroxidos y peroxinitritos presentes en el fagosoma durante la infección de macrófagos. Se ha demostrado que parásitos que sobreexpresan CPX y MPX son capaces de infectar y multiplicarse de forma más eficiente en ambas células fagocíticas y no fagocíticas. A parte de esto, se ha comprobado que los niveles de CPX y MPX aumentan durante la diferenciación de los epimastigotes no infectivos a los tripomastigotes infectivos, constituyendo esto una preadaptación en el ciclo de vida del parásito, y además dichos niveles se encuentran aumentados en cepas virulentas en comparación con las cepas atenuadas (Piñeyro y col., 2008).

La sobreexpresión de estas enzimas durante la infección, las convierten en candidatos vacunales a evaluar, ya que los macrófagos cuando fagociten al parásito, podrían presentar epitopes de dichas enzimas bajo el contexto de las moléculas de clase I y clase II.

### II.1.3. Desarrollo de este capítulo

Nos hemos propuesto evaluar la capacidad inmunoprotectora de tres proteínas con repeticiones en tándem como prueba de concepto. En primer lugar seleccionamos a las proteínas Tc3 y Tc6, frente a un desafío con *T. cruzi*. Dichos antígenos no han sido evaluados previamente como candidatos vacunal para dicho parásito. Por otro lado, se decidió evaluar a la proteína FRA por ser una proteína altamente reactiva en pruebas de diagnóstico en sueros de pacientes infectados con *T. cruzi*. Si bien esta proteína ya fue evaluada en modelos de infección con *T. cruzi* con resultados pocos favorables (Pereira y col., 2005), decidimos evaluar una construcción de la FRA fusionado a la proteína tierrodoxina para realzar la respuesta humoral (no obtenida en el

trabajo mencionado) y lograr una potenciación de la respuesta inmune que genere protección. Ya en un trabajo previo de nuestro grupo, se había descrito la capacidad que tiene la tierrodoxina de incrementar la inmunogenicidad antigénica de FRA (Valiente-Gabioud y col., 2011). Esta propiedad inmunogénica de la tierrodoxina ha sido también descrita por otros autores (Bertini y col., 1999; Rubio y col., 2009).

Evaluamos también las enzimas CPX y TXN, debido a que estas presentan una gran expresión durante la infección y son importantes para la supervivencia y propagación del parásito, siendo un blanco fácil para el sistema inmune de huésped. Las mismas nunca habían sido evaluadas como posibles inmunógenos en una vacuna para la enfermedad de Chagas.

La evaluación consistió en inmunizar dichas proteínas, emulsionadas con el adyuvante de Freund a ratones de la cepa Balb/c y desafiarlos con parásitos de *T. cruzi*. Como criterio de selección de antígenos se evaluó la cantidad, calidad y tipo de respuesta humoral evaluando los títulos de IgG total, su avidéz y las subclases desarrolladas. Como criterio definitorio, evaluamos la capacidad de los antígenos de controlar la parasitemia y aumentar la supervivencia.

Decidimos incorporar también a la enzima Transialidasa a nuestro grupo de antígenos a evaluar. Esta enzima fue empleada en numerosos trabajos los cuales utilizaron diferentes modelos de infección con *T. cruzi*, logrando alto porcentaje de protección en todos ellos (Fontanella y col., 2008; Hoft y col., 2007; Vázquez-Chagoyán y col., 2011). La incorporación de este antígeno nos permitió contar con una formulación antigénica que ya había sido probada con éxito por otros autores y por eso constituyó un parámetro de comparación importante en relación a los antígenos que antes no habían sido ensayados.

## II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.2.1. Antígenos recombinantes utilizados

#### II.2.1.1. Proteínas con repeticiones en tándem

Se utilizaron las proteínas FRA, Tc3 y Tc6, previamente clonadas en nuestro laboratorio. Las secuencias de ambas proteínas fueron incorporadas en el vector plasmídico pET32a (Novagene): 5900 pb, selección por resistencia a Ampicilina (Amp), promotor T7lac, produce proteínas fusionadas a 6 Histidinas y a la proteína tiorredoxina (TRX) de 20,4 KDa. La secuencia de Histidinas permite su purificación en columna de NTA-Ni<sup>2+</sup>, mientras que la fusión a la tiorredoxina aumenta la solubilidad de la proteína recombinante y evita que la secuencia de Histidinas quede incluido en el core proteico como consecuencia del plegamiento

#### II.2.1.1.1. Expresión de las proteínas recombinantes FRA, Tc3 y Tc6

Células de *E. coli* BL21 DE3 conteniendo las correspondientes construcciones plasmídicas fueron crecidas toda la noche en agitación (180 r.p.m.) a 37°C en 5 ml de medio líquido LB suplementado con 0,1 mg/ml de ampicilina. Una alícuota de este cultivo fue diluido 100 veces en el mismo medio en iguales condiciones hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> = 0,5-0,6. Se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de IPTG en una concentración final de 0,1 mM y se continuó incubando a 37°C por 3 horas. Luego se recogieron las células centrifugando a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos y se resuspendieron en la solución BL1 (Tabla 3). La suspensión se sonicó (Vibra-Cell, Sonic y Material Inc) mediante pulsos de 50% de amplitud, durante 90 segundos 600W. Este procedimiento fue repetido hasta la clarificación de la suspensión, luego se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 15 minutos y se recolectó el sobrenadante.

### II.2.1.1.2. Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)

El sistema consiste en una columna de IDA-Sepharosa con Ni<sup>2+</sup> inmovilizado (Novagen). Se utilizó una columna de 1 ml la cual se lavó con 10 volúmenes de la solución BL1 y luego se sembró con el sobrenadante obtenido con la proteína recombinante, recirculándolo 2 veces. Para la elución se hicieron pasar por la columna 6 volúmenes de solución BL2 y se recogieron 4 fracciones de 1 ml cada una. Se repitió esta operación con las soluciones BL3, BL4 y BL5, en ese orden. Las distintas fracciones fueron analizadas por PAGE-SDS al 15%, seguida de tinción con azul de *Coomasie* (Tabla 4). En dicho gel se evidenciaron las fracciones que contuvieron mayor concentración de proteína recombinante y se analizó la pureza de cada una.

**Tabla 3: Soluciones utilizadas en la purificación por IMAC**

Reactivo/Solución	BL1	BL2	BL3	BL4	BL5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> PH=8 50 mM	X	X	X	X	X
NaCl 300 mM	X	X	X	X	X
Imidazol (mM)	20	50	100	250	500

### II.2.1.1.3. Análisis de proteínas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

Las electroforesis fueron llevadas a cabo en geles con un 15% de acrilamida-bisacrilamida (29:1) en condiciones desnaturalizantes. Las muestras fueron tratadas con 1 volumen de buffer de muestra 2X conteniendo 2-Mercaptoetanol 5% para PAGE-SDS e incubadas en baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Luego se sembraron 10 µl aproximadamente de cada una en el gel y se aplicó una diferencia de potencial de 200 V. Para estimar los pesos moleculares, se utilizaron los marcadores de peso molecular (Thermo Scientific) según se detalla en la Tabla 5. La fijación y tinción de geles se efectuó por inmersión en solución de azul de *Coomasie* G-250. Para la decoloración de las secciones del gel que no correspondían a proteínas teñidas, se sumergió el

mismo durante una hora en Solución decolorante I y luego, durante otra hora más en Solución decolorante II (Tabla 4).

Tabla 4: Soluciones empleadas para la elaboración de los geles SDS-PAGE

Solución	Reactivo	Concentración
<b>Gel de apilamiento / Gel de concentración</b>	Tris-HCl pH 6,8 / pH 8,8	130 mM / 375 mM
	SDS	0,05 % (p/v) / 0,1 % (p/v)
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	4,8 % (p/v) / 15 % (p/v)
	TEMED	0,1 % (v/v) / 10 % (v/v)
	Persulfato de amonio	0,05 % (p/v) / 0,06 % (v/v)
	Glicerol	- / 10 % (v/v)
<b>Buffer de muestra 2X</b>	Tris-HCl pH 6,8	125 mM
	Glicerol	20 % (v/v)
	SDS	4 % (p/v)
	2-mercaptoetanol	5 % (v/v)
	Azul de bromofenol	0,2 % (p/v)
<b>Buffer de corrida</b>	Tris-HCl pH 8,3	25 mM
	Glicina	192 mM
	SDS	0,1 % (p/v)
<b>Solución colorante</b>	Azul de Coomassie G- 250	0,5 % (p/v)
	Metanol	45 % (v/v)
	Ácido acético	10 % (v/v)
<b>Solución decolorante I / Solución decolorante II</b>	Etanol	50 % (v/v) / 10 % (v/v)
	Ácido Acético	10 % (v/v) / 7 % (v/v)

#### II.2.1.1.4. Cuantificación de proteínas totales

Se tomaron las fracciones proteicas de mayor cantidad y sin contenido de impurezas, y a partir de ella se midió el contenido proteico mediante el kit comercial Qubit (Invitrogen), según especificaciones del fabricante.

**Tabla 5: Marcadores de peso molecular comerciales**

Proteína patrón	PM (KDa)
<b>beta-galactosidase</b>	116
<b>bovine serum albumin</b>	66,2
<b>Ovalbumin</b>	45,0
<b>lactate dehydrogenase</b>	35,0
<b>REase Bsp98I</b>	25,0
<b>beta-lactoglobulinbeta</b>	18,4
<b>Lisozima</b>	14,4

#### II.2.1.1.5. Corte enzimático de las proteínas FRA, Tc3 y Tc6

Las proteínas FRA, Tc3 y Tc6 fueron tratadas para eliminar la proteína de fusión TRX. Para realizar esto, primero se realizó un cambio de buffer mediante cuatro ciclos de diálisis. En cada ciclo las proteínas fueron llevadas a un volumen final de 5ml con buffer de enteroquinasa (Tabla 6) y colocadas en la parte superior de tubos Vivaspin 6 10,000 MWCO (GE Helathcare), se realizaron centrifugaciones de 20 minutos a 15000 r.p.m, hasta llevar a volumen deseado. Una vez realizada la diálisis las proteínas fueron incubadas con la enzima enteroquinasa (BioLabs) durante toda la noche a temperatura ambiente.

**Tabla 6: Reactivos utilizados para el corte enzimático con la enteroquinasa**

Solución	Reactivo	Concentración
<b>Enteroquinasa</b>		2 U/ml
	Tris-HCl PH=8	20 mM
<b>Buffer de enteroquinasa</b>	NaCl	50 mM
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM

Para verificar la eficiencia del corte se tomó una muestra de las proteínas luego del corte con la enteroquinasa y se corrió en un PAGE-SDS, seguido de la tinción con azul de *Coomassie*. Se purificó las proteínas FRA, Tc3 y Tc6 libre de la TRX a través del sistema IMAC y se evaluaron las fracciones en un PAGE-SDS.

### **II.2.1.2. Enzimas pertenecientes a vías metabólicas de *T. cruzi***

Se utilizó las proteínas CPX y TXN, las mismas fueron gentilmente provistas por los Dres. Diego Arias y Sergio Guerrero del laboratorio de Bioquímica Microbiana, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.

### **II.2.1.3. Enzima Transialidasa de *T. cruzi***

En este trabajo, se utilizó la enzima Transialidasa, gentilmente cedida por el Department for Molecular Biomedical Research, VIB Ghent University, Bélgica.

Esta enzima se le inactivó la actividad catalítica transialidasa mediante mutagénesis, reemplazando el aspartato por un glutamato en la posición 98 (Fontanella. y col., 2008). Además fue clonada en sistema de levaduras *Pichia pastoris*, que agrega glicosilaciones asemejando aún más a la enzima nativa. Finalmente se fue eliminada la región inmunodominante carboxilo terminal SAPA. Este clon fue el mismo que se evaluó en un modelo de infección con *T. cruzi* por Fontanella y col. (Fontanella y col., 2008). La forma de tipo activa de la TS se utilizó para realizar las pruebas ELISA debido a que la TS activa refleja mejor la proteína nativa del parásito.

## **II.2.2. Cepa de ratones**

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL, para las evaluaciones relacionados con la inmunización y el desafío con *T. cruzi*.

Para la activación y pasaje de los parásitos en ratones, se utilizaron ratones destetes de la cepa Cf1, adquiridos en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Los animales fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum*, con un período de luz oscuridad de 12 horas. Los mismos fueron tratados según la Guía para el Uso y Cuidado de los Animales del Laboratorio del National Research Council, aprobados para su uso por el comité de ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

### **II.2.3. Cepa de parásitos de *T. cruzi***

Se utilizó la cepa de parásito de *T. cruzi* Tulahuen clon 2, perteneciente a la UDT VI, que es considerada virulenta.

#### **II.2.3.1. Mantenimiento de la cepa de *T. cruzi* en el estadio trypomastigote**

Para el mantenimiento de los parásitos en el estadio infectivo trypomastigote, ratones destetes Cf1 fueron infectados con una carga de 300000 parásitos, luego de 7 días, los ratones presentaban una parasitemia elevada. Los mismos fueron anestesiados con ketamina/Xilacina en una dosis 100 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente y se procedió a realizarles punción cardiaca para el sangrado, utilizando EDTA 0,15 % (p/v) como anticoagulante. Una vez finalizada la extracción, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. De la sangre obtenida, se cuantifico la carga parasitaria mediante cámara de Neubauer y se llevó a una concentración de  $3 \times 10^6$  parásitos/ml con PBS para seguir con el siguiente pasaje. Este procedimiento se realizó 3 veces, desde la activación del parásito conservado en N<sub>2</sub> líquido hasta el desafío, para asegurar la correcta activación de los mismos.

#### **II.2.3.2. Obtención de parásitos para el desafío con *T. cruzi***

Siguiendo el procedimiento de obtención de sangre infectada con parásitos, descrito anteriormente en la sección II.2.3.1., se procedió a la purificación de parásitos con el fin de ser utilizados para el desafío de los grupos inmunizados. La sangre obtenida fue sometida a tres ciclos de centrifugación a 1500 r.p.m durante 15 minutos, recuperando el sobrenadante y agregando 500 µl de PBS estéril, con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de parásitos posible. Las fracciones fueron recolectadas y luego de tres lavados con PBS, centrifugando 15 minutos a 3000 r.p.m, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los parásitos en solución fisiológica estéril.

### II.2.3.3. Lisado de parásitos de *T. cruzi*

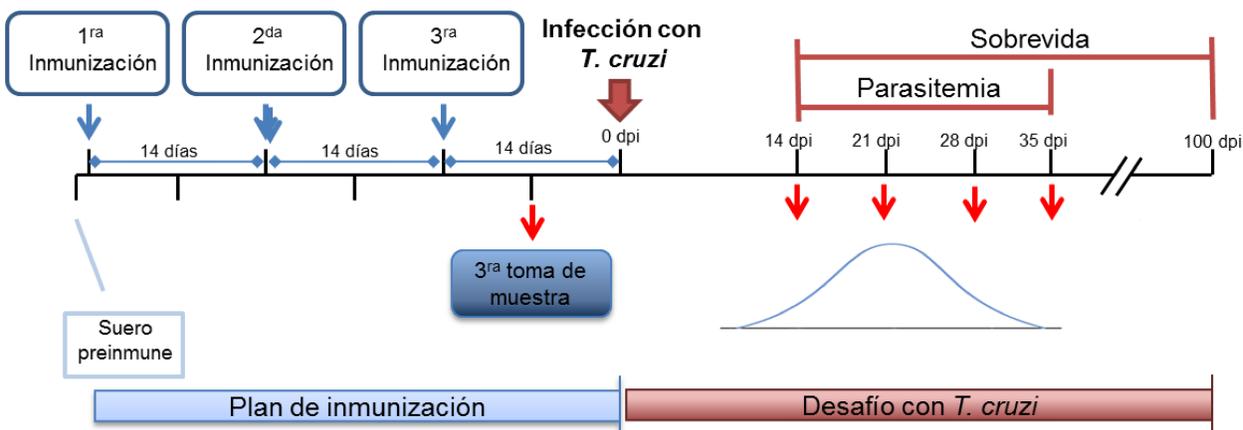
Para la obtención del homogenato de parásitos, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen clon 2) se cultivaron en infusión de hígado triptosa suplementado con 10% de suero fetal bovino. Homogeneizados totales de epimastigotes se obtuvieron mediante la resuspensión de las células lavadas en cinco volúmenes de 1 mM de  $N\alpha$ -p-tosil-L-lisina-clorometilcetona y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en agua destilada, luego se realizaron 4 ciclos de congelación y descongelación y, finalmente, la suspensión se sonicó (Vibra-Cell, Sonic y Material Inc) mediante pulsos de 50% de amplitud, durante 2 minutos a 600W.

### II.2.4. Plan de inoculación

Se utilizaron grupos de entre 5 y 9 ratones Balb/c para evaluar los inmunógenos FRA (con y sin fusión a la proteína TRX), Tc3, Tc6, CPX, TXN, TS, un grupo control con el adyuvante y un grupo control PBS sin adyuvante. Cada grupo fue inmunizado vía intraperitoneal con 10  $\mu$ g del respectivo antígeno proteico disuelto en PBS y se utilizó un volumen igual de adyuvante completo de Freund (AF) en un volumen final de 100  $\mu$ l. El grupo PBS consistió en un inóculo de 100  $\mu$ l de PBS. Cada grupo recibió tres dosis, con un intervalo de 14 días entre cada dosis. Se tomaron muestras de sangre antes de la primera inoculación (suero preinmune) y a 7 días posteriores a cada inmunización (Figura 4). Las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de la cola de los ratones mediante capilares heparinizados, los mismos se centrifugaron 15 minutos a 3000 r.p.m. Se recuperó el suero y se conservó en freezer a -20° C.

### II.2.5. Desafío de los grupos inmunizados con *T. cruzi*

Transcurridos 14 días posteriores a la última inoculación, todos los ratones fueron desafiados con 1000 *T. cruzi* de la cepa Tulahuen clon 2. La parasitemia se realizó a los 14, 21, 28, 35 días post infección (dpi) y la supervivencia se evaluó diariamente. A los 100 dpi se sacrificaron los animales que sobrevivieron al desafío, los mismos fueron anestesiados previamente con ketamina/Xilacina en una dosis 100mg/kg y 10 mg/kg respectivamente. El sangrado se realizó mediante punción cardiaca e inmediatamente, después de la extracción, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical (Figura 4).



**Figura 4: Plan de inmunización seguido del desafío con *T. cruzi*.** 14 días luego de la última inmunización, los grupos de ratones fueron infectados con 1000 parásitos de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen clon 2. Se evaluó la parasitemia en los días 14, 21, 28 y 35 post infección y la supervivencia fue evaluada diariamente durante 100 días.

## II.2.6. Evaluación de anticuerpos específicos

Los ensayos de ELISA con las proteínas recombinantes se realizaron en microplacas de poliestireno (Greiner), las que fueron sensibilizadas con 500 ng/pocillo de cada proteína recombinante, según el ensayo en particular, disueltas en buffer carbonato pH 9,6. Para los grupo AF (control con adyuvante) y PBS (control sin adyuvante), se sensibilizaron con homogenato de *T. cruzi*. Las microplacas se incubaron toda la noche a 4°C y luego se bloquearon con PBS-leche descremada 5% durante 1h a 37°C. A continuación se incubaron con diluciones 1/1000 de los sueros de ratones en PBS-leche descremada 1% y luego se incubaron con el anticuerpo conjugado a peroxidasa (IgGtotal, IgG1, IgG2a, según el tipo de ELISA) (Tabla 7), diluido en PBS-leche descremada 1% como indica la tabla. Finalmente, se reveló la reacción con el sustrato de la enzima peroxidasa en presencia del cromógeno tetrametilbencidina (TMB, Invitrogen) y se frenó la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C por 60 minutos. Entre cada una de las incubaciones se realizaron 3 lavados de 60 segundos con PBS-Tween 0,05%. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en lector de ELISA (Molecular Devices Emax).

Tabla 7: Soluciones y anticuerpos secundarios utilizados para los ensayos de ELISA

Anticuerpo secundario	Fabricante	Dilución
Anti-IgG total de ratón	DakoCyomation,	1/15000
Anti IgG 1	DakoCyomation,	1/10000
Anti IgG 2a	DakoCyomation,	1/10000
Solución	Reactivo	Concentración
PBS 1X pH 7,4	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 M
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
PBS-Tween 20	PBS 1X	
	Tween 20	0,05 % (v/v)
Buffer Carbonato pH 9,6	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	35 mM

### II.2.7. Medición de la parasitemia

Para la medición de la parasitemia, se extrajo 5 µl de sangre de la punta de la cola de los ratones y se contaron 50 campos distribuidos uniformemente a lo largo del cubreobjetos, a 400 x en un microscopio óptico (Leica).

### II.2.8. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar diferencias entre todos los grupos evaluados, seguido la prueba de Mann-Whitney U-test para las comparaciones entre dos grupos. La diferencias significativas se indica con (\*) cuando  $P < 0.05$ , (\*\*) cuando  $P < 0,01$  y (\*\*\*) cuando  $P < 0,001$  en comparación entre los grupos señalados.

Para las evaluaciones de la supervivencia, se utilizó la prueba de Mantel-Cox en las curvas de supervivencia.

Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad 4.0 (GraphPad).

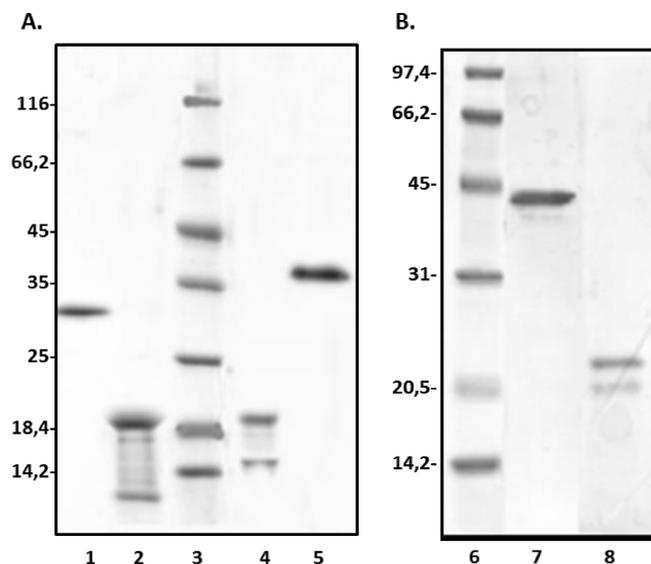
## II.3. RESULTADOS

### II.3.1. Obtención de las proteínas recombinantes para emplearlas como inmunógenos

#### II.3.1.1. Expresión y corte enzimático de las proteínas recombinantes FRA, Tc3 y Tc6

Se realizó un cultivo de 100 ml para cada clon de FRA, B13, Tc3 y Tc6, a 37°C en agitación durante 3 h y luego se procedió a la inducción de expresión de las proteínas recombinantes por 3 h. Luego se sonico hasta clarificar. Finalmente se purificó mediante el sistema IMAC. Se corrieron en un SDS-PAGE, las fracciones de elución a 50, 100, 250 y 500 mM de imidazol. Para el clon FRA, la fracción con más proteína pura, fue la de 100 mM, mientras que para Tc3 fue de 500 mM y para Tc6 fue de 250 mM.

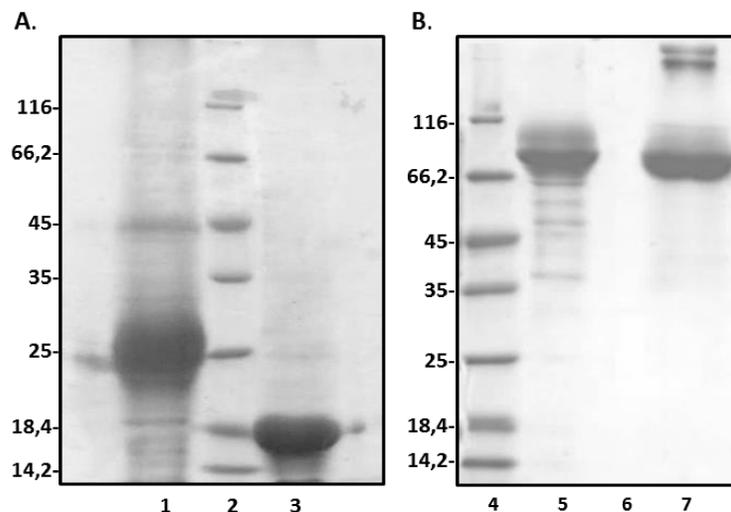
Debido a que las proteínas se expresan fusionadas a la proteína tiorredoxina, las mismas fueron digeridas con la proteasa enteroquinasa, generando un corte específico entre la tiorredoxina y las proteínas clonadas. Para esto se partió de las proteínas FRA, Tc3 y Tc6 previamente purificadas disueltas en buffer fosfato con imidazol, se les realizó un cambio de buffer y se cortó con la enzima enteroquinasa. Luego se procedió a purificar las proteínas FRA, B13, Tc3 y Tc6 sin la TRX mediante columnas con Níquel inmovilizado (Figura 5). Debido a que la cola de histidina esta fusionada a la TRX, cuando se pasa la muestra por la columna, la TRX queda retenida, mientras que la proteína cortada pasa de largo. Luego se cuantificaron mediante fluorometría con el kit comercial Qubit (Invitrogen).



**Figura 5: Evaluación de la eficiencia del corte enzimático:** Proteínas recombinantes resueltas en SDS PAGE. **A:** 1. Proteína Tc6-TRX. 2. Proteínas Tc6 de 8 KDa y TRX 20,4 KDa. 3. Marcador de peso molecular. 4. Proteínas Tc3 de 15 KDa y TRX de 20,4 KDa. 5. Proteína Tc3-TRX. **B.** 6. Marcador de peso molecular. 7. FRA-TRX. 8. FRA de 23 KDa y TRX de 20,4.

### II.3.1.2. Análisis de la calidad de las proteínas CPX, TXN y TS

Las proteínas CPX, TXN y TS, fueron evaluadas en un SDS-PAGE con el fin de verificar su peso molecular, estabilidad y pureza. La fijación y tinción del gel se efectuó por inmersión en solución de azul de *Coomassie* G-250 (Figura 6). Las proteínas estaban altamente concentradas con alto grado de pureza. La proteína TS se la corrió en condiciones reductoras y se observaron un bandeo, aunque cuando se corrió en condiciones no reductoras, este bandeo desapareció. Esto puede deberse a la alta concentración de proteína que, luego del calentamiento en las condiciones reductoras, pudo haberse degradado parcialmente (Figura 6B).



**Figura 6: Evaluación de la estabilidad y pureza:** Proteínas en **A.** TXN y CPX, y en **B.** TS resueltas en SDS-PAGE: **1.** CPX de 25 KDa. **2 y 4.** Marcador de peso molecular. **3.** TXN de 15 KDa. **5.** TS de 80 KDa corrida con  $\beta$ -mercapto. **7.** TS corrida sin  $\beta$ -mercapto.

### II.3.2. Puesta a punto del modelo de infección con *T. cruzi*

La cepa de ratones Balb/c, fue elegida porque es la utilizada como modelo murino sensible a la infección con *T. cruzi* (Fontanella et al. y col., 2008a; Gupta y col., 2013; V. R. A. Pereira et al. y col., 2005). Además dicha cepa presenta susceptibilidad al desarrollo de cardiopatía por la infección con *T. cruzi* (Pellegrini y col., 2011). Por otro lado la cepa de parásitos Tulahuen clon 2 está clasificada como Unidad Discreta de Tipificación (UDT) TcVI, que se caracteriza por ser altamente infectiva en ratones y humanos (Jelicks y col., 2011).

Una vez seleccionada la cepa de ratones y de parásitos, se prosiguió a optimizar la carga parasitaria necesaria para generar una infección que establecimos como: la cantidad de parásitos inoculados que generen un 50 % de mortandad a los 21 días de infección. Para conocer cuál es la carga parasitaria en nuestro modelo de infección, evaluamos con tres dosis de 100, 1000 y 5000 parásitos de *T. cruzi* en grupos de 4 ratones Balb/c.

Luego de la inoculación, se realizó el seguimiento de todos los ratones. Se evaluó la supervivencia y parasitemia con el fin de observar qué concentración de parásitos se ajustaba mejor al plan de desafío con *T. cruzi* de 60 días (Tabla 8).

Se eligió utilizar la cantidad de parásitos que fue utilizada en el grupo 2 (1000 parásitos) para el desafío de los ratones Balb/c inmunizados.

**Tabla 8: Evaluación de la carga parasitaria en el modelo murino de infección con *T. cruzi*.**

Grupo	Parasitemia	Supervivencia	Observaciones
1 100 <i>T. cruzi</i>	<b>Leve</b> <10 parásitos /50 campos	<b>100%</b>	Luego de 20 dpi los animales recuperaron gradualmente su peso y su comportamiento
2 1000 <i>T. cruzi</i>	<b>Moderada- alta</b> 30 a 70 parásitos/50 campos	<b>50%</b>	Se observó pérdida de peso, reducida movilidad y signos de estrés. Luego de 30 dpi los animales sobrevivientes recuperaron su aspecto normal, peso y conducta
3 5000 <i>T. cruzi</i>	<b>Alta</b> >70 parásitos/50 campos	<b>0%</b>	Elevada pérdida de peso y movilidad. Todos los ratones murieron entre los 14 y 18 dpi

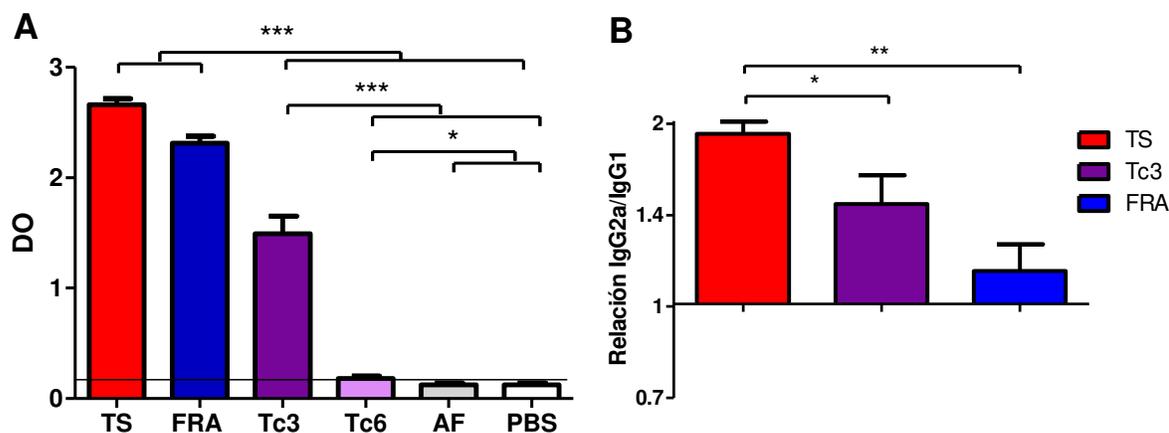
### II.3.3. Evaluación de la respuesta humoral luego de la inmunización

De los 9 grupos inmunizados (FRA, FRA-TRX, Tc3, Tc6, CPX, TXN, TS, AF, PBS), todos los grupos, a excepción del grupo PBS, presentaron inflamación localizada en la zona de inoculación luego de una semana de cada administración debido a la utilización del adyuvante de Freund en el inculo.

Se tomaron muestras de sangre en el día previo a la primera inmunización (suero preinmune) y luego de la tercera inmunización (Figura 4). Se evaluó la respuesta humoral generada por los inmunógenos mediante la medida de la DO obtenida al realizar la técnica de ELISA indirecto.

#### II.3.3.1. Proteínas con repeticiones en tándem

Los tres grupos de ratones que fueron inmunizados con proteínas con RT y el grupo de la TS presentaron anticuerpos IgG totales específicos (Figura 7A). Si bien el grupo Tc6 presentó diferencias con los grupos controles (AF, PBS), los niveles de anticuerpo fueron muy inferiores comparados con los demás inmunógenos ( $P < 0,001$ , TS, FRA y Tc3 vs Tc6).



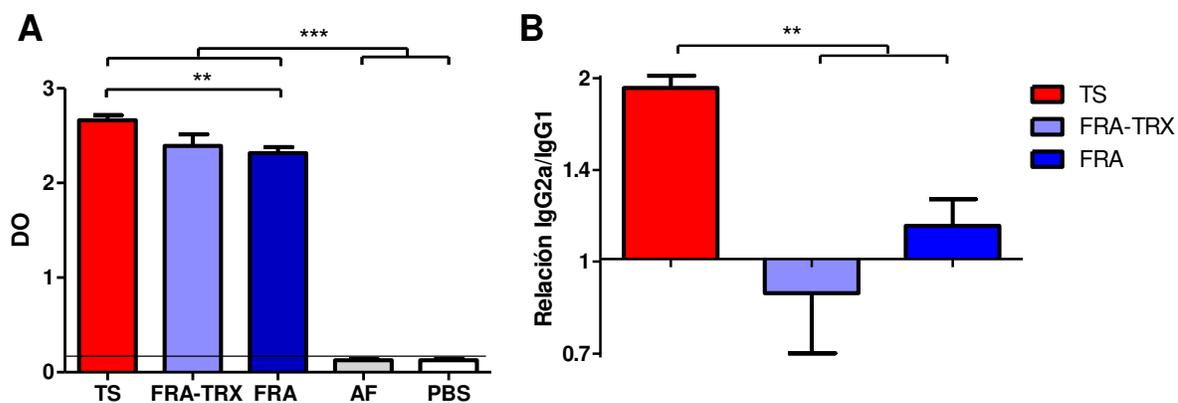
**Figura 7: Evaluación de la respuesta humoral de los inmunógenos con RT.** Cada suero fue enfrentado a la misma proteína con que se realizó la inmunización. **A.** Medición de la IgG total de los grupos inmunizados, la línea horizontal indica la línea de corte del suero preinmune; **B.** Relación de DO de las subclases de anticuerpos IgG2a/IgG1. \* ( $P < 0,01$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ).

Evaluamos también la relación de las subclases de anticuerpos IgG2a/IgG1 (Figura 7B) con el fin de evaluar qué tipo de respuesta inmune se generó de acuerdo a las proporciones de dichas inmunoglobulinas. Para los grupos TS, Tc3, FRA, la relación obtenida fue mayor a 1, lo que indicaría un tipo de respuesta inmune proinflamatoria, siendo el grupo TS el que más relación presentó con respecto a los otros dos grupos ( $P < 0,05$ , TS vs Tc3;  $P < 0,01$ , TS vs FRA).

### II.3.3.2. Evaluación de la TRX como inmunopotenciador

Evaluamos el efecto que tiene la proteína TRX al estar fusionado al inmunógeno, sobre el tipo de respuesta inmune (Figura 8). Cuando evaluamos las DO de los anticuerpos IgG totales de los inmunógenos FRA y FRA-TRX, observamos un leve incremento de FRA-TRX con respecto a FRA (Figura 8A). Si bien esta diferencia no es significativa, cuando comparamos las DO de dichos

inmunógenos con la de la TS, se observan en el caso de TS vs FRA diferencias significativas ( $P < 0,01$ ), lo que no es el caso de TS vs FRA-TRX ( $P = 0,07$ ).



**Figura 8: Evaluación de la respuesta humoral generada por FRA y FRA-TRX.** Para el caso de los grupos FRA y FRA-TRX, los sueros fueron enfrentados a la proteína sin TRX. **A.** DO de la IgG total de los grupos inmunizados. **B.** Relación de DO de las subclases de anticuerpos IgG2a/IgG1. \* ( $P < 0,01$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ).

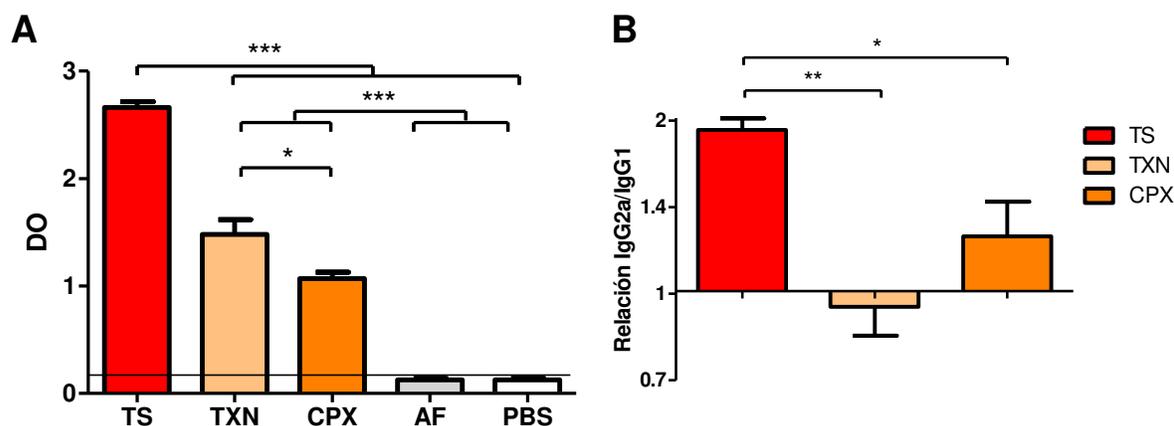
Para el caso de la relación las subespecies de anticuerpos IgG2a vs IgG1 (Figura 8b), ambos grupos (FRA-TRX y FRA) no presentan diferencias entre sí ( $P = 0,25$ ), y sí presentan diferencias con respecto a TS ( $P < 0,01$ ). Si bien la presencia de la TRX no genera una diferencia significativa entre los inmunógenos, FRA presenta una relación mayor a 1, siendo un tipo de respuesta proinflamatorio, mientras que FRA-TRX presenta una relación inferior a 1, siendo un perfil de respuesta inmune de tipo regulador.

### II.3.3.3. Enzimas proveniente de vías metabólicas

Los dos grupos de ratones que fueron inmunizados con proteínas pertenecientes a vías metabólicas de *T. cruzi* presentaron anticuerpos IgG totales específicos (Figura 9A). Sin embargo, los grupos TXN y CPX fueron menos inmunogénicos que el grupo TS ( $P < 0,001$ , TS vs TXN y CPX). El grupo TXN presentó diferencias significativas con respecto al grupo CPX ( $P < 0,05$ , TXN vs CPX).

Para el caso de la relación las subclases de anticuerpos IgG2a vs IgG1 (Figura 9B), ambos grupos (CPX y TXN) no presentaron diferencias entre sí ( $P = 0,08$ ) pero si presentan diferencias con respecto al grupo TS ( $P < 0,05$ ). Cabe destacar que CPX presenta una relación mayor a 1, siendo un

tipo de respuesta proinflamatorio, mientras que TXN, que presentó mayores DO de anticuerpos totales, presenta una relación inferior a 1, siendo un perfil de respuesta inmune de tipo regulador.



**Figura 9: Evaluación de la respuesta humoral de los inmunógenos proveniente de enzimas metabólicas.** Cada suero fue enfrentado a la misma proteína con que se realizó la inmunización. **A.** Medición de la IgG total de los grupos inmunizados. **B.** Relación de DO de las subclases de anticuerpos IgG2a/IgG. \* (P< 0,01), \*\* (P< 0,01), \*\*\* (P<0,001).

### II.3.4. Desafío con *T. cruzi*

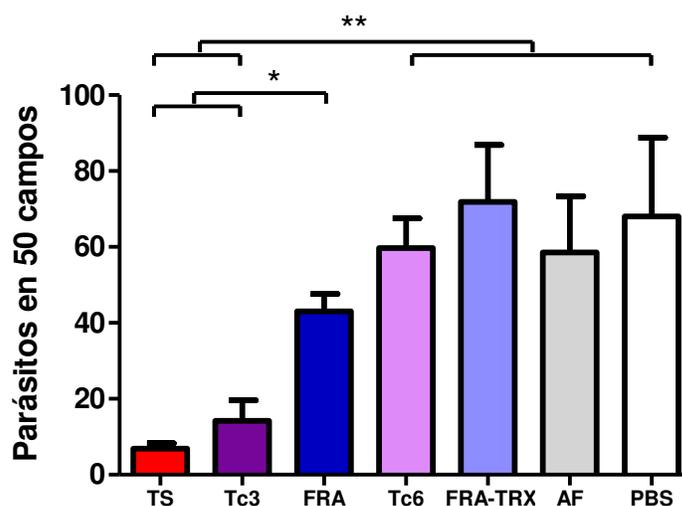
Transcurridos 14 días luego de la última inmunización todos los ratones fueron desafiados con 1000 parásitos de *T. cruzi*. Si en otros trabajos la parasitemia se midió a los 14, 21, 28 y 35 dpi, debido a la gran mortalidad obtenida entre los 14 y 21 días en nuestro modelo, se decidió comparar las parasitemias en un solo punto debido a que en ese momento los ratones de todos los grupos permanecen vivos. La mortalidad se evaluó diariamente.

#### II.3.4.1. Parasitemia de los ratones inmunizados a los 14 dpi

La parasitemia se estudió por observación directa a 400x en microscopio óptico en condiciones estándar. A los 14 dpi, se analizó 5 µl de sangre obtenida a partir de la cola de todos los ratones infectados. Los resultados se expresaron como la media del total de parásitos en 50 campos de microscopio para cada grupo de ratones.

##### II.3.4.1.1. Proteínas con repeticiones en tándem

La parasitemia obtenida a los 14 dpi fue tan elevada como los grupos control para todos los grupos a excepción del grupo TS y TC3 (Figura 10), que fueron inferiores y presentaron diferencias significativas con respecto al resto de los grupos infectados ( $P < 0,05$ , TS y Tc3 vs control y otro grupos).



**Figura 10: Parasitemia a los 14 dpi de los grupos inmunizados con proteínas con RT.** La parasitemia de cada grupo se calculó mediante el conteo de 50 campos observados en el MO. \* ( $P < 0,01$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ).

#### II.3.4.1.2. Enzimas proveniente de vías metabólicas

Los ratones de los diferentes grupos fueron susceptibles a la infección con *T. cruzi* (Figura 11). A excepción del grupo TS, los demás grupos presentaron niveles similares de parasitemia no diferenciándose con el grupo control ( $P > 0,05$ , TXN y CPX vs control). El grupo TS presentó las menores parasitemias, siendo su diferencia significativa en relación a todos los grupos evaluados ( $P < 0,01$ , TS vs control y otros grupos)

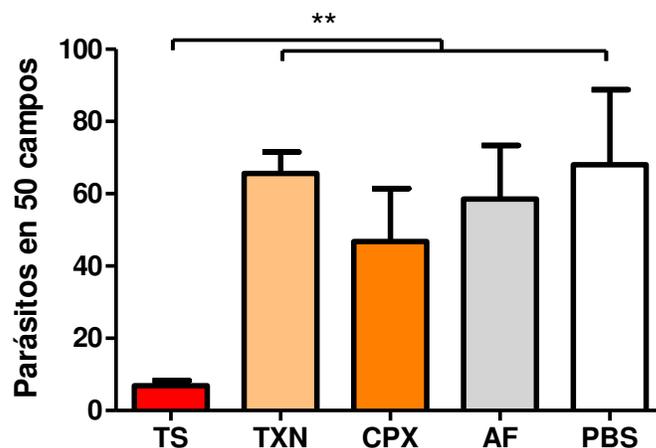


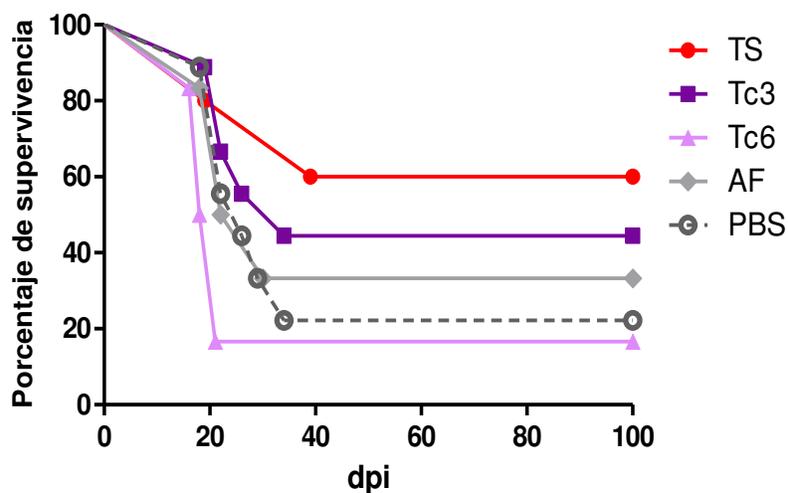
Figura 11: Parasitemia a los 14 dpi de los grupos inmunizados con proteínas proveniente de enzimas metabólicas de *T. cruzi*. La parasitemia de cada grupo se calculó mediante el conteo de 50 campos observados en el MO. \*\* ( $P < 0,01$ ).

### II.3.4.2 Evaluación de la supervivencia de los grupos inmunizados

Los distintos grupos presentaron diferentes rangos de supervivencia en función del tiempo, sin embargo ninguno presentó diferencias significativas con el grupo control ( $P > 0,05$ ; para todos los grupos vs control; Mantel-Cox).

#### II.3.4.2.1. Proteínas con repeticiones en tándem

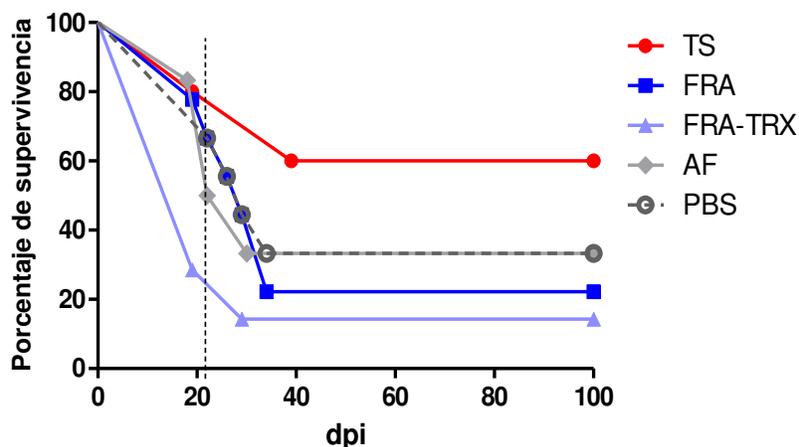
Los grupos inmunizados con las proteínas con repeticiones en tándem no presentaron diferencias significativas en la supervivencia comparado con los grupos controles AF y PBS (Figura 12). El grupo inmunizado con TS presentó una supervivencia del 60%. El grupo Tc3 generó una supervivencia del 40% siendo el grupo con más protección de las RT. El grupo Tc6 presentó una supervivencia del 16%.



**Figura 12:** Evaluación de la supervivencia de los grupos inmunizados con proteínas con RT. Porcentajes de supervivencia de los grupos inmunizados en función del tiempo en días, luego de ser desafiados con 1000 parásitos de la cepa Tulahuen clon 2 de *T. cruzi*

#### II.3.4.2.2. Evaluación de la TRX como inmunopotenciador en el inmunógeno FRA.

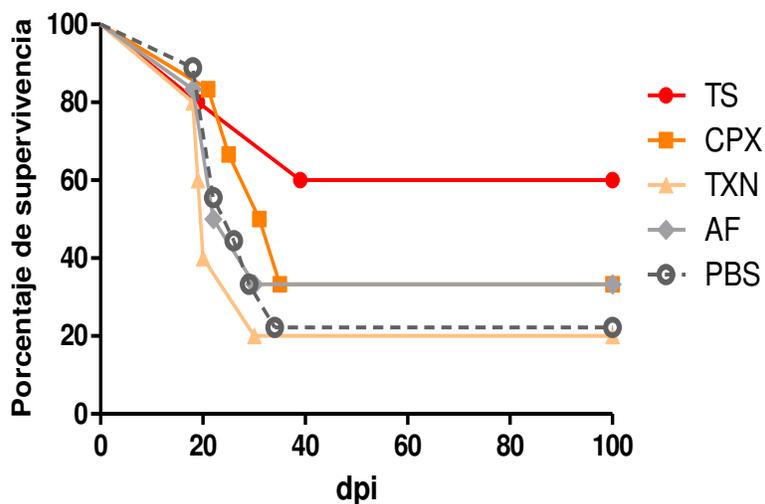
Los grupos provenientes de la proteína FRA fueron susceptibles al desafío con *T. cruzi* (Figura 13). La TRX no generó diferencias en la supervivencia a los 100 días post infección, aunque la mortalidad de los ratones del grupo FRA-TRX comenzó antes que en el grupo FRA, generando diferencias significativas en la supervivencia a los 21 días post infección (línea de punto horizontal;  $P < 0,05$ , FRA vs FRA-TRX).



**Figura 13: Evaluación de la supervivencia de los grupos inmunizados con proteínas FRA y FRA-TRX** Porcentajes de supervivencia de los grupos inmunizados en función del tiempo en días, luego de ser desafiados con 1000 parásitos de la cepa Tulahuen clon 2 de *T. cruzi*

### II.3.4.2.3. Enzimas proveniente de vías metabólicas

Los grupos provenientes de vías metabólicas no generaron protección frente al desafío con *T. cruzi*, siendo esta del 34 % para el grupo CPX y del 20% para el grupo TXN. Se compara con el 60 % de protección que presentó el grupo TS (Figura 14).



**Figura 14: Evaluación de la supervivencia de los grupos inmunizados con proteínas proveniente de vías metabólicas** Porcentajes de supervivencia de los grupos inmunizados en función del tiempo en días, luego de ser desafiados con 1000 parásitos de la cepa Tulahuen clon 2 de *T. cruzi*

## II.4. DISCUSIÓN

Si bien hace más de 100 años que la enfermedad fue descrita por el Dr. Chagas, recién en los últimos 20 años se llevaron a cabo varios estudios sobre vacunas contra la enfermedad de Chagas. La demora en la investigación se debió principalmente a la hipótesis de que la enfermedad de Chagas era una progresión autoinmune, desencadenada por la infección por *T. cruzi*. Incluso, el mismo razonamiento hizo que el tratamiento a las personas crónicamente infectadas con las drogas fuera puesto en duda. Además, por mucho tiempo se justificó no invertir en la investigación dirigida a una vacuna que podría llevar a un riesgo de la inducción de la autoinmunidad o exacerbación de la inflamación (Machado y col., 2012). Gran cantidad de autoanticuerpos se han observado en pacientes infectados con *T. cruzi*, incluyendo anticuerpos a antígenos específicos del miocardio tales como la miosina cardíaca. Varios mecanismos se han propuesto para explicar la autoinmunidad observada. Así, la presencia de epitopes compartidos entre algunas de las proteínas del parásito y del miocardio ha llevado a postular el fenómeno de mimetismo molecular en esta infección. En particular, se ha reportado que la proteína B13 de *T. cruzi* comparte secuencias con la miosina cardíaca y que células y anticuerpos de pacientes reconocen a este antígeno y a la miosina en forma cruzada (Cunha-Neto y col., 1996; Marin-Neto y col., 2007). Esta reactividad es un requisito en la descripción de una enfermedad autoinmune, pero no es suficiente para que una enfermedad sea catalogada como tal. Para considerarla autoinmune dichos autoanticuerpos y o células T autoinmunes tienen que generar una patología clínica al ser transferidas experimentalmente, en ausencia del parásito (Machado. y col., 2012). Actualmente la hipótesis de que la enfermedad es causada por la autoinmunidad sigue vigente pero se asume hoy en día que dicha hipótesis no es excluyente (Cunha-Neto y col., 2006). En ese sentido, la carga parasitaria, la eficiencia de la respuesta inmune y la regulación de la misma en el control de los parásitos, son considerados factores predisponentes para el desarrollo de la enfermedad. La carga parasitaria, a su vez, depende en gran medida de la eficiencia de la respuesta inmune del huésped en eliminar o limitar la replicación del parásito. Cuando el control

inmunológico es ineficiente, la carga parasitaria, la inflamación a largo plazo y, por lo tanto, el daño potencial en los tejidos aumentan. Una hipótesis propuesta para explicar la progresión de la lesión en sintomática (chagásica) o asintomática, se basa en la capacidad que tiene el sistema inmune de regular la inflamación y la propagación de los parásitos en el tejido. Luego de que *T. cruzi* lisa una célula infectada e invade a las adyacentes, la intensidad de la respuesta va a depender de cada paciente, eliminando el parásito eficientemente o generando una reacción exacerbada inflamatoria, con destrucción del tejido e infiltrado celular. De este modo la prevención de la infección, o en su defecto, el control de la carga parasitaria por debajo de un nivel de umbral en el estadio agudo, sería eficaz en la disminuir el daño tisular impuesto por múltiples mecanismos patogénicos y conduciría a la disminución de la gravedad de la enfermedad. Estas observaciones proporcionan un impulso para el desarrollo de vacunas contra *T. cruzi* basadas en mecanismos efectores capaces de controlar la carga parasitaria, muchos de los cuales han sido descritos (Padilla y col., 2009). Por lo tanto, una vacuna sería una herramienta práctica para la prevención, control y transmisión de la infección por este parásito. En relación al riesgo de la generación de autoinmunidad que podría implicar el uso de una vacuna contra *T. cruzi*, cabe destacar que dicho riesgo puede ser evitado al plantear un enfoque vacunal con subunidades de antígenos definidos para los cuales no se ha descrito que generen respuestas autoinmunes. Finalmente, cabe destacar la utilidad que tendría el desarrollo de una vacuna contra *T. cruzi* aun en un escenario en que la misma no cumpla con desempeño óptimo. Según un estudio teórico reciente, la aplicación de una potencial vacuna contra *T. cruzi* en América Latina tendría un impacto positivo, aun si tuviera una eficiencia del 25 % ya que su costo-beneficio seguiría siendo favorable, incluso en lugares donde el riesgo de infección es relativamente bajo (1%) (Lee y col., 2010). Estos hallazgos apoyan los esfuerzos para desarrollar una vacuna contra *T. cruzi*.

Como se mencionó anteriormente, existen proteínas de *T. cruzi*, que podrían estar implicadas en la producción de autoanticuerpos. Debido a esto, la utilización de todo el organismo para el diseño de una vacuna contra este parásito, como es el caso de las vacunas vivas o muertas, no sería la mejor estrategia a implementar. La selección racional de antígenos definidos tiene la ventaja de no generar una respuesta adversa hacia el huésped. Además si dichos antígenos, formulados con adyuvantes, son capaces de ser reconocidos por el sistema inmune y desarrollar una respuesta protectora, estaríamos frente a importantes candidatos para el diseño de una vacuna contra *T. cruzi*. En ese contexto, nuestro propósito en este capítulo fue evaluar que antígeno/s tendrían la capacidad de disminuir la parasitemia e inhibir la mortalidad en los ratones

durante la infección con *T. cruzi*. Se ensayaron diferentes antígenos proteicos de *T. cruzi*, formulados con adyuvante de Freund en un modelo murino de infección con *T. cruzi*. Uno de los desafíos importantes de esta etapa, fue la optimización del modelo a utilizar para el tamizado y selección de nuevos antígenos.

En este trabajo se ensayaron dos estrategias racionales de selección de antígenos. La primera consistió en estudiar si proteínas con repeticiones repetitivas podían generar protección en este modelo de infección, evaluando además si la proteína TRX fusionada al inmunógeno repetitivo FRA podría potenciar dicha protección. Esta estrategia fue inspirada en el éxito alcanzado en el desarrollo de una vacuna contra *Plasmodium ssp*, en la cual se utilizó un antígeno repetitivo del parásito fusionándolo a un antígeno inmunoestimulante, del virus de la hepatitis B para aumentar su inmunogenicidad (Ballou, 2009). La segunda estrategia consistió en evaluar proteínas presentes en vías metabólicas, las cuales aumentan su expresión cuando el parásito es fagocitado por los macrófagos con el objetivo de evadir los mecanismos oxidativos de los fagosomas. En función de la importancia de dichas enzimas para la supervivencia del parásito y de conocer su sobreexpresión durante la infección intracelular, hemos postulado que su presentación antigénica por las células presentadoras de antígenos debería estar aumentada durante la infección. Por lo tanto, el reconocimiento de las mismas, por parte del sistema inmune, podría tener un rol favorable en el contexto de una respuesta protectora. Este enfoque ya había sido propuesto para el desarrollo de una vacuna contra la Fasciola Hepática (Maggioli y col., 2011), en la cual se utilizaron como inmunógeno enzimas claves para la supervivencia del helminto. Los inmunógenos aquí seleccionados pertenecen a vías metabólicas esenciales, siendo comúnmente investigadas, como posibles blanco para la generación de inhibidores que permitan el control del parásito.

Finalizado el plan de inmunización, los resultados de la evaluación humoral mostraron que todos los grupos, a excepción del grupo Tc6, respondieron con una elevada concentración de anticuerpos IgG totales (Figura 7, 8 y 9), de igual modo los anticuerpos detectados en Tc6 fueron significativamente mayores que los del grupo control, confirmando que el esquema de inoculación de tres dosis, alcanzó la respuesta humoral deseada. La proteína Tc6 es una proteína de 8 KDal, la cual resultó ser muy poco inmunogénica. Dicho inmunógeno, se evaluó también fusionado a la TRX en un modelo de inmunización igual al presentado en este capítulo (datos no mostrados). En ese caso el análisis de la respuesta humoral de los sueros cuando se los enfrentó a la proteína entera Tc6-TRX en la técnica de ELISA, generó densidades ópticas comparables con los grupos TS,

FRA, Tc3 presentados anteriormente ( $DO = 2,3 \pm 0,18$ ), aunque cuando los sueros se enfrentaron a la proteína sola sin la TRX en la prueba de ELISA, los resultados de DO fueron igualmente inferiores como en el caso presentado de la inmunización sin TRX, siendo la proteína de fusión, la principal responsable de la gran respuesta inmune generada. Esto estaría mostrando, que con el modelo empleado, la proteína Tc6 es muy poco inmunogénica, no siendo realizada su inmunogenicidad cuando se la evaluó fusionada a TRX.

Las subclases de anticuerpos permiten inferir el perfil de respuesta que generan los inmunógenos (Finkelman y col., 1990). En efecto, mientras que una relación  $IgG2a > IgG1$  está asociada a un perfil inflamatorio tipo Th1, beneficioso para la protección contra *T. cruzi*, la relación  $IgG1 > IgG2a$  indica un perfil regulador no protector en la fase aguda de la infección (Frank y col., 2003; Pereira y col., 2005). Las evaluaciones de la relación de las subclases de anticuerpos  $IgG2a/IgG1$  arrojó que los grupos TS, FRA, Tc3 y CPX, presentaron relaciones superiores a 1. Interesantemente la evaluación de la respuesta humoral para el grupo FRA con y sin TRX, mostró un aumento de la DO para el grupo con TRX, cómo fue descrito anteriormente (Valiente-Gabioud y col., 2011), sin embargo, en la relación de subclases de anticuerpos se observaron diferencias, siendo mayoritaria el anticuerpo  $IgG2a$  cuando se inmunizó solo con la FRA e  $IgG1$  cuando se lo inmunizó con FRA-TRX.

En la selección de nuevos antígenos candidatos a inmunógenos, hemos considerado que los parámetros clínicos, la parasitemia y la supervivencia constituyen los indicadores más confiables de protección cuando se puede disponer de un modelo de infección adecuado. Estos parámetros toman en cuenta la integración de toda la respuesta inmune para finalmente terminar indicando protección o falta de protección. Adicionalmente, la medición de parámetros inmunológicos como anticuerpos, respuesta celular o ensayos funcionales *in vitro*, son una información importante que nos permiten inferir los posibles mecanismos por los cuales se produce la protección. Este razonamiento se basa en que en muchos casos, respuestas inmunológicas muy favorables directamente no se traducen en protección tal como ha sido descrito reiteradamente para vacunas contra el HIV (Esparza y col., 2013). El desafío con *T. cruzi*, hacia todos los grupos evaluados fue realizado a los catorce días luego de la última inmunización. La medición de parasitemia se realizó de los 14, 21, 28 y 35 días. A los 35 dpi, todos los ratones que sobrevivieron al desafío disminuyeron su parasitemia a niveles no detectable mediante la medición con el microscopio óptico (datos no mostrados).

Como ya se mencionó, debido a la gran mortalidad obtenida entre los 14 y 21 días, decidimos hacer una comparación de la parasitemia solo a los 14 dpi. Esta comparación permitió mayor confiabilidad en los resultados estadísticos. Los grupos TS y Tc3 presentaron una reducción significativa de la parasitemia comparada con los demás grupos y el grupo control ( $P < 0,05$ , TS y Tc3 vs FRA;  $P < 0,01$ , TS y Tc3 vs otros grupos y PBS).

A los resultados obtenidos para el análisis de la supervivencia que presentaron los diferentes grupos de ratones, los analizamos en base a los obtenidos con el inmunógeno TS, que es uno de los que mayor protección ha generado en la literatura (revisado por Vázquez-Chagoyán y col., 2011). El uso de la TS empleada en los ensayos por Fontanella y col. (Fontanella y col., 2008), con la misma cepa de ratones y de parásitos y formulado también con adyuvante de Freund, generó en nuestra experiencia una supervivencia del 60 %, la cual resultó menos que la del 100 % de protección lograda en dicho artículo. Cabe destacar que el modelo de infección es altamente variable, requiriendo reajustes de la dosis permanentemente. Una diferencia importante que hemos encontrado con dicho trabajo es que nuestra carga parasitaria para un DL50 a los 21 días fue de 1000 parásitos mientras que para dicho trabajo fue de 100 parásitos.

Sobre el análisis de las proteínas repetitivas en la supervivencia frente al desafío, se destaca a la Tc3 como posible candidato ya que permitió un 40 % de supervivencia comparada con los 60 % de la TS. Cabe destacar que tanto el grupo TS como Tc3 fueron los que menor parasitemia desarrollaron a los 14 días post infección y los que mayor relación IgG2a/IgG1 generaron, siendo esto un indicativo de protección por parte de la respuesta humoral. El inmunógeno Tc3 fue evaluado nuevamente frente a otro desafío, obteniéndose nuevamente 40 % de supervivencia (datos no mostrados).

De la evaluación en la supervivencia al utilizar TRX como potenciador de la respuesta inmune para el inmunógeno FRA, en líneas generales se observó que esta proteína de fusión no mejora los bajos porcentajes de protección brindados por la FRA no fusionada. A pesar de esta tendencia que se evidencia en la supervivencia, al final del experimento, otros datos indican que la proteína de fusión sería perjudicial para la inmunoprotección. Efectivamente, pudo observarse una marcada disminución al comienzo de la curva de la supervivencia, siendo significativa a los 21 dpi (Figura 13). Esto también se reflejó en la parasitemia (Figura 10) y la conducta de los animales infectados del grupo FRA-TRX (datos no mostrados), notándolos más estresados y enfermo a los

14 días en comparación a los demás grupos. Notablemente, el grupo FRA-TRX generó más anticuerpos que el grupo FRA, pero su relación IgG2a/IgG1 fue menor que dicho grupo, lo que se traduce en que esa mayor cantidad de anticuerpos son principalmente de IgG1, siendo estos anticuerpos no protectivos para *T. cruzi* (Machado y col., 2012). En trabajos anteriores, la FRA ya se había evaluado en un modelo de infección utilizando a la cepa de ratón Balb/c en la cual se obtuvo una baja protección (Pereira y col., 2005). Este modelo presentaba también una pobre respuesta humoral luego de la inmunización con esta proteína (Pereira y col., 2003). Sin embargo, en nuestro laboratorio habíamos determinado el poder inductor de la respuesta humoral de la TRX en FRA (Valiente-Gabioud y col., 2011). Evaluamos entonces en esta instancia si esa mayor respuesta permite más protección. Como los resultados lo muestran, esta estrategia no generó protección alguna. Esta falta de protección coincidió con un aumento de anticuerpos que son compatibles con un perfil de respuesta inmunológica regulatorio, no deseable frente a infecciones agudas por el parásito. Además se observó que el grupo PBS presentó mayor supervivencia que el grupo FRA-TRX a los 21 dpi (Figura 13;  $P < 0,05$ ), sugiriendo que la inmunización con FRA-TRX desfavoreció la respuesta natural que generan los ratones frente al desafío

En el análisis de la supervivencia que presentaron los grupos TXN y CPX, se observa una gran susceptibilidad al desafío con *T. cruzi* (Figura 14). Dichos inmunógenos se evaluaron nuevamente, obteniendo una mortalidad aun mayor a la del grupo control, aunque no significativa, siendo del 100 % para el caso de la TXN (datos no mostrados). Una explicación de este resultado podría ser que la respuesta generada por dichos inmunógenos estaría facilitando la evasión del parásito del sistema inmune del huésped. En ese sentido se ha descrito un mecanismo de evasión según el cual la producción de anticuerpos sin capacidad para reconocer a los tripomastigotes, (porque fueron generados por enzimas citoplasmáticas), ocasionó una dilución de los anticuerpos protectivos, aumentando la inefectividad del parásito (Brenner y col, 1997). Más allá de esta posible explicación, el hecho es que nuestra hipótesis de trabajo, según la cual una mayor presentación antigénica en el marco CMH I y CMH II permitiría un incremento de la respuesta celular, no pudo ser comprobada. En particular, se ha descrito para la cepa Tulahuen clon 2 una marcada sobreexpresión en el sistema trypanothione como las proteínas CPX y TXN (Pereira y col, 2006), sin embargo no hemos observado protección alguna, al menos en el modelo empleado.

## II.5. CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ Se implementó un modelo murino de infección agudo con *T. cruzi*, utilizando la cepa de ratones Balb/c y la cepa de parásitos Tulahuen clon 2, con una DL50 de 1000 parásitos.
- ✓ Las proteínas Tc3, FRA, CPX, TXN y TS, resultaron ser inmunogénicas frente al plan de inmunización planteado. La proteína Tc6 presentó baja estimulación de anticuerpos específicos comparado con los demás inmunógenos.
- ✓ Los grupos Tc3, FRA, CPX y TS generaron una relación de anticuerpos IgG2a/IgG1 mayor a 1, siendo este un indicador de una respuesta de tipo Th1. Los grupos Tc3 y TS fueron los que mayor relación generaron.
- ✓ La proteína de fusión TRX, permitió una leve mejora en la producción de anticuerpos en el inmunógeno FRA. Sin embargo la presencia de esta proteína generó un impacto negativo en la curva de supervivencia cuando se comparó sin TRX.
- ✓ Los inmunógenos Tc3 y TS fueron los que mayor protección presentaron frente al desafío con *T. cruzi*, permitiendo obtener una menor parasitemia y mayor supervivencia en los ratones inoculados comparados con los demás inmunógenos y los grupos control.

**Capítulo III:**

**Evaluación de formulaciones de antígenos  
protectivos con adyuvantes de última  
generación potencialmente aplicables a  
humanos**

### III.1. INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata confiere un mecanismo inmediato de reconocimiento microbiano a través de receptores de reconocimiento de patrones, principalmente los TLR y los NLR, los cuales han dado forma a nuestra comprensión actual de la regulación innata y su conexión con la inmunidad adaptativa. Dichos receptores censan, en el ambiente citoplasmático y extracelular, la presencia de PAMP (de sus siglas en inglés patrones moleculares asociados a patógenos) y/o DAMPS (de sus siglas en inglés patrones moleculares asociados a peligro) Las células fagocíticas, particularmente las células dendríticas (DC), representan las principales células presentadoras de antígeno profesionales (APC) y son responsables de la transición entre la respuesta innata y la adaptativa. A partir del reconocimiento de la infección, los RRP no sólo inician los mecanismos celulares de defensa, sino también activan diferencialmente a las APCs. Dichas células presentadoras, modulan específicamente el tipo de respuesta inmune adaptativa según la naturaleza del patógeno. Uno de los objetivos de la vacunología moderna es aprovechar la capacidad de los TLRs y NLRs para modular la inmunidad adaptativa para garantizar la eliminación óptima del patógeno. Estos receptores y sus ligandos han sido el foco de la investigación de adyuvantes con el objetivo de generar combinaciones de vacunas modernas adaptadas a patógenos específicos (Maisonneuve y col., 2014). Como ya se describió, las formulaciones preparadas con antígenos recombinantes son menos inmunogénicas que las vacunas de organismos vivos atenuadas u organismos muertos. Esto se debe a que las vacunas desarrolladas con el organismo completo, cuentan con toda la maquinaria inmunoestimulante propia del patógeno. En cambio, las vacunas a subunidades recombinantes requieren la incorporación de inmunomoduladores o adyuvantes que permiten lograr múltiples propósitos, como: mejorar la inmunogenicidad, disminuir la dosis del inmunógeno, acelerar la respuesta inmune, reducir la necesidad de inmunizaciones de refuerzo, aumentar la duración de la protección, y mejorar la eficiencia en las poblaciones que responden débilmente a la inmunización como recién nacidos, personas inmunodeprimidas y ancianos (Mohan y col., 2013). En los últimos años, con el objetivo

de disponer de más adyuvantes permitidos, además de las sales de aluminio y otros pocos aprobados, se están evaluando numerosos adyuvantes que se han usado para formular distintas (Tabla 9).

**Tabla 9. Adyuvantes Clínicamente probado en vacunas humanas.** (Maisonneuve y col., 2014).

Nombre	Componentes	Receptor/mecanismo	Enfermedad objetivo
Alum	Sales de Aluminio (hidroxido de aluminio, fosfato de aluminio)	NLRP3, Acido Urico	Difteria, tetanos, pneumococcus, VHA, VHB, antrax, VPH
MF59, AS03	Emulsión de aceite en agua, esqualeno mas surfactantes	MyD88, ASC ATP	Influenza
Virosomes	Liposomas más influenza HA		HAV
AS04	Alum, MPL	TLR4	VHB, VPH
CpG	ODN DNA solo o formulado con Alum	TLR9	VBH, malaria, influenza, antrax, cáncer
AS01	Liposomas, MPL, QS21	TLR4	Malaria
AS02	Emulsión de aceite en agua, MPL, QS21	TLR4	Malaria, TB, cáncer
AS15	Liposomas, MPL, CpG, QS21	TLR4 and TLR9	Cáncer
Iscomatrix	Saponinas, colesterol	desconocido	HCV, influenza, VPH, cáncer
Montanide	Emulsión de aceite en agua mas surfactantes		Malaria, HIV, cáncer, influenza

### III.1.1. Adyuvantes tradicionales

Las sales de aluminio, principalmente fosfato e hidróxidos de aluminio, han sido los adyuvantes para humanos más ampliamente utilizados. Tienen la capacidad de ralentizar la velocidad de liberación del antígeno y también aumentan la duración de la interacción del antígeno con el sistema inmunológico, mejorando así la respuesta inmune contra el antígeno. Se cree que el efecto de las sales de aluminio está relacionado con la producción de ácido úrico, el

cual actúa como un DAMP, las cuales son moléculas liberadas por la células frente al estrés o células dañadas y son reconocidas por el sistema inmune innato (Kool y col., 2008). Además se ha descrito que activan ciertos componente del inflamasoma mediante la activación de la proteína NALP3 (Eisenbarth y col., 2008). El principal inconveniente de este adyuvante es su incapacidad de producir un tipo de respuesta celular tipo Th1 necesario para combatir los microorganismos intracelulares.

Durante varias décadas, los adyuvantes de Freund se han considerado los adyuvantes más eficaces disponibles para la producción de anticuerpos en animales de prueba. El adyuvante completo de Freund contiene micobacterias muertas por calor, que activan los TLR4 de las APC, siendo el agente principal responsable de estimular la respuesta humoral y celular. Como las sales de aluminio, los adyuvantes de Freund tienen la capacidad de liberar lentamente al antígeno en el sitio de inoculación en un periodo extendido. Se le han atribuido efectos secundarios indeseables como dolor, sufrimiento y aumento de la morbilidad en animales de laboratorio inoculados. Debido a su alta reactogenicidad está prohibido su uso en humanos.

### **III.1.2. Adyuvante de nueva generación**

Tal como se describe en la tabla 9, existen varios nuevos adyuvantes ya autorizados para su uso en humanos. Cada uno de estos cuenta con diferentes mecanismos de acción en función de su composición. La diversidad existente de estos nuevos adyuvantes, junto a los que se encuentran en evaluación, permite disponer de un menú de opciones útil para el diseño de vacunas en el que puede optarse en función del tipo de respuesta que se pretende lograr.

El MF59, desarrollado por NOVARTIS es una emulsión de aceite en agua que contiene escualeno y cantidades variables de muramil tripéptido fosfatidil etanolamina (MTP-PE), y activa los receptores TLR4. El MF59 activa macrófagos en el sitio de inoculación. Se ha demostrado que presenta mayor título de anticuerpo y respuesta celular comparado con el hidróxido de aluminio (Seubert y col., 2008).

El Montanide, desarrollado por Bioven, es una familia de adyuvantes a base de aceite que se han utilizado en las vacunas experimentales en ratones, ratas, perros, gatos y humanos. Las emulsiones de Montanide ISA51 están compuestas de aceite mineral y manidamonoliato como

emulsionantes. Se ha mostrado la capacidad para inducir un título alto de anticuerpos y respuestas de CTL en una variedad de especies animales.

Los liposomas son esferas sintéticas compuestas de capas de lípidos que pueden encapsular antígenos y actuar como vehículo de entrega de vacunas. La potencia de los liposomas depende del número de capas de lípidos, carga eléctrica, la composición y método de preparación. Estos mejoran tanto la inmunidad humoral como celular. Los liposomas ayudan a extender la vida media de los antígenos en la sangre, lo que garantiza una mayor exposición del antígeno a las células presentadoras de antígenos después de la vacunación. Los virosomas son esferas lipídicas que incluyen glicoproteínas de virus. Su mecanismo de acción está relacionado con la directa interacción del virosoma con las células presentadoras de antígenos. Actualmente dos vacunas comerciales para uso humano, desarrolladas por Crucell y Solvay, utilizan virosomas.

Adyuvantes tenso activos: El Quil-A es un componente de la saponina, un detergente derivado de la planta Quillaja saponaria molina, que presenta actividad adyuvante. Las saponinas son glicósidos tenso activos que contienen un núcleo hidrófobo de la estructura triterpenoide con cadenas de carbohidratos ligadas al núcleo. Las saponinas inducen un fuerte efecto adyuvante tanto para antígenos T-dependientes como T-independientes. La utilidad de Quil-A como adyuvante se ha visto obstaculizada por su aparente toxicidad. Sin embargo, se ha podido determinar que, de las fracciones de este extracto, la QS21 es aún más inmunoestimulantes que la Quil-A y presenta baja toxicidad. EL QS21 se ha evaluado sólo o en combinación con otros componentes para el desarrollo de adyuvantes. Actualmente forma parte de los adyuvantes ya habilitados o en fase adelantadas de evaluación para su uso en humanos de: ISCOM, AS01, el AS02 y el AS15

Los ISCOM (complejos inmunoestimulantes), desarrollados por ISCONOVA, actualmente bajo licencia de CSL Behring), fue el término utilizado para describir partículas de 40nm en forma de jaula que se forman espontáneamente cuando el colesterol se mezcla con QS21. El término ISCOM refiere a estas partículas cuando se sintetizan con el antígeno, lo que limita potencialmente la utilidad de este adyuvante debido a su diseño. En cambio el término ISCOMATRIX refiere a estas partículas libres del antígeno, las cuales se incorporan en el momento de la inmunización. Los ISCOM/ISCOMATRIX estimulan una fuerte respuesta para todas las clases de inmunoglobulinas (Sun y col., 2009). Estos también estimulan la respuesta inmune celular, medida por respuestas de células T y la hipersensibilidad de tipo retardado. Una característica distintiva de ISCOM es que,

además de promover una respuesta humoral y una respuesta celular CD4+ proinflamatoria/regulatoria balanceada, induce respuestas CD8<sup>+</sup> citotóxicas específicas en distintas especies animales (Mohan y col., 2013).

Los oligodesoxinucleótidos CpG (ODN), son secuencias cortas de ADN que contienen dinucleótidos CpG no metilado (motivos CpG), los cuales estimulan fuertemente al sistema inmune. Tales secuencias que se encuentran naturalmente en el ADN bacteriano y activan directamente las células B a través de TLR9, también activan indirectamente otras células tales como monocitos y macrófagos para producir una variedad de citoquinas proinflamatorias. Los ODN CpG son capaces de potenciar células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas y la respuesta de anticuerpos a una amplia variedad de antígenos en modelos de ratones. Actualmente la empresa Coley está probando una vacuna en fase I para malaria. También forma parte de adyuvantes combinados, como el AS15.

Se han desarrollado oligonucleótidos inmunoestimulantes de células humanas ex vivo que no contienen regiones CpG (Elias y col., 2003). Los oligodeoxinucleotidos PyNTTTTGT (ODNs) activan, *in vivo*, la proliferación y secreción de inmunoglobulinas en las células B, y la expresión de moléculas coestimuladoras en las células dendríticas de primates y en ratas (Elias y col., 2005). Estos ODNs activan a los linfocitos B y las células presentadoras de antígenos de forma similar a los CpG ODNs (Rodríguez y col., 2006). Se observó un incremento muy significativo, en comparación con el antígeno solo, en la producción de anticuerpos inducida por la vacunación con el antígeno de superficie de hepatitis B recombinante formulado con el IMT504, en un modelo de ratas, aumentando el título de la subclase IgG2b, además del aumento de la producción de INF- $\gamma$  (Elias y col., 2005). Finalmente el perfil de toxicidad de IMT504 sugiere un amplio intervalo de dosis, pudiendo ser utilizado con seguridad en ensayos clínicos (Franco y col., 2014).

Existen combinaciones de adyuvantes denominados sistemas de adyuvantes (AS), desarrollados por GlaxoSmithKline (GSK). Diferentes AS se encuentran en estudios clínicos en fase I, II y III: el AS01, compuesto por liposomas, lipopolisacarido MLP y QS21; el AS03, compuesto por  $\alpha$ -tocofenol y escualeno en emulsión aceite en agua; el AS04, compuesto por MPL y sales de aluminio y finalmente, el AS15, compuesto por liposomas, MLP, QS21 y CpG (Tabla 9).

### III.1.3. Adyuvantes evaluados para vacunas contra *T. cruzi*.

Debido al auge en vacunas de ADN, en el desarrollo de vacuna para este parásito muchos sistemas de adyuvantes se basaron en moléculas que se expresan junto con los antígenos, como la citoquinas IL-12 y GM-CSF (Tabla II, Capítulo I). En la evaluaciones de vacunas a subunidad se han realizado avances con el adyuvante ODN CpG, utilizando al antígeno Cruzipaína (Frank y col., 2003), lo que permitió respuestas inmunes mejoradas, sesgadas hacia Th1. Estudios similares con este adyuvante se realizaron con la TS, la cual indujo protección contra *T. cruzi*. La administración intranasal de TS mezclado con el ODN CpG indujo tanto protección en la mucosa, como en la sistémica contra *T. cruzi* (Giddings y col., 2010; Hoft y col., 2007).

El grupo de Dumonteil y col. junto con SABIN Vaccine Institute, han desarrollado una vacuna terapéutica bivalente de ADN que codifica los antígenos TC24 y TSA-1 (Dumonteil y col., 2004). Dado que las vacunas de ADN aún no se han aprobado en vacunas humanas, la vacuna terapéutica se rediseñó como vacuna de proteína recombinante utilizando los adyuvantes de sales de aluminio junto con un agonista sintético del TLR4 el E6020. En el año 2012 se informó que dentro de los primeros 5 años de irían a realizar los ensayos clínicos de la fase I (Dumonteil y col., 2012).

### III.1.4. Desarrollo de este capítulo.

Se propuso evaluar dos adyuvante de nueva generación en el modelo de infección con *T. cruzi* propuesto. Se empleó el inmunógenos TS para realizar las evaluaciones y se compararon los resultados con los obtenidos para el adyuvante de Freund. Los adyuvantes seleccionados fueron el inmunocomplejo ISCOMATRIX y el ODN no CpG IMT504. Los mismos no habían sido formulados hasta el momento con proteínas recombinantes de este parasito para su evaluación en vacunas de subunidades.

Con el mejor adyuvante resultante de este estudio, se evaluó en el mismo modelo de infección, a los candidatos antigénicos seleccionados en el capítulo II; Tc3 y TS. También se incorporó a este estudio a la proteína CZ, que en otros estudios señalaron como un candidato muy prometedor para ser incorporado en una vacuna de subunidades. Cabe destacar que ni TS ni CZ habían sido evaluados con el adyuvante ISCOMATRIX anteriormente. En el caso de la Tc3, al no

haber sido previamente evaluada en ningún estudio, tampoco contaba con evaluaciones previas con este adyuvante.

## III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### III.2.1. Inmunógenos utilizados.

En este capítulo se utilizó a la proteína Transialidasa, ya evaluada en el capítulo II, la cual fue gentilmente cedida por el Department for Molecular Biomedical Research, VIB Ghent University, Bélgica.

Se utilizó la proteína Tc3, el más protector de los nuevos candidatos evaluados en el capítulo II y cuya expresión y purificación se describió en dicho capítulo.

Finalmente se utilizó la proteína Cruzipaína, gentilmente cedida por los Dres. Sergio Guerrero y Diego Arias del laboratorio de Bioquímica Microbiana, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.

### III.2.2. Cepa de ratones y parásitos de *T. cruzi*

Se empleó el mismo modelo de infección descrito en el capítulo II. Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, para todas las evaluaciones. Para el desafío con *T. cruzi*, se utilizó la cepa de parásito de *T. cruzi* Tulahuen clon 2. Para el mantenimiento de los parásitos en el estadio infectivo trypomastigote, se utilizó la cepa de ratones Cf1 de tres semanas de edad.

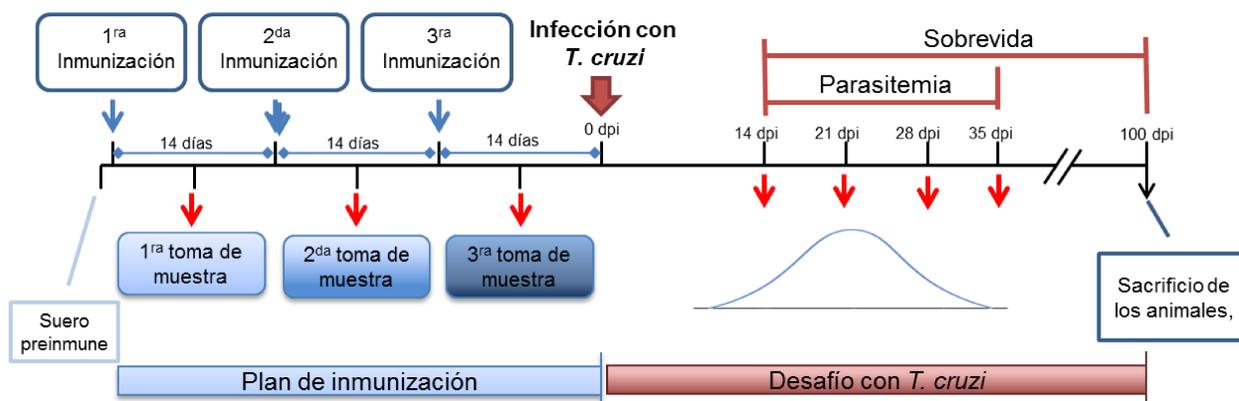
### III.2.3 Adyuvantes evaluados.

Se evaluaron tres adyuvantes formulados con la proteína Transialidasa: El Adyuvante completo de Freund (AF, Sigma-Aldrich), el adyuvante ISCOMATRIX (IMX) y el adyuvante IMT507 (IMT). El adyuvante ISCOMATRIX, es una partícula compuesta por fosfolípidos, colesterol y saponina de Quilaja saponaria, elaborado por ISCONOVA, gentilmente cedida por el Dr. Bror

Morein. El adyuvante IMT507 es un oligonucleótido no CpG, diseñado y gentilmente cedido por el Dr. Alejandro Montaner, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Fundación Pablo Cassará, Buenos Aires, Argentina (Elias y col., 2003).

### III.2.4. Plan de inoculación

Se utilizaron grupos de 5 ratones Balb/c para para cada condición evaluada en cada ensayo independiente. Las evaluaciones mencionadas en este capítulo correspondieron a: la proteína Transialidasa (TS) con los adyuvantes AF (TS-AF), IMX (TS-IMX), IMT (TS-IMT), un grupo control sin adyuvante y con el inmunógeno (TS) y un grupo control PBS sin adyuvante (PBS). Cada grupo fue inmunizado vía subcutánea. Para la formulación con AF, se emulsionó 10 µg de TS en PBS con un volumen igual de AF en un volumen final de 100 µl por dosis. Para el grupo TS-IMX, se adicionaron 5 µg de IMX y 10 µg de TS en un volumen final de 100 µl. Para el grupo TS-IMT se adicionaron 500 µg de IMT, 10 µg de TS en 100 µl por dosis por ratón. Al grupo TS sin adyuvante, se le adicionaron 10 µg de TS en 100 µl de PBS y el grupo control PBS fue realizado con 100 µl de PBS. Cada grupo recibió tres dosis, con un intervalo de 14 días entre cada dosis. Se tomaron muestras de sangre antes de la primera inoculación (suero preinmune) y cada 7 días posteriores a cada inmunización (Figura 15). Las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de la cola de los ratones, mediante capilares heparinizados, los cuales se centrifugaron 15 minutos a 3000 r.p.m. Se recuperó el suero y se conservó en freezer a - 20º C.



**Figura 15:** Plan de inmunización, seguido del desafío con *T. cruzi*. 14 días luego de la última inmunización, los grupos de ratones fueron infectados con 1000 parásitos de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen clon 2. Se evaluó la parasitemia en los días 14, 21, 28 y 35 post infección y la supervivencia fue evaluada diariamente durante 100 días.

### III.2.5. Desafío de los grupos inmunizados con *T. cruzi*

El desafío se realizó como se mencionó en el capítulo II; transcurridos 14 días posteriores a la última inoculación, los ratones fueron desafiados con 1000 parásitos de *T. cruzi* (Figura 15). A los 100 dpi se sacrificaron los animales que sobrevivieron al desafío, los mismos fueron anestesiados previamente con ketamina/Xilacina en una dosis 100 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente. El sangrado fue mediante punción cardiaca, e inmediatamente después de la extracción, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

### III.2.6. Evaluación de Anticuerpos específicos

Los ensayos de ELISA con las proteínas recombinantes se realizaron como los mismos elementos como se describió en el capítulo II. Para el caso del inmunógeno TS, en este capítulo se evaluaron los títulos de anticuerpos IgG totales y de las subclases y para IgG total también se midió avidéz. Para el caso de los inmunógenos Tc3 y CZ se realizó medición de DO mediante ELISA indirecto como se describió en el capítulo II.

El título específico de cada subclase de IgG se realizó con diluciones sucesivas al medio de cada muestra hasta el punto final. Se definió como dilución de punto final, aquella dilución que produjo una densidad óptica mayor que la dilución del suero preinmune 1/100, y para la cual la dilución subsiguiente de la muestra caía por debajo de la DO del suero preinmune diluido.

Para medir la avidéz de los anticuerpos, se realizó un ELISA indirecto por sextuplicado para cada muestra, diluida 1/1000. Después de la incubación con el suero, la mitad de los pocillos fueron tratados con urea (6 M) durante 30 min, se realizaron lavados y se procedió a la terminación de la técnica de ELISA como se describió anteriormente. La avidéz del anticuerpo se calculó como sigue:

- $$\text{Avidéz \%} = \left[ \frac{\text{DO con urea}}{\text{DO sin tratamiento con urea}} \right] \times 100$$

### III.2.7. Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

La reacción de hipersensibilidad retardada (de sus siglas en inglés DTH) se realizó 11 días después de la última inmunización mediante inyección intradérmica de 5 µg de la proteína recombinante en la almohadilla de la pata trasera izquierda de cada ratón. El test se realizó con la

misma proteína con la que fue inmunizado previamente a los ratones de cada grupo y se agregó un grupo control para cada inmunógeno. El espesor de las patas se midió con un calibre Vernier (Stronger), antes de la administración del antígeno y a las 48 h después. Los resultados se expresan como la diferencia en espesor de la almohadilla de la pata correspondiente antes y después de la inoculación.

### **III.2.8. Medición de la parasitemia y peso relativo porcentual**

Para la medición del peso relativo porcentual, los ratones se pesaron antes de la infección y cada 7 días luego de la infección, hasta los 42 dpi. Se adicionó un grupo de ratones control sin infectar para realizar las comparaciones. El peso relativo porcentual se calculó restando el peso del día 0 post infección al peso de cada medición posterior, dividiendo el valor obtenido por el peso del día 0 post infección y se lo multiplicándolo por 100.

Para la medición de la parasitemia, se extrajo 5  $\mu$ l de sangre de la punta de la cola de los ratones y se contaron 50 campos distribuidos uniformemente a lo largo del cubreobjetos, a 400 x en un microscopio óptico (Leica).

### **III.2.9. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar diferencias entre todos los grupos evaluados, seguido la prueba de Mann-Whitney U-test para las comparaciones entre dos grupos. La diferencias significativas se indica con (\*) cuando  $P < 0.05$ , (\*\*) cuando  $P < 0,01$  y (\*\*\*) cuando  $P < 0,001$  en comparación entre los grupos señalados.

Para las evaluaciones de la supervivencia, se utilizó la prueba de Mantel-Cox en las curvas de supervivencia.

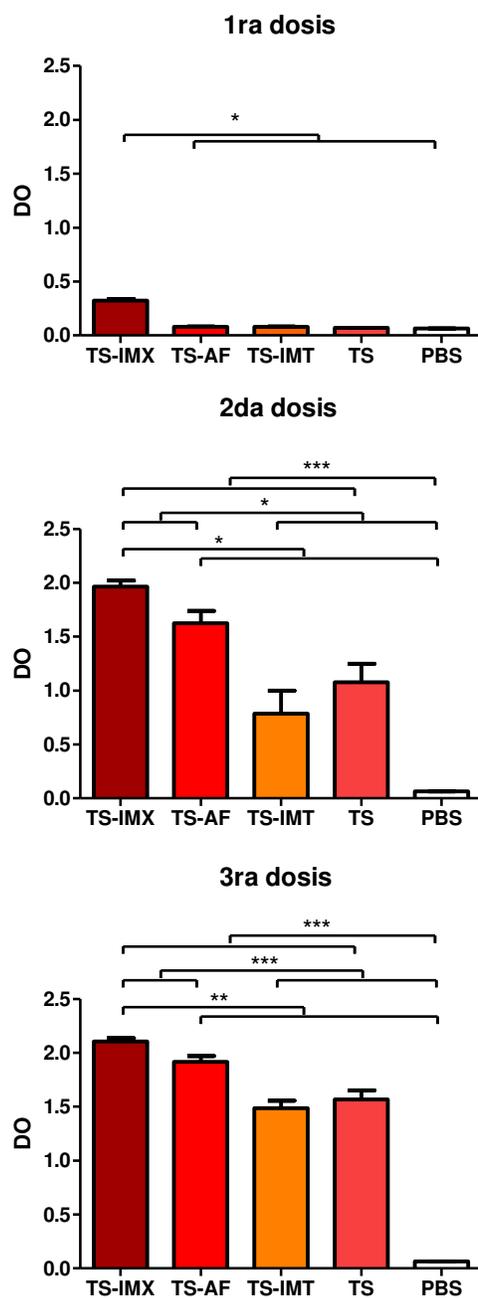
Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad 4.0 (GraphPad).

### III.3. RESULTADOS

#### III.3.1. Evaluación de la respuesta humoral de cada adyuvante

Para la evaluación de los dos adyuvantes propuestos (ISCOMATRIX e IMT54), utilizamos a la proteína TS como antígeno y el modelo de inmunización e infección descrito en el capítulo II. Esta proteína fue seleccionada por presentar mayor protección frente al desafío con el parásito, cuando se la evaluó como inmunógeno en el trabajo ya mencionado. Utilizamos el adyuvante de Freund como grupo de comparación (TS-AF), además un grupo control con el antígeno sin adyuvante (TS) y un grupo inmunizado sólo con PBS (PBS).

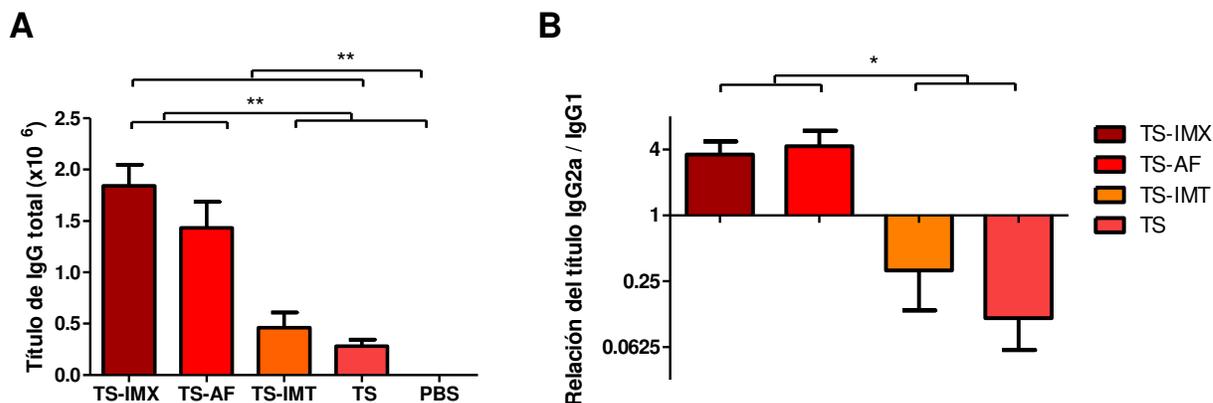
Al hacer un análisis de los niveles de anticuerpos mediante DO luego de realizar cada dosis, se observa que a los 7 días de la primera dosis, el grupo TS formulado con ISCOMATRIX (TS-IMX) arrojó DO ópticas detectables y significativas con respecto a los demás grupos (Figura 16;  $P < 0,05$ , TS-IMX vs otros grupos, test Mann Whitney). En la segunda dosis, el grupo TS-IMX y TS-AF presentaron DO mayores y significativas con respecto al grupo con el adyuvante IMT54 (TS-IMT) y el TS y este comportamiento se repite en la 3ra dosis (Figura 16;  $P < 0,01$ , TS-IMX y TS-I AF vs otros grupos, test Mann Whitney). Finalmente todos los grupos inmunizados con TS generaron anticuerpos específicos ( $P < 0,001$ , grupos inmunizados vs PBS, test Mann Whitney)



**Figura 16: Evaluación de la respuesta humoral luego de cada dosis de los diferentes adyuvantes evaluados.** Las DO de cada suero fueron obtenidas mediante la técnica de ELISA. Todos los sueros fueron enfrentados a la proteína TS con que se realizó la inmunización. \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ).

Con los sueros de la 3ra dosis se midió el título de anticuerpos específicos para TS de las IgG totales (Figura 17A) y las relaciones de los títulos de las subclases IgG1 e IgG2a

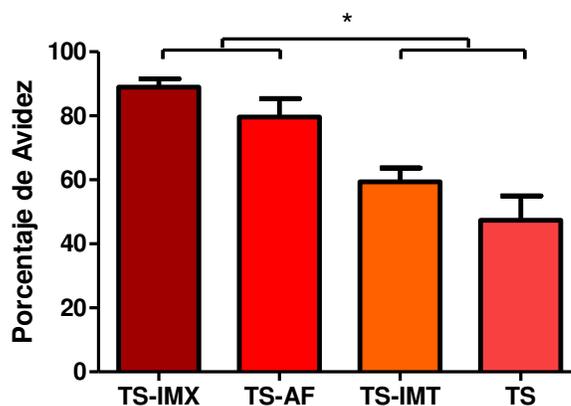
(Figura 17B). El grupo TS-IMX presentó los mayores títulos de anticuerpos IgG totales ( $1,84 \pm 0,46 \times 10^6$ ), seguido por el grupo TS-AF ( $1,43 \pm 0,56 \times 10^6$ ), los grupos TS-IMT y TS presentaron títulos significativamente inferiores ( $P < 0,05$ , TS-IMX y TS-AF vs TS-IMT y TS), con una alta variabilidad de títulos entre los ratones del mismo grupo ( $4,6 \pm 3,3 \times 10^5$  y  $2,8 \pm 1,4 \times 10^5$  respectivamente).



**Figura 17: Evaluación de la respuesta humoral de los diferentes adyuvantes evaluados.** Mediante la técnica de ELISA se obtuvieron los títulos de anticuerpos para cada formulación. Cada suero fue enfrentado a la proteína TS con que se realizó la inmunización. **A.** Medición del título de IgG total de los grupos inmunizados. **B.** Relación de los títulos de las subespecies de anticuerpos IgG2a/IgG1. \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ).

Medimos la relación de las subespecies de anticuerpos IgG2a/IgG1 (Figura 17B) con el fin de evaluar el perfil de respuesta inmune generado. Para los adyuvantes IMX y AF, la relación obtenida fue mayor a 1, la cual es coincidente con un perfil proinflamatorio. Para el grupo TS-IMX y TS sin adyuvante la proporción de anticuerpos se inclinó más hacia un tipo de respuesta reguladora, habiendo producido escaso título de anticuerpos IgG2a ( $5,6 \pm 2,2 \times 10^4$ ), en comparación con el grupo TS-IMX el cual generó títulos significativamente mayores ( $10,1 \pm 3,7 \times 10^6$ ;  $P < 0.01$ , TS-IMX vs TS-IMT y TS; test Mann Whitney).

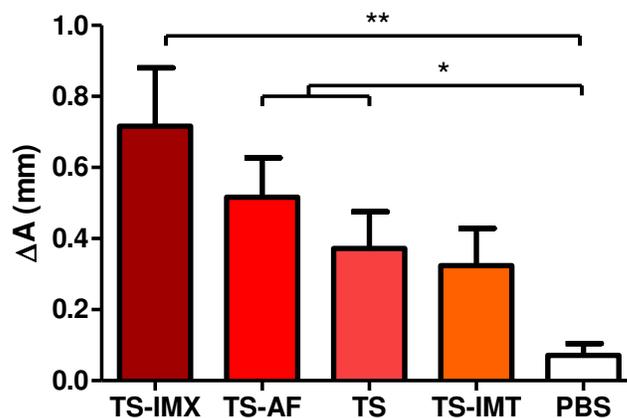
Evaluamos un índice de avidéz relativa calculado por el porcentaje de anticuerpos que permanecen ligados al antígeno luego de una incubación con una solución caotrópica como la urea 6 M (Figura 18). Los grupos TS-IMX y TS-AF presentaron altos porcentajes de avidéz con respecto a los grupos TS-IMT y TS ( $P < 0,05$ , TS-IMX y TS-AF vs TS-IMT y TS; test Mann Whitney).



**Figura 18: Avidéz lograda con los distintos adyuvantes.** Porcentaje de Avidéz mediante la técnica de ELISA. Se realizó por sextuplicado incubando 3 de las 6 repeticiones media hora con una solución urea 6 M. \* ( $P < 0,05$ ).

### III.3.2. Evaluación de la respuesta celular *in vivo* antes del desafío con *T. cruzi*

Finalmente evaluamos *in vivo* la respuesta celular mediante la técnica de la reacción de hipersensibilidad retardada. Para esto inoculamos el antígeno TS y evaluamos a las 48 hs la reacción de inflamación generada (Figura 19). Los grupo TS-IMX, TS-AF y TS produjeron una mayor inflamación comparada con el grupo PBS, siendo la respuesta más significativa la de TS-IMX ( $P < 0,01$ , TS-IMX vs PBS;  $P < 0,05$ , TS-AF y TS vs PBS; test Mann Whitney). El grupo TS-IMT no generó diferencias significativas con respecto al grupo PBS ( $P=0,173$ , TS-IMT vs PBS; test Mann Whitney).



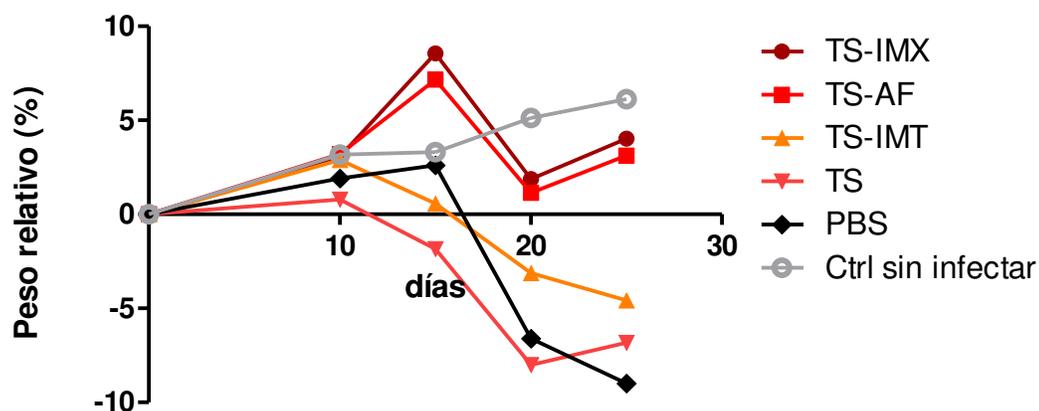
**Figura 19: Evaluación de la respuesta celular *In vivo* mediante la reacción de hipersensibilidad retardada.** Cada grupo fue inoculado con 5  $\mu$ g de TS en la pata izquierda trasera de cada ratón. La gráfica muestra la media de diferencia en milímetros de las mediciones de las patas antes y después de la inoculación. \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ).

### III.3.3. Desafío con *T. cruzi*

Transcurridos 14 días luego de la última inmunización, los grupos evaluados fueron desafiados con 1000 parásitos de *T. cruzi*. Se evaluó el peso promedio de los grupos cada 7 días, la parasitemia a los 14, 21, 28 y 35 dpi y la mortalidad diariamente. Finalmente otro grupo control de 5 ratones (Ctrl sin infectar), no se desafió para realizar las comparaciones del peso.

#### III.3.3.1. Evaluación del peso relativo porcentual

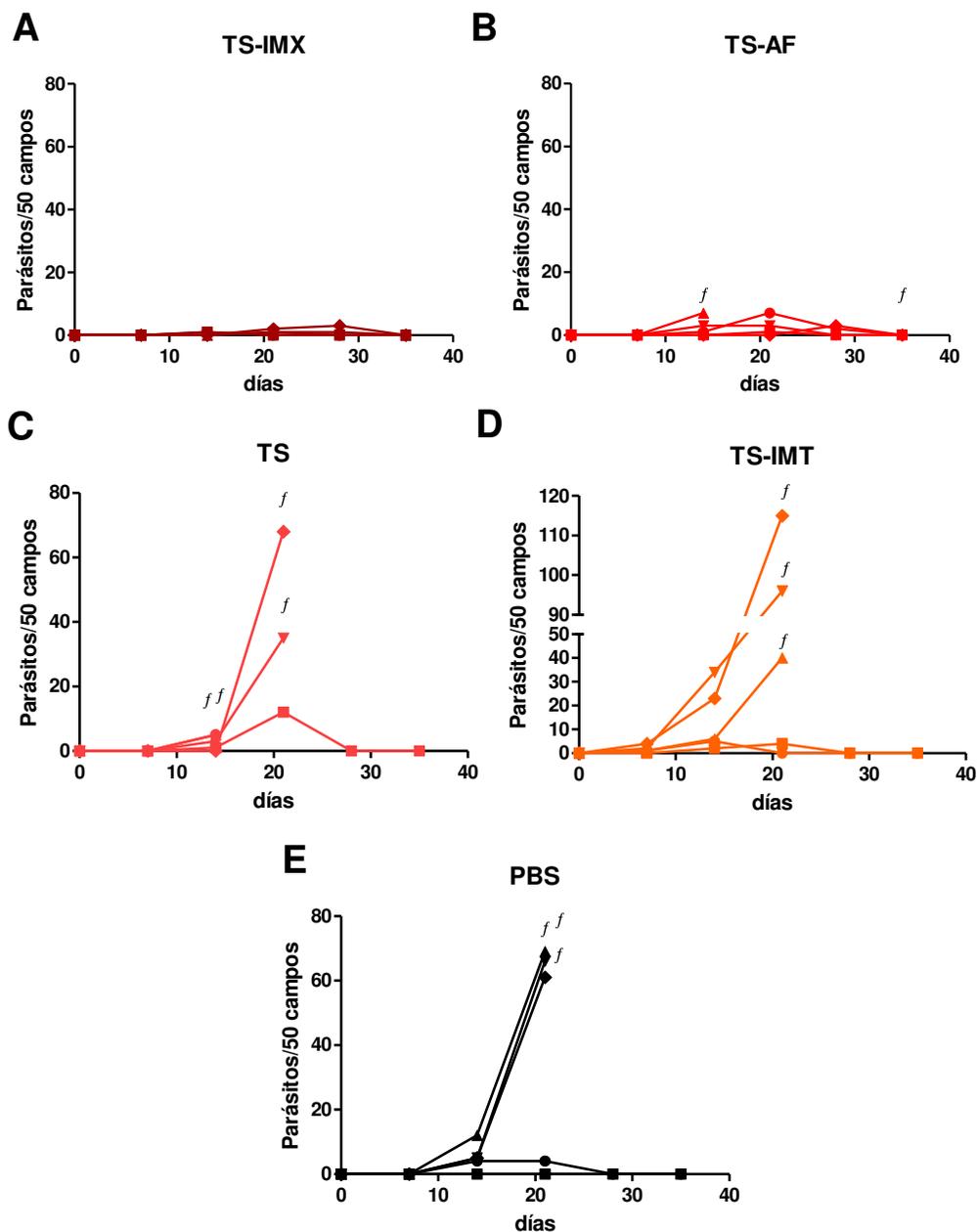
Para evaluar la evolución del peso promedio de cada grupo luego de la infección con *T. cruzi*, se calculó el peso relativo porcentual tomando el peso del día previo a la infección como 100%. Se graficaron las evoluciones de los pesos porcentual de los grupos en el curso de la infección (Figura 20). Se puede observar cómo los grupos aumentaron de peso en los primeros 10 días post infección. Pasado ese tiempo, los grupos TS-IMX y TS-AF continuaron aumentando de peso sin presentar diferencias significativas con respecto al grupo Ctrl sin infectar. Los grupos TS-IMT, TS y PBS a partir del día 10 post infección comenzaron a perder peso, llegando a presentar a los 25 días una diferencia negativa del 11, 13 y 15 % del peso de los grupos TS-IMT, TS y PBS respectivamente, comparado con el grupo sin infectar. Luego de los 30 días post infección, los ratones que sobrevivieron comienzan a controlar la infección y a recuperar el peso, no presentando diferencias a partir de los 40 días del desafío.



**Figura 20:** Evaluación del peso relativo de los grupos inmunizados luego del desafío con *T. cruzi*. Peso relativo en base al día previo a la infección (considerado como peso del día 0). Se calculó restando el peso del día 0 de infección, con el peso de cada medición posterior, dividido el día 0 de infección y se lo multiplicó por 100.

### III.3.3.2. Evaluación de la parasitemia durante la infección con *T. cruzi*

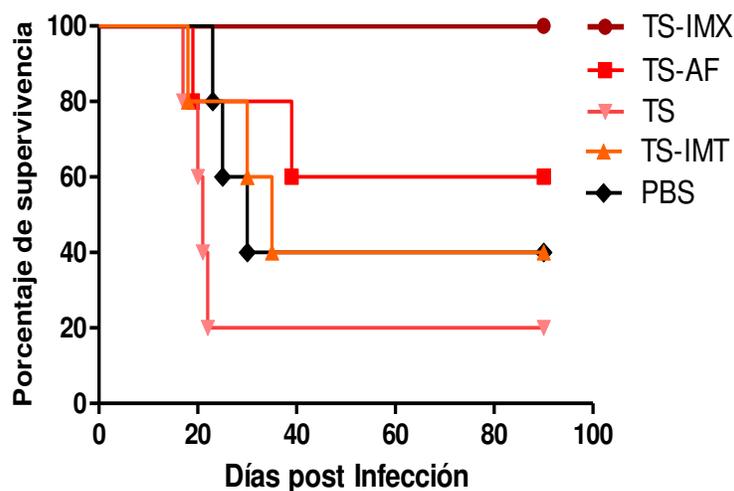
Se evaluó la parasitemia de los grupos inmunizados con los diferentes adyuvantes (Figura 21). Luego de 14 días post infección, los grupos comenzaron a presentar diferentes grados de parasitemias, siendo el grupo TS-IMX el que menor cantidad de parásitos presentó (2 de los 5 ratones presentaron 1 parásito en los 50 campos observados). A los 21 días post infección, la parasitemia se hizo máxima en todos los grupos; en este punto los grupos TS-IMX y TS-AF presentaron las menores parasitemias ( $0,8 \pm 0,8$  y  $2,7 \pm 2$  parásitos respectivamente). Los grupos TS-IMT, TS y PBS no presentaron diferencias en la parasitemia ( $38,3 \pm 28,2$ ,  $61,8 \pm 44,4$  y  $40 \pm 34,8$  parásitos respectivamente). Hacia los 28 días, los ratones que no murieron, independientemente del grupo al que pertenecían, comenzaron a disminuir la parasitemia, siendo esta casi nula para la mayoría de los grupos a los 35 días post infección.



**Figura 21: Evaluación de la parasitemia en los grupos inmunizados luego del desafío con *T. cruzi*.** Los ratones inmunizados con TS-IMX, TS-AF, TS-IMT, TS y PBS (n = 5 / grupo) fueron desafiados con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen a los 14 días después de la última inmunización. Parasitemias individuales por grupo. *f* indica la muerte de un animal.

### III.3.3.3. Curva de supervivencia de los grupos evaluados con los diferentes adyuvantes

La supervivencia de los grupos evaluados con distintos adyuvantes fue variada, siendo el inmunógeno TS-IMX el único que proporcionó al grupo inmunizado una supervivencia de 100 % frente al desafío con el parásito (Figura 22). Este grupo fue el único que presentó diferencias significativas en la supervivencia con respecto al grupo control ( $P < 0,05$ ; TS-IMX vs PBS, Mantel-Coz). El grupo TS-AF presentó una supervivencia del 60% siendo ligeramente superior a los grupos PBS y TS-IMT (40%). El grupo TS evaluado sin adyuvante, presentó una rápida tasa de mortalidad (80% a los 22 días), manteniéndose constante hasta el final del desafío.



**Figura 22: Evaluación de la supervivencia de los grupos evaluados con diferentes adyuvantes.** Los ratones inmunizados con TS-IMX, TS-AF, TS-IMT, TS y PBS ( $n = 5$  / grupo) fueron desafiados con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen a los 14 días después de la última inmunización. La gráfica indica los porcentaje de supervivencia a lo largo del tiempo.

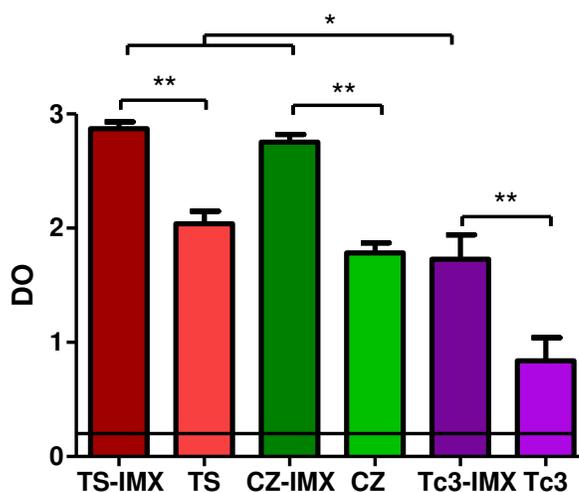
### III.3.4 Reevaluación de antígenos de *T. cruzi* potencialmente protectivos con el adyuvante ISCOMATRIX

Dado que el adyuvante ISCOMATRIX generó una respuesta protectora tan favorable, decidimos evaluar dicho adyuvante con otros candidatos antigénicos de *T. cruzi*. Seleccionamos al antígeno Tc3 por haber sido el que mejor desempeño presentó, luego de la TS, en el estudio ya detallado en el capítulo II. Además, incluimos una formulación de IMX con la proteína Cruzipaína.

Como hemos mencionado, según los antecedentes bibliográficos, dicha proteína es un candidato vacunal para *T. cruzi* muy prometedor. Dado que no existían antecedentes del uso de ISCOMATRIX para la elaboración de una vacuna con antígenos definidos de *T. cruzi*, estos estudios también resultaban originales. En este estudio, también reevaluamos la formulación TS+MX. Esto nos permitió, por un lado, revalidar los resultados obtenidos en la primera evaluación, y por otro lado, comparar con los dos antígenos seleccionados en esta sección.

### III.3.4.1. Evaluación de la respuesta humoral

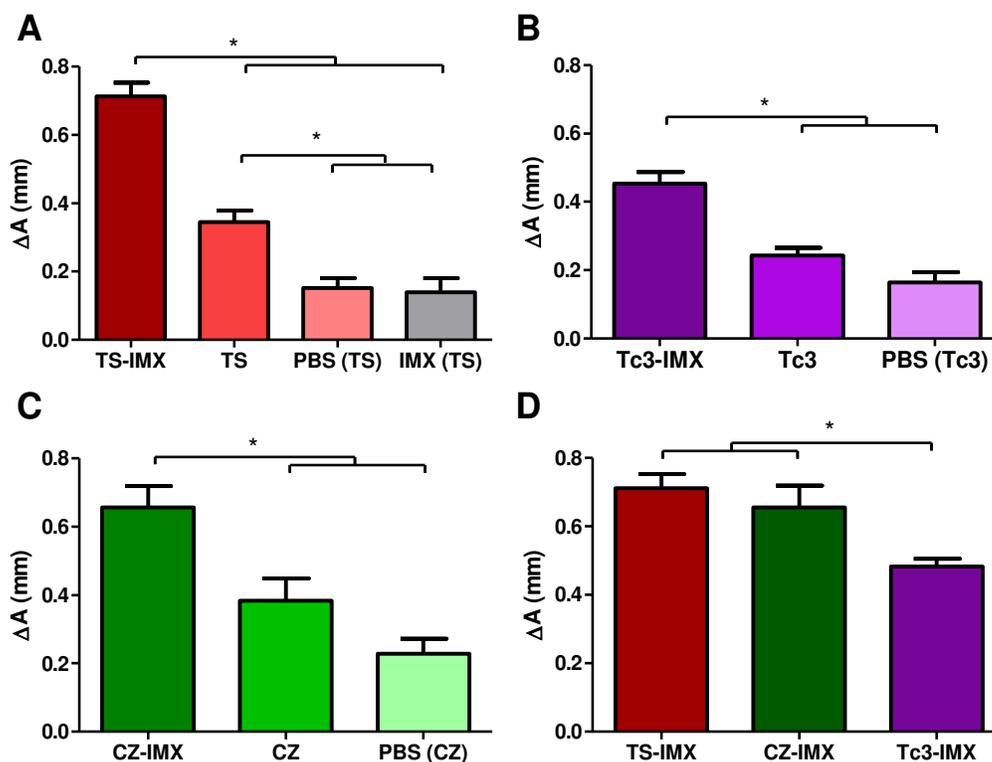
Se inmunizaron grupos con las proteínas propuestas con y sin el adyuvante ISCOMATRIX. Los grupos son la TS-IMX y TS sin adyuvante, la Tc3 con IMX (Tc3-IMX) y sin adyuvante (Tc3) y finalmente la Cruzipaína, CZ-IMX y CZ sin adyuvante (Figura 23). Todos los grupos inmunizados con la proteína más el adyuvante presentaron diferencias significativas en la DO, cuando se midió las IgG totales (Figura 23), comparados con el mismo antígeno sin adyuvante ( $P < 0,01$ ; grupo tratado con adyuvante vs grupo tratado sin adyuvante; test Mann Whitney). El inmunógeno Tc3 presentó menor respuesta de anticuerpos IgG total en relación a los inmunógenos TS y CZ ( $P < 0,05$ , Tc3-IMX vs TS-IMX y CZ-IMX, test Mann Whitney).



**Figura 23: Evaluación de la respuesta humoral generada por los antígenos TS, Tc3 y CZ con y sin IMX.** Para la medición de la DO mediante la técnica de ELISA, cada suero fue enfrentado a la misma proteína con se inmunizó. Se midió la IgG total de los grupos inmunizados, la línea horizontal indica la línea de corte del suero preinmune. \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ).

#### III.3.4.2. Evaluación de la respuesta celular *in vivo* antes del desafío con *T. cruzi*

Evaluamos *in vivo* la respuesta celular mediante la técnica de la reacción de hipersensibilidad retardada. Para esto inoculamos el antígeno TS a los grupos TS-IMX, TS, PBS (TS); Tc3 a los grupos Tc3-IMX, Tc3 y PBS (Tc3) y CZ a los grupos CZ-IMX, CZ, PBS (CZ) y evaluamos a las 48 hs la reacción de inflamación generada. Utilizamos un grupo control para cada antígeno y un grupo control inmunizado solo con IMX, el cual sólo se evaluó con la proteína TS (Figura 24). Los grupos inmunizados con IMX produjeron una mayor inflamación comparada con los grupos sin IMX y PBS ( $P < 0,05$ , grupo tratado con adyuvante vs grupo tratado sin adyuvante y PBS). Sólo el grupo TS sin adyuvante presentó diferencias significativas con respecto al grupo PBS ( $P < 0,05$ , TS vs PBS; test Mann Whitney), los grupos Tc3 y CZ sin adyuvante no generaron diferencias con respecto al grupo PBS ( $P = 0,09$  y  $P = 0,67$ ; Tc3 vs PBS y CZ vs PBS respectivamente). Cuando comparamos los tres antígenos inmunizados junto con el IMX, observamos que los grupo TS-IMX y CZ-IMX obtuvieron diferencias significativas con respecto al grupo Tc3-IMX ( $P < 0,05$ , TS-IMX y CZ-IMX vs Tc3-IMX; Figura 24D).



**Figura 24: Evaluación de la respuesta celular *In vivo* mediante la reacción de hipersensibilidad retardada.** Cada grupo fue inoculado con 5  $\mu$ g de proteína en la pata izquierda trasera de cada ratón. La gráfica muestra la media de diferencia en milímetros de las mediciones de las patas antes y después de la inoculación. **A.** Evaluación de los grupos inmunizados con TS: **B.** Evaluación de los grupos inmunizados con Tc3. **C.** Evaluación de los grupos inmunizados con CZ. **D.** Comparación entre los grupos inmunizados con IMX. \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ).

### III.3.4.3. Evaluación de la parasitemia durante la infección con *T. cruzi*

Evaluamos la parasitemia a los 14, 21, 28 y 35 días luego del desafío (

Figura 25). Luego de 14 días post infección, los grupos comenzaron a presentar diferentes grados de parasitemias, siendo los grupos TS-IMX y CZ-IMX aquellos en los que se cuantificaron menores cantidades de parásitos.

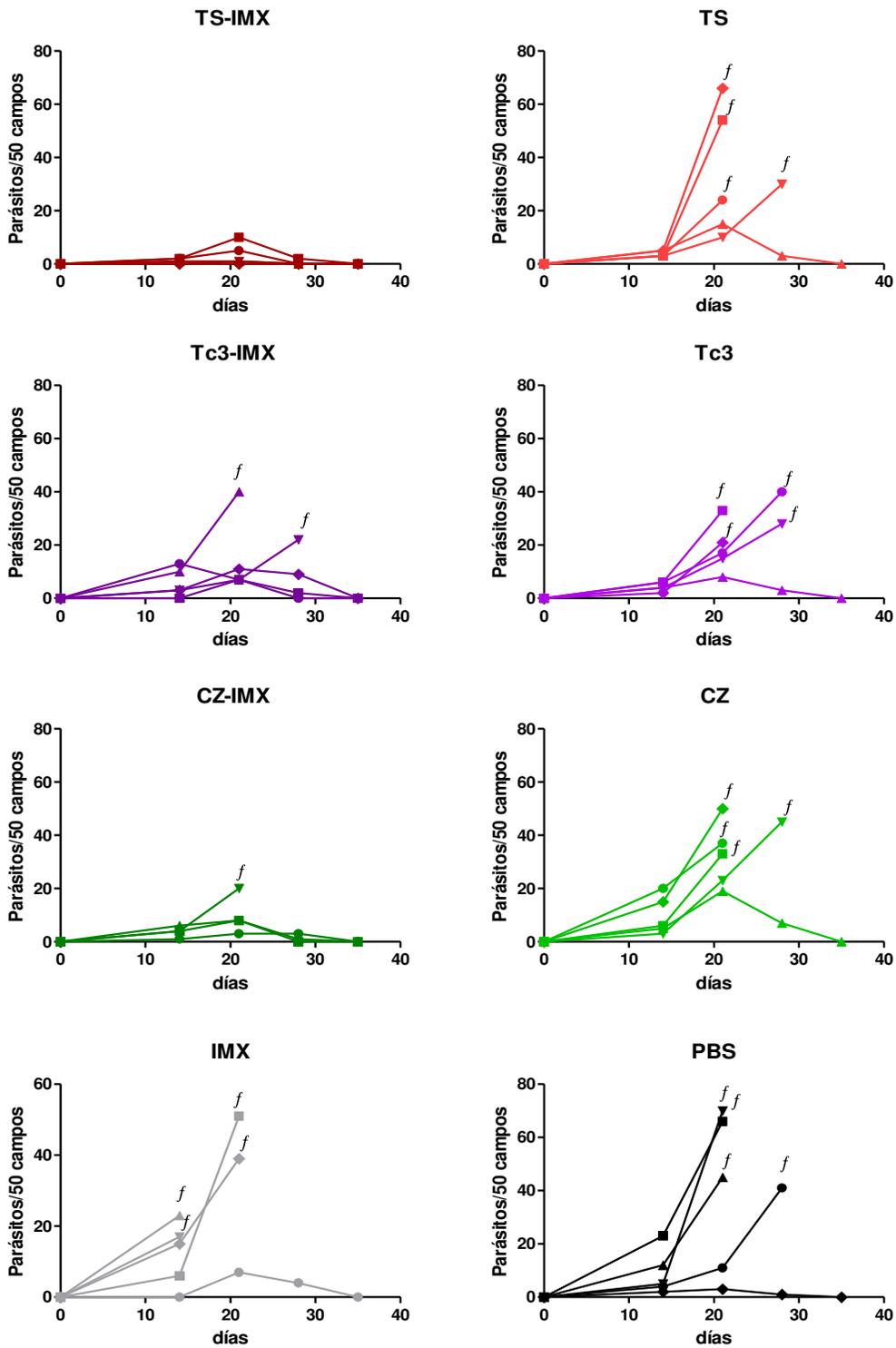


Figura 25: Evaluación de la parasitemia en los grupos inmunizados luego del desafío con *T. cruzi*. Los grupos inmunizados (n = 5/ grupo) fueron desafiados con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen a los 14 días después de la última inmunización. Parasitemias individuales por grupo. *f* indica la muerte de un animal

A los 21 días post infección, la parasitemia se hizo máxima en todos los grupos. Los grupos que no fueron formulados con adyuvante presentaron elevada parasitemia, además del grupo Tc3-IMX (Figura 25). Hacia los 28 días, los ratones que no murieron comenzaron a disminuir la parasitemia, siendo casi nula para la mayoría de los grupos a los 35 días post infección. Los grupo control IMX y PBS presentaron elevadas parasitemias.

### III.3.4.4. Curva de supervivencia de los grupos evaluados

La grafica de supervivencia de los inmunógenos evaluados con y sin el adyuvante ISCOMATRIX arrojó una mejora en la supervivencia cuando se inmunizaron con el adyuvante (Figura 26), siendo significativa para el grupo TS-IMX en comparación con el grupo TS sin adyuvante y con el grupo control ( $P < 0,05$ ; TS-IMX vs TS y PBS, Mantel-Cox). El inmunógeno CZ-IMX arrojó una supervivencia del 80% en relación al 20 % del grupo CZ y PBS. Si bien no es significativa ( $P = 0,0845$ ; CZ-IMX vs CZ y PBS, Mantel-Cox), el estadístico marca una tendencia favorable y en la misma dirección que TS-IMX que puede observarse claramente en la gráfica. El grupo Tc3-IMX presentó una supervivencia del 60 % siendo superior al grupo Tc3 y PBS, aunque su diferencia no es significativa ( $P = 0,333$ ; Tc3-IMX vs Tc3 y PBS, Mantel-Cox).

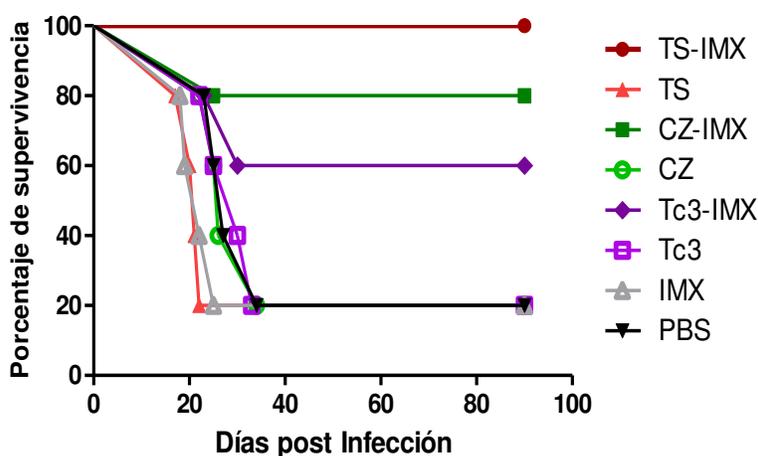


Figura 26: Evaluación de la supervivencia de los grupos evaluados con los diferentes inmunógenos con el adyuvante ISCOMATRIX. Los ratones inmunizados ( $n = 5$  / grupo) fueron desafiados con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen a los 14 días después de la última inmunización. La gráfica indica los porcentaje de supervivencia a lo largo del tiempo.

### III.4. DISCUSIÓN

Paralelamente a los esfuerzos direccionados a la identificación de candidatos para desarrollar una vacuna contra *T. cruzi*, diferentes adyuvantes fueron probados para mejorar o sesgar las respuestas inmunes hacia una fuerte respuesta celular tipo Th1. Las sales de aluminio fueron empleadas en numerosos ensayos y demostraron tener cierta protección (Tabla 2, Capítulo I), aunque su incapacidad de generar un tipo de respuesta protectora Th1 hizo que fueran reemplazados por adyuvantes de nueva generación más aptos. En muchos trabajos que han utilizado el enfoque de inmunización génica han empleado citoquinas, y moléculas coestimuladoras como la GM-CSF, CD40 y ODN CpG. El GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos) fue una de las citoquinas elegida ya que es capaz de aumentar la capacidad de presentación del antígeno de las células dendríticas. La interleucina 12 (IL-12) es una citoquina clave involucrada en la activación de células T CD8<sup>+</sup> y el direccionamiento hacia una respuesta inmune tipo Th1. En los últimos años se han obtenido importantes éxitos con el agonista del TLR9, el ODN CpG, en distintos trabajos con proteínas recombinantes, como ASP-2, TS y CZ, entre otras (Araújo y col., 2005; Frank y col., 2003; Giddings y col., 2010; Hoft y col., 2007) como en inmunización génica (Tabla 2, Capítulo 1). Dicho adyuvante tiene el principal inconveniente de que es fácilmente degradado en el organismo por lo que debe ser administrado encapsulado o se tiene que sintetizar con enlaces fosforotioato (en vez de fosfodieter), lo que aumenta sustancialmente su costo a niveles de difícil acceso dado que se utiliza en altas concentraciones para animales superiores.

En este capítulo se utilizó a el IMT504 como adyuvante, el cual es un oligonucleótido no CpG diseñado por Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, el cual fue evaluado en células de mono, cerdo, ovejas y humanos la capacidad adyuvante de aumentar la proliferación en células del sistema inmune (Elias y col., 2003). El IMT504 se evaluó en modelos de rata Sprague-Dawley, obteniendo alto títulos de

anticuerpos IgG2b y producción de IFN- $\gamma$  en modelos de Hepatitis B (Elias y col., 2005). En cambio nunca había sido empleado hasta la fecha, en un modelo murino de infección con *T. cruzi*. Si bien en evaluaciones preliminares, el grupo del Dr. Montaner había observado la capacidad estimuladora de este adyuvante también en ratón, de las evaluaciones realizadas se determinó que el mismo no permitió realzar o redirigir la respuesta inmune. Los ratones inmunizados con TS-IMT generaron una pequeña mejora, pero claramente no significativa en la producción de anticuerpos totales (Figura 17A), así como en la relación IgG2a/IgG1 (Figura 17B) y avidéz de anticuerpos (Figura 18). Sin embargo en la medición de la DTH, el grupo TS-IMT fue menor que el grupo TS, no presentando diferencias con el grupo control (Figura 19). Este resultado desalienta el uso de este adyuvante teniendo en cuenta la función clave de una la correcta activación celular en defensa contra este parásito (Padilla y col., 2009). En concordancia con ese resultado, luego del desafío con *T. cruzi*, se observó que el grupo TS-IMT presentó ausencia de protección, comparada con el grupo TS y PBS, con disminución del peso, elevada parasitemia y mortandad. Concluimos que el adyuvante IMT no generó su acción inmunoestimuladora en el modelo murino empleado. Cabe destacar que, a los oligonucleótidos CpG se les tiene que modificar la secuencia según la especie, para poder conservar su actividad adyuvante. En cambio, para el caso de IMT la acción inmunoestimuladora es conservada en varias especies animales (Elias y col., 2003, 2005). Por eso la efectividad del IMT para desarrollar una respuesta contra *T. cruzi* se debería evaluar en un modelo de infección con *T. cruzi* utilizando otras especies. De este modo se podrá conocer qué nivel de protección puede ejercer, y si puede generar una respuesta celular citotóxica necesario para combatir a este parásito.

En lo que respecta a adyuvantes particulados evaluados para *T. cruzi*, se destacan dos trabajos previos que utilizaron las partículas ISCOM e ISCOMATRIX. El primer trabajo fue realizado en los inicios de la década del 90', y consistió en inmunizar ratones Swiss-Webster con ISCOM e infectar con parásitos de la cepa Tulahuen. El inmunocomplejo ISCOM empleado, fue sintetizado utilizando como antígeno una proteína nativa de la membrana de los epimastigotes (Araujo y col., 1991), obteniendo un 100 % de supervivencia luego del desafío. También, en dicho trabajo se evaluó otro grupo, que consistió en inmunizar a la misma proteína formulada con el adyuvante, previamente sintetizado, ISCOMATRIX. Llamativamente, en dicho caso, todos los ratones del grupo murieron a los 13 días.

El segundo trabajo que evaluó antígenos nativos utilizando ISCOMATRIX, fue el de Hansen y col. (Hansen y col., 1996), quienes purificaron la porción del flagelo de *T. cruzi* y obtuvieron, con un modelo de infección similar al nuestro de ratones Balb/c y parásitos Tulahuen, un 75 % de supervivencia con producción de IFN- $\gamma$  y anticuerpo IgG2a. A pesar de estos prometedores resultados, los adyuvantes ISCOM-ISCOMATRIX no ha vuelto a utilizarse en vacunas contra *T. cruzi*, no siendo utilizado hasta la fecha con proteínas recombinantes provenientes de este parásito.

Otro caso más reciente de adyuvante particulados, fue el uso de liposomas como sistema de delivery (Migliaccio y col., 2008). En este trabajo, evaluaron extractos proteicos de *T. cruzi* en los estadios tripomastigotes y amastigotes formulados con liposomas. Si bien en dicho trabajo se obtuvieron anticuerpos específicos y activación de macrófagos, los ratones inmunizados no presentaron protección contra el desafío con el parásito.

El adyuvante ISCOMATRIX, ha sido ampliamente evaluado en vacunas y ha mostrado inducir una respuesta celular y humoral equilibrada, tal como se requiere para eliminar a muchos patógeno intracelulares (Coffman y col., 2010; Morelli y col., 2012; Sun y col., 2009). En la primera parte de nuestro estudio, se evaluaron las respuestas humoral y celular *in vivo* del IMX formulado con la TS. El título de anticuerpos IgG totales mejoró notablemente en el grupo TS-IMX con respecto al grupo TS sin adyuvante, incluso, cuando se comparó con el grupo TS-AF, la respuesta tiende a ser mayor (Figura 17A). Este aumento de la respuesta humoral, también se puede observar cuando se valoraron los anticuerpos luego de la primera dosis (Figura 16, 1ra dosis). En esta dosis, el grupo TS-IMX presentó un aumento en la DO comparada con los otros grupos ( $P < 0,05$ ). Esto es interesante ya que una de características que se buscan al elegir un adyuvante es que permitan generar respuestas en el menor tiempo posible y con el menor número de dosis posible. Al análisis de la producción de anticuerpos específicos, sumamos la evaluación de la fuerza de unión de dichos anticuerpos. Medimos el índice de avidéz para conocer la calidad de la respuesta obtenida. Observamos que dicho índice aumentó desde un ~50 %, para el grupo TS sin adyuvante, a un 90%, para el grupo TS-IMX. En conjunto, estos resultados revelan la importancia de este adyuvante en potenciar la cantidad y calidad de los anticuerpos producidos. La capacidad de potenciar la respuesta del IMX fue extensamente evaluada con numerosos antígenos de agentes patógenos, siendo una de las características que presenta dicho adyuvante (Mohan y col., 2013). Cuando se realizaron las relaciones de las subclases de anticuerpo, el grupo TS-IMX generó un aumento en la proporción de la subclase IgG2a con respecto a la IgG1, mientras que el grupo TS

la relación fue inferior a 1. Interesantemente, cuando se analizan las concentraciones de las subclases, no se observaron diferencias significativas en el anticuerpo IgG1 entre los grupo TS-IMX y TS (datos no mostrados), mientras que para la subclase IgG2a la situación es muy diferente. Los títulos de la subclase IgG2a para el grupo TS fue de  $1,7 \pm 1,6 \times 10^5$  mientras que para el grupo TS-IMX los títulos fueron de  $10,1 \pm 3,7 \times 10^6$ , siendo muy superiores al grupo sin adyuvante. Esto estaría indicando que el adyuvante, además de las características mencionadas anteriormente, modificó la funcionalidad de los anticuerpos, aumentando la producción del anticuerpo IgG2a ~60 veces, siendo un anticuerpo con capacidad opsonizante, coherente con el desarrollo de un perfil proinflamatorio, necesario para la eliminación del parásito intracelular. Para saber si se estaba produciendo una respuesta celular específica, a los animales inmunizados se les realizó el test de la hipersensibilidad retardada. De los resultados obtenidos, el grupo TS-IMX presentó valores significativamente superiores a los del grupo PBS ( $P < 0,01$ , TS-IMX vs PBS). Siendo esta diferencia más significativa del grupo TS con respecto al grupo PBS ( $P < 0,05$ , TS vs PBS). Este resultado sumado a la producción de anticuerpos IgG2a, estaría indicando una primera aproximación de la activación de una respuesta celular proinflamatoria tipo Th1. Finalmente, para demostrar el nivel de la protección conferida por la formulación TS-IMX durante la infección, desafiamos a los ratones inmunizados. El nivel de protección del grupo TS-IMX fue el más alto, alcanzando el 100% de supervivencia, además la parasitemia fue muy leve y el peso promedio de los grupos no se vio afectado por la infección. Esta protección del grupo TS-IMX fue incluso mayor que los ratones inmunizados con TS-AF, el cual presentó un nivel de protección del 60%. La protección obtenida con la formulación TS-IMX fue estadísticamente superior al grupo PBS y TS, siendo comparable con los obtenidos en evaluaciones anteriores con este antígeno utilizando el AF o el ODN CpG (Fontanella y col., 2008; Giddings y col., 2010).

Cabe destacar que, en su conjunto, los parámetros inmunológicos evaluados para la formulación TS-IMX son siempre estadísticamente semejantes, con tendencia a ser mejores que los obtenidos mediante el adyuvante de Freund. Dicho adyuvante ha sido ampliamente utilizado para la formulación de inmunógenos por permitir una respuesta celular además de una humoral muy pronunciada. Sin embargo, los efectos adversos que produce no permiten usarlo incluso en vacunas veterinarias. Dados los resultados obtenidos con la formulación TS-AF, que en un trabajo previo habían sido muy prometedores (Fontanella y col., 2008), uno de nuestros objetivos era al menos igualar dicha formulación, pero utilizando un adyuvante que potencialmente pueda ser utilizados en humanos. Por esta razón, creemos que es muy auspicioso haber obtenido niveles

comparables con el adyuvante de Freund utilizando un inmunoestimulante apto para su uso en humanos.

Con los resultados obtenidos con el adyuvante IMX, decidimos extender el estudio de su capacidad adyuvante para lograr una vacuna de subunidades contra *T. cruzi*, y evaluarlo con dos antígenos suplementarios de *T. cruzi*. La intención de esta evaluación suplementaria, radicó en el razonamiento de que una vacuna multicomponente podría garantizar una mayor cobertura de protección contra la infección. En consecuencia, evaluamos por un lado al candidato antigénico seleccionado a partir de la evaluación con AF del capítulo II y por otro lado a la enzima Cruzipaína. La CZ, fue descrita como un antígeno prometedor para el desarrollo de vacunas contra *T. cruzi*. Es una cisteína proteinasa que se encuentra en la superficie del parásito y también se acumula en los lisosomas y está situada cerca de la bolsa flagelar, desde donde se secreta. Recientemente se describió que una forma inactiva de la CZ que estimula específicamente TLR2 y genera la posterior liberación de IL-6 induciendo la respuesta inmune innata (Ponce y col., 2013). En cambio esta estimulación no se observó en CZ activa, lo que se explicó por su capacidad de clivar los receptores STAT3 y evitar la activación de los mismos. Para evitar posibles efectos inmunomoduladores de la enzima, así como efectos tóxicos que pudieran resultar de la actividad enzimática de la misma, decidimos desnaturalizar por calor a la CZ empleada en este trabajo. De la evaluación de la respuesta humoral, se deduce que los tres antígenos aumentaron significativamente las DO cuando se los inmunizó formulado con el IMX ( $P < 0,01$ , TS-IMX, CZ-IMX y Tc3-IMX vs TS, CZ y Tc3 respectivamente), esto es coherente ya que se ha reportado la capacidad que tiene el IMX de poder reducir marcadamente la dosis del inmunógeno (hasta 100 veces), obteniendo de igual manera altos títulos de anticuerpos (DiStefano y col., 2013). Sin embargo, el grupo Tc3 presentó menores DO con y sin adyuvante, comparados con los demás inmunógenos (Figura 9). Los resultados de la DTH marcaron un incremento de la inflamación en todos los grupos inmunizados con el antígeno y el IMX en comparación con el grupo PBS. Esto confirma la capacidad de este adyuvante de generar una respuesta inmune celular específica con distintos antígenos (Sun y col., 2009). Finalmente se desafió con la dosis infectiva y se observó en el caso de los inmunógenos TS y CZ inmunizados con el IMX una notoria disminución de la parasitemia comparadas con los grupos sin adyuvante y un porcentaje de protección del 100 y 80 % para la TS y CZ respectivamente. En dicha evaluación los grupos controles PBS e IMX así como los grupos inmunizados sin adyuvante presentaron una supervivencia del 20 %. En el caso del inmunógeno Tc3, la protección no fue absoluta, presentando dos ratones con elevada parasitemia, derivando en la muerte de los

mismos. Así como en el caso de la evaluación con el AF, se observó que la inmunización con Tc3 siempre genera una población de ratones totalmente vulnerable a la infección. Cuando se evaluó los niveles de anticuerpos de Tc3 ya sea sin adyuvante o con los ayudantes AF e IMX se observó una notoria dispersión de los niveles de anticuerpos presente dentro del mismo grupo. Esto no es el caso de la proteína TS, donde siempre presento altos títulos de anticuerpos en todos los ratones inmunizados.

Con los resultados presentados en estos dos capítulos, concluimos que el mejor prototipo vacunal que protegió contra la infección de *T. cruzi*, es la TS formulada con el adyuvante ISCOMATRIX. Cabe mencionar que en el desarrollo de esta tesis, se evaluó un total de 5 veces la formulación TS-IMX, obteniendo en todos los casos, altos títulos de anticuerpos IgG totales e IgG2a, baja parasitemia y 100 % de protección, incluso utilizando diferentes dosis infectivas de 500, 1000 y 2000 parásitos (datos no mostrados). Para complementar el estudio de los parámetros hasta aquí estudiados, a continuación se evaluó que tipo de respuesta celular se generó en la inmunización, tanto en los estadios agudos como crónicos de la infección. Por otro lado también se ha evaluado como es el daño y la carga parasitaria del tejido cardiaco, siendo la enfermedad de Chagas una patología que afecta principalmente al corazón.

### III.5. CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ El adyuvante IMX resultó adecuado para potenciar la respuesta humoral de las proteínas TS, CZ y Tc3. El mejor resultado se obtuvo para el del grupo TS-IMX en el que obtuvieron títulos de anticuerpos del orden de  $10^6$ , una relación de anticuerpos IgG2a/IgG1 mayor a 1 y se obtuvo un índice de avidéz del 90 %.
- ✓ El adyuvante IMX también permitió estimular una respuesta celular inflamatoria contra los inmunógenos evaluados luego de realizar el test de hipersensibilidad retardada. Particularmente los grupos TS-IMX y CZ-IMX fueron los que más respuesta presentaron.
- ✓ En el modelo murino de inmunización con la proteína TS, el adyuvante IMT no generó un aumento ni de la respuesta humoral, ni de la respuesta celular, comparado con el grupo sin adyuvante.
- ✓ El adyuvante IMX formulado con el inmunógeno TS, generó una mayor protección frente al desafío con *T. cruzi*, comparado con el adyuvante AF y IMT formulado con el mismo antígeno. El grupo TS-IMX obtuvo una baja parasitemia y una supervivencia del 100 % en todos los ensayos evaluados.
- ✓ La evaluación del IMX formulado con las proteínas CZ y Tc3, también generó una mayor protección frente al desafío con *T. cruzi*. Se obtuvo menor parasitemia y mayor supervivencia en los grupos CZ-IMX y Tc3-IMX comparados con los grupos sin adyuvante y el grupo control

**Capítulo IV:**

**Evaluación de la respuesta inmune celular de la formulación Transialidasa-ISCOMATRIX, y del grado de protección que la misma genera en el estadio agudo y crónico de la infección con *T. cruzi***

## IV.1. INTRODUCCIÓN

### IV.1.1. El Inmunógeno Transialidasa

La capacidad de *T. cruzi* para sobrevivir en el huésped mamífero es en parte debido a la presencia de numerosas proteínas de membrana. De hecho, una característica notable del genoma de este parásito es la enorme cantidad de genes polimórficos que codifican proteínas de la superficie. Estas numerosas proteínas de superficie forman grandes familias en las que se encuentran las mucinas y las proteínas de superficie asociada a la mucinas (MASP), así como la superfamilia de la transialidasa (STS) (Freitas y col., 2011). La STS es la familia que más genes presenta en el genoma de *T. cruzi*, con más de 1.400 genes. Recientemente, un nuevo análisis realizado por Freitas y col., clasificaron a esta superfamilia en 8 grupos sobre la base de su secuencia aminoacídica, propiedades funcionales y similitud (Freitas y col., 2011). En esta clasificación, el grupo I contiene a la transialidasa activa que presentan la región catalítica y la región repetitiva SAPA. Esta enzima es una sialidasa modificada que se encuentra anclada en la membrana celular del parásito. En lugar de hidrolizar el ácido siálico, la TS transfiere residuos sialil de proteínas del huésped, que contienen dichos residuos, a las proteínas mucinas de la superficie celular de *T. cruzi* (Mucci y col., 2006). El *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico de novo, sin embargo este azúcar es encontrado en muchas proteínas del parásito implicadas en varios aspectos claves de la interacción del *T. cruzi* con el huésped. La rápida sialidación confiere una capa con carga negativa que protege los tripomastigotes extracelulares de ser eliminados por los anticuerpos anti-galactosidos humanos (Freitas y col., 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, numerosos trabajos han utilizado a la enzima TS como inmunógeno vacunal, siendo considerada como uno de los candidatos principales para la vacuna con *T. cruzi* (revisado por Vázquez-Chagoyán y col., 2011). Dichos trabajos utilizan la forma activa de esta enzima. Se ha reportado que, debido a su capacidad catalítica, la TS activa es capaz de generar daños desfavorables al organismos, como: activar receptores neuronales (Woronowicz

y col., 2004), inducir apoptosis en las células del timo (Mucci y col., 2002, 2005) e incluso, inducir un acelerada eliminación de las plaquetas y eritrocitos, dando lugar a trombocitopenia y anemia, como se observa durante la enfermedad de Chagas aguda (Marcondes y col., 2000; Tribulatti y col., 2005). Estas patologías generan importantes desórdenes inmunes, hepatotoxicidad y alteraciones en el miocardio y el bazo (Risso y col., 2007). Además, como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que el extremo inmunodominante SAPA, actuaría como señuelo para el sistema inmune, reduciendo el éxito de la respuesta de los anticuerpos al sitio catalítico de la enzima.(Buscaglia y col., 1999; Frascch y col., 1994).

Para superar todas estas limitaciones el Inflammation Research Center y el Department of Biochemistry and Microbiology de la universidad de Gent Bélgica, diseñaron una TS mutante el cual presenta el dominio catalítico enzimáticamente inactivo y también carece de la región repetitiva SAPA (Laroy y Contreras, 2000). Esta proteína se ha expresado en levadura *Pichia pastoris*, la cual es expresada con una alta glicosilación con manosas, similar a la que presenta la proteína nativa. Este antígeno fue previamente evaluado en un modelo de infección con el adyuvante completo de Freund, obteniendo resultados muy prometedores (Fontanella y col., 2008).

Posteriormente a dicho trabajo, el mismo grupo que produjo a la TS inactiva, rediseño los procedimientos de obtención y purificación de la proteína. Primero se expresó la TS en la cepa *P. pastoris* GlycoSwitchM5, que reduce la heterogeneidad N-glicosilación en comparación con la cepa GS115, utilizada para la expresión de la TS anteriormente en Fontanella y col (Fontanella y col., 2008). Además, la TS se transformó en un plásmido que elimina el Taq his4 y al mismo tiempo, se introdujo un cassette de expresión inducible por metanol que sobreexpresa la proteína. En segundo lugar, para evitar la degradación proteolítica del antígeno, durante la precipitación de sulfato de amonio, se introdujo un proceso downstream basado en la cromatografía de intercambio iónico que elimina contaminantes mediante una Sefarosa DEAE seguido por una diafiltración y dos pasos de alta resolución de purificación iónica. Usando este protocolo, se obtuvieron típicamente de 15-20 mg de TS por litro de medio de cultivo (Bontempi y col., 2015). Esta optimización permitió que los procesamientos estándar downstream (DSP) sean compatible con los que se utiliza en la fabricación biofarmacéutica industrial.

### IV.1.2. El adyuvante ISCOMATRIX

El adyuvante seleccionado en la formulación final de nuestra vacuna es el inmunocomplejo ISCOMATRIX, un adyuvante capaz de producir una respuesta equilibrada humoral/celular mediante la inducción de múltiples mediadores de la respuesta innata y adaptativa (revisado en Sun y col., 2009). Formulaciones basadas en IMX pueden activar fácilmente células presentadoras de antígeno, uno de los mecanismos de acción propuesto para estas partículas es que debido a su estructura tipo jaula, los antígenos quedan atrapados en la partícula y son más fácilmente presentados a las células fagocíticas. Además, la saponina presente en el ISCOMATRIX media la activación del receptor de manosa DEC-205 presente en la superficie de DC, favoreciendo la endocitosis (Reed y col., 2009). Si bien se desconoce la vía de activación de este adyuvante, estudios con ratones deficiente en los diferentes receptores tipo Toll, respondieron normalmente frente a la estimulación con este adyuvante, demostrando la independencia de estos receptores de membrana en el reconocimiento del IMX (Wilson y col., 2012). El único dato concreto en dicho estudio fue la dependencia absoluta de la vía de activación mediada por las moléculas MyD88. Ratones deficiente a dicha moléculas presentaron ausencia de estimulación cuando fueron inmunizados con el adyuvante IMX (Wilson y col., 2012). Informes recientes describen que el IMX activa al inflammasoma NALP3/ASC/Caspasa1 de las células presentadoras de antígenos, produciendo IL-1 $\beta$  y IL-18. (Wilson y col., 2014). Finalmente, vacunas formuladas con IMX, han demostrado ser seguras, bien toleradas y altamente inmunogénica en seres humanos (Drane y col., 2007).

### IV.1.3. Desarrollo de este capítulo

En el capítulo III se evaluó la formación TS-IMX, tanto en la respuesta humoral como el grado de protección frente al desafío. Se obtuvo, en todos los parámetros medidos, signos de importante protección en el grupo inmunizado con dicha formulación, siendo el perfil humoral obtenido compatible con una respuesta proinflamatoria/reguladora balanceada. En este capítulo hemos evaluado la respuesta celular luego de la inmunización con TS-IMX, para definir a nivel celular qué tipo de respuesta inmunológica se genera luego de la inmunización. Además de evaluar el tipo de respuesta que despierta la inmunización, nos planteamos evaluar durante la infección la producción de citoquinas proinflamatorias y regulatorias. Esto se realizó tanto para el estadio agudo como crónico de la infección en animales vacunados comparado con los animales

no vacunados. Un análisis complementario importante fue la evaluación del grado de protección en el tejido cardíaco, generado por la inmunización, en los estadios agudos y crónicos de la infección con *T. cruzi*.

## IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.2.1. Antígeno y adyuvante empleado

En este capítulo se utilizó la enzima Transialidasa activa e inactiva dependiendo de la determinación empleada. Las mismas fueron gentilmente cedida por el Department of Biochemistry and Microbiology de la universidad de Gent, Bélgica, como se mencionó en el capítulo II. Como adyuvante de utilizo el ISCOMATRIX (Isconova AB), cedido gentilmente por el Dr. Bror Morein.

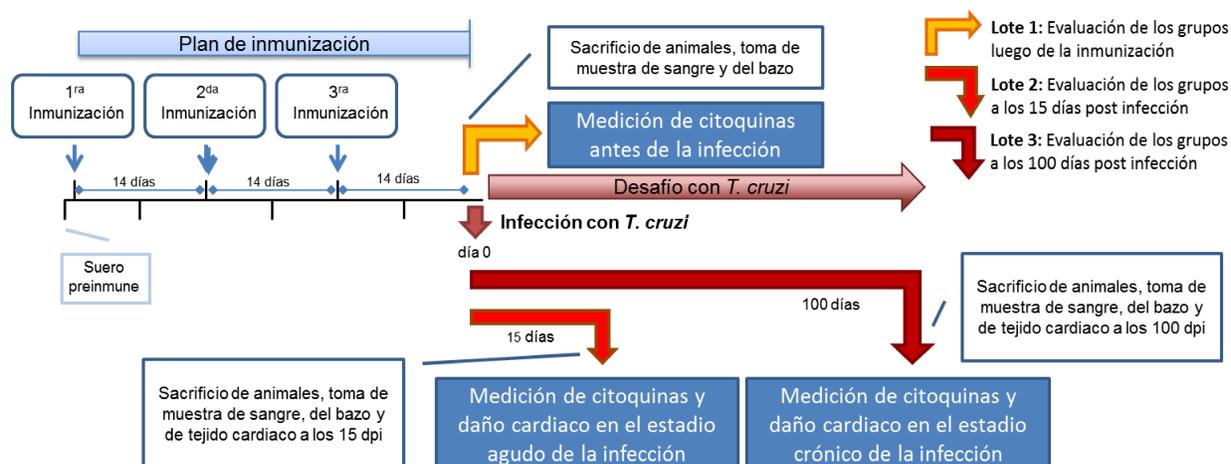
### IV.2.2. Cepa de ratones y parásitos de *T. cruzi*

Como se mencionó en el capítulo II, se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, para las evaluaciones relacionados con la inmunización y el desafío con *T. cruzi*. Se utilizó la cepa de parasito de *T. cruzi* Tulahuen clon 2. Para el mantenimiento de los parásitos en el estadio infectivo, correspondiente a trypomastigote, se utilizó la cepa de ratones Cf1 de tres semanas de edad.

### IV.2.3. Plan de inoculación

Grupos de ratones Balb/c (n=5/grupo) se les realizó el mismo protocolo de inmunización que el capítulo 2 y 3. Para realizar todas las determinaciones se realizaron tres lotes de inmunizaciones conteniendo los siguientes grupos: TS-IMX, TS, IMX y PBS. Catorce días luego de la última inmunización, el lote 1 fue sacrificado bajo anestesia y se le extrajo el bazo para la determinación de citoquinas *ex vivo* en esplenocitos. Los otros dos lotes fueron infectados por vía intraperitoneal con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen. En este caso, se adicionó un nuevo grupo control a cada lote sin infectar (ratones no inmunizados ni infectado; ni-PBS). A los 15 días post infección, el lote 2 de ratones fue sacrificado bajo anestesia, se le extrajo el bazo para la determinación de citoquinas y el corazón para medir del daño cardiaco mediante cortes

histológicos y para evaluar la carga parasitaria. Finalmente, luego de 100 días post infección, los ratones que sobrevivieron del lote 3 fueron sacrificados bajo anestesia. Nuevamente se les extrajo el bazo y el corazón para medición de los mismos parámetros mencionados a los 15 días post infección (Figura 27).



**Figura 27: Plan de inmunización de tres lotes de ratones.** El 1er lote fue sacrificado luego de 14 días de la última inmunización, el segundo y tercer lote fueron infectados con 1000 parásitos de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen clon 2. A los 15 dpi el lote dos fue sacrificado y el tercero a los 100 dpi.

#### IV.2.4. Medición de citoquinas mediante sobrenadante de cultivo

A los animales de cada grupo de los tres lotes mencionados en la sección II.3, se anestesiaron con ketamina/Xilacina en una dosis 100 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente. Se les realizó el sangrado mediante punción cardíaca e inmediatamente los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Luego se les extrajo el bazo asépticamente, se homogeneizaron con un mortero Potter-Elvehjem y los glóbulos rojos se lisaron mediante la adición de buffer de lisis (Sigma Aldrich). Luego de tres lavados con solución PBS, los esplenocitos se volvieron a resuspender en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% SFB, 2% de penicilina (100 mg/ml), estreptomomicina (100 U/ml) y 0,4 mM 2-mercaptoetanol. Se cultivaron  $1 \times 10^6$  células/ml/pocillo de esplenocitos en placas de 48 pocillos (Nunc) en RPMI completo. Se realizaron por duplicado haciendo tres tratamientos diferentes: sin estímulo, estimulando con TS activa (10 mg/mL) o con Concanavalina A (2,5 µg/ml) como control positivo de la estimulación. Luego de 72 h de estimulación se determinó en el sobrenadante de cultivo, Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), Interlequina 10 (IL-10) e IL-4 mediante ELISA de captura de acuerdo con las instrucciones del

fabricante (BD Biosciences). Los límites de detección fueron de 10 pg/ml para IFN- $\gamma$  e IL-10 y 1 pg/ml para IL-4.

#### **IV.2.5. Marcación de células T CD4+ y CD8+ e IFN- $\gamma$ intracelular mediante citometría**

Para la detección de IFN- $\gamma$ , se realizó una estimulación ex vivo a los esplenocitos de los ratones de los grupos inmunizados y del grupo control, lo cuales fueron cultivados en medio RPMI 1640 completo (Gibco) ( $1 \times 10^6$  células/ml) en placa de 48 pocillos y se estimularon con la TS activa (10  $\mu$ g/ml) durante 24 horas. Posteriormente, las células se incubaron con 1 mg/ml de 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma Aldrich), 0,5 mg/ml de ionomicina (Sigma Aldrich) y brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 4 h, las células se lavaron dos veces con PBS, se incubaron con anticuerpo anti-receptor de Fc $\gamma$ III/II durante 30 min y se tiñeron con anti-CD8-APC-Cy7 y anti-CD4 FITC durante 30 min. Luego, las células se lavaron y se resuspendieron en solución de fijación/permeabilización (eBiosciences) durante 1 h, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se tiñeron con PE-Cy7-conjugado anti-IFN- $\gamma$  Ab (eBiosciences) en buffer de permeabilización. La adquisición celular se realizó en el citómetro de flujo FACS ARIA II (BD, Biosciences) y el software utilizado fue el FACSDiVa (BD Biosciences). Los datos fueron analizados mediante el software FlowJo 9.4.4 (TreeStar).

#### **IV.2.6. Medición de daño cardíaco**

Se evaluaron las características histológicas del corazón de los ratones inmunizados e infectados durante 15 y 100 días. Dichos ratones se sacrificaron anestesiados previamente como se mencionó anteriormente. Inmediatamente después se les extrajo el corazón quirúrgicamente y se les realizó tres lavados de 5 minutos con PBS. Luego los corazones fueron cortados a la mitad sagitalmente. Una parte se la empleó para el análisis histológico y la segunda parte para la cuantificación de la carga parasitaria.

##### **IV.2.6.1 Obtención de preparados histológicos de corazón**

Para la impregnación de los corazones en parafina, se les realizó el tratamiento de fijación, deshidratación, aclaramiento, impregnación e inclusión.

- **Fijación:** Los corazones fueron tratados por 6 hs a temperatura ambiente mediante inmersión directa con la solución fijadora (Tabla 10) en un volumen veinte veces el volumen del tejido, seguido de dos lavados de 10 minutos cada uno en buffer fosfato.
- **Deshidratación:** La deshidratación se realizó por pasajes sucesivos del tejido en soluciones de etanol de concentraciones crecientes (Tabla 10).

**Tabla 10: soluciones utilizadas en el proceso de fijación y deshidratación.** DTN: durante toda la noche

Etapa	Reactivo	Tiempo
Fijación	Formalina 10% v/v	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,65% p/p	6 horas
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4% p/p	
Deshidratación	Alcohol 70 %	DTN
	Alcohol 96% (1)	1 hora
	Alcohol 96% (2)	2 horas
	Alcohol 100% (1)	1 hora
	Alcohol 100% (2)	1 hora
	Alcohol 100% (3)	DTN

- **Aclaramiento o diafanización:** Finalizada la deshidratación se procedió a aclarar los tejidos por aumento de su índice de refracción, para lo cual los mismos fueron tratados con xilol (Merk). Se hicieron tres pasajes de 30 minutos cada uno en tres soluciones de xilol.
- **Impregnación e inclusión:** La muestras fueron tratada con parafina a 60°C. Se realizaron tres pasajes en parafina a 60 °C el primero se dejó toda la noche, y los otros dos pasajes de una hora cada uno. Luego se procedió a la inclusión de los tejidos en un recipiente conteniendo parafina fundida y se dejó solidificar a temperatura ambiente, formándose de esta manera el taco de parafina conteniendo en su interior el tejido.
- **Corte y montaje:** Los tacos se cortaron con un micrótopo rotatorio manual (Leica Biosystem) y los cortes de 5 micras fueron colocados sobre portaobjetos tratados previamente con Silano al 0,5%, y se dejaron secar a 37 °C durante 24 hs.

### IV.2.6.2. Coloración de los cortes histológicos

Para la determinación de la miocarditis y presencia de nidos de amastigotes e infiltrados celular, a los cortes histológicos provenientes de los ratones infectados por 15 y 100 días, se les realizó la técnica de Hematoxilina de Harrys-Eosina (H&E,Tabla 11).

Tabla 11: Coloración con Hematoxilina de Harrys- Eosina

Coloración de preparados histológicos		
Etapa	Reactivo	Tiempo de residencia
<b>Desparafinización</b>	Xilol 1, 2 y 3	5, 2 y 1 minutos
<b>Hidratación</b>	Alcohol 100 %	1 minuto
	Alcohol 96%	1minuto
	Alcohol 70%	1 minuto
<b>Lavado</b>	Agua corriente	2 minutos
<b>1 Coloración</b>	Hematoxilina de Mayer	30 segundos
<b>Lavado</b>	Agua corriente	2 minutos
<b>2 Coloración</b>	Eosina	1 minuto
<b>Lavado</b>	Agua corriente	1 minutos
<b>Deshidratación</b>	Alcohol 70%	1 minuto
	Alcohol 96%	1minuto
	Alcohol 100 %	1 minuto
<b>Clarificación</b>	Xilol 1 /Xilol 2	2 / 5 minuto

### IV.2.6.3. Cálculo del daño histológico

Para el cálculo del daño histológico, se realizaron dos procedimientos de acuerdo a los estadios de la infección. Un patólogo experimentado, cegado a los grupos experimentales, examinó todas las secciones. Se analizaron diez campos microscópicos en diez secciones de cada órgano. Para el estadio agudo (15 dpi), el daño histológico se evaluó de acuerdo a la intensidad de la respuesta inflamatoria y a la presencia de nidos de amastigotes, el cálculo de la miocarditis se realizó mediante la evaluación de los cortes teñidos con H&E, clasificándolos de la siguiente manera:

- Nula: Ausencia de células o focos inflamatorios.
- Leve: Leve infiltración, con daño de uno o dos fibras miocárdicas.
- Moderada: Infiltrados agregados comprometiendo de tres a cinco fibras musculares.

Presencia de nidos de amastigotes

- Severa: Intensos focos: gran acumulación de células mononucleares con destrucción de más de cinco fibras musculares. Presencia de nidos de amastigotes

La Tabla 12 cuantifica los niveles de lesión para poder calcular la puntuación de miocarditis de cada grupo evaluado.

**Tabla 12: Valores numéricos asociados a los diferentes tipos de lesión**

Nivel de lesión	Valores
Nula	0
Leve	1
Moderada	2
Severa	3
Severa y Moderada	4

Para el análisis de los cortes histológicos en el estadio crónico (100 dpi), se adicionó la tinción rojo Picosirius (R. Picosirius), la cual permite visualizar las zonas con intensa fibrosis y realizar una mejor cuantificación del daño. Esta tinción, marca en verde claro el citoplasma y con rojo las fibras de colágenos. Para esta técnica la puntuación se clasificó de la siguiente forma:

- Nula: Tejido normal.
- Leve: Ligera fibrosis, comprometiendo uno o dos fibras miocárdicas.
- Moderado: fibrosis moderada comprometiendo de tres a cinco fibras musculares.
- Severa: gran acumulación de fibrosis con la destrucción de más de cinco fibras musculares.

Lo valores según el nivel de fibrosis se mencionan en la Tabla 13. Finalmente la puntuación de miocarditis crónica se realizó de la siguiente manera: [puntuación de H&E] x [puntuación de R. Picosirius].

Tabla 13: Valores numéricos asociados a los diferentes tipos de fibrosis

Nivel de lesión	Valores
Nula	0
Leve	1
Moderada	2
Severa	3

#### IV.2.7. Carga parasitaria en tejido cardíaco mediante PCR en tiempo real

Para determinar la carga de parásitos en corazón, se utilizó la porción remanente de los corazones de los grupos inmunizados e infectados respectivamente a los 15 y 100 días con *T. cruzi*. La metodología y optimización se realizó como se menciona en Cummuing y col. (Cummings y col., 2003)

##### IV.2.7.1 Purificación del ADN

Los corazones recogidos de los ratones infectados fueron colocados en cinco volúmenes de buffer de lisis (Tabla 14) y se dejaron toda la noche a 55 °C. El ADN se extrajo con solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y se precipitó con dos volúmenes etanol frío. Las muestras se colocaron a -80 °C durante 2 hs, luego se centrifugaron durante 30 min a 13.000 rpm y se lavaron con etanol al 70%, se secaron y se resuspendieron en agua estéril mlQ.

Tabla 14: Buffer de lisis

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

### IV.2.7.2 Generación de los estándares de PCR

Para realizar el estándar de la curva de cuantificación de *T. cruzi* para las reacciones de PCR, se procedió de la siguiente manera: 500 mg de tejido de corazones de ratones sin infectar, se les añadieron  $1 \times 10^7$  epimastigotes de *T. cruzi*. La muestra fue tratada con buffer de lisis y se extrajo el ADN como se describió anteriormente. Luego se cuantificó por dos métodos diferentes; mediante fluorometría con el Qubit® Fluorometric Quantitation (Life technologies) y espectrofotometría con el NanoDrop Lite Spectrophotometers (Thermo scientific). La masa total de ADN se la consideró como ADN total con  $1 \times 10^7$  parásitos equivalentes. Para generar la curva, el ADN se diluyó hasta 1.000 parásitos equivalentes por 50 ng de ADN total, para la cual se utilizó ADN de corazones de ratones sin infectar como diluyente, como se describe en Cummings y col. (Cummings y col., 2003). Se realizaron diluciones de 1:10, las cuales oscilaron desde 1000 a 0,1 parásitos equivalentes. Para realizar el estándar de la curva de cuantificación de ADN murino para las reacciones de PCR, se purificó y cuantificó ADN de corazones de ratones no infectados, como se describió anteriormente, y se realizaron diluciones 1:5, las cuales oscilaron desde 300 ng hasta 0,48 ng.

### IV.2.7.3. PCR cuantitativa en tiempo real

Para la amplificación específica del ADN de *T. cruzi*, se utilizaron los oligonucleótidos TCZ, descrito por Moser y col. (Moser y col., 1989), los cuales amplifican una región de ADN satélite con repeticiones en tándem de 195 pares de bases.

Cada reacción de PCR contenía:

- 50 ng de ADN genómico
- 0,5  $\mu$ M del oligonucleótido TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3', donde M=AoC (Invitrogen)
- 0,5  $\mu$ M del oligonucleótido TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' (Invitrogen)
- Mezcla de PCR utilizando SYBR Green Supermix (Solis BioDyne)
- Agua de calidad para PCR hasta un volumen total final de 10  $\mu$ l

Para la determinación de ADN murino, se amplificó una región del gen de la citoquina TNF- $\alpha$ . Cada reacción de PCR contenía:

- 50 ng de ADN genómico

- 0,5 µM del oligonucleótido TNF-F 5'-TCCCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' (Invitrogen)
- 0,5 µM del oligonucleótido TNF-R5'- CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3' (Invitrogen)
- Mezcla de PCR utilizando SYBR Green Supermix (Solis BioDyne)
- Agua de calidad para PCR hasta un volumen total final de 10 µl

Las mezclas de reacción se cargaron en termociclador StepOne™ (Applied Biosystems). El programa del ciclado tiene tres fases; desnaturalización, amplificación, melting. La Tabla 15 describe los pasos de cada fase. Los datos de fluorescencia fueron adquiridos a los 81°C y fueron analizados con el software StepOne 2.1.

Tabla 15: Programa de ciclado

Fases	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	15 min	1
<b>Amplificación</b>	95 °C	20 s	50
	55 °C	20 s	
	72 °C	15 s	
	81 °C	10 s	
<b>Melting</b>	95 °C	0 s	1
	60 °C	30 s	
	95 °C	0 s	

Cada ejecución del termociclador StepOne™ contenía dos curvas de cuantificación, con dos controles negativos para cada curva. Controles negativos para PCR con oligonucleótidos específicos para *T. cruzi* específica consistía en una reacción sin ADN y una reacción con 50 µm de ADN murino sin *T. cruzi*. Los controles para PCR con oligonucleótidos específicos murino consistieron en una reacción sin ADN y una reacción con ADN de *T. cruzi*. Cada muestra de ADN se cuantificó por triplicado. Tanto la cantidad de parásitos equivalentes, como la cantidad de ADN murino en cada muestra se promedió y la carga parasitaria se corrigió, llevando a 50 ng de ADN murino. Se calcularon las eficiencias de ambas curvas en cada reacción, siendo mayores a 96% en todos los casos. La eficiencia de la amplificación se determinó utilizando el siguiente cálculo:

- Eficiencia ( $E$ ) =  $10^{(-1/\text{pendiente})}$

#### **IV.2.8. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar diferencias entre todos los grupos evaluados, seguido la prueba de Mann-Whitney U-test para las comparaciones entre dos grupos. La diferencias significativas se indica con (\*) cuando  $P < 0.05$ , (\*\*) cuando  $P < 0,01$  y (\*\*\*) cuando  $P < 0,001$  en comparación entre los grupos señalados.

Para las evaluaciones de la supervivencia, se utilizó la prueba de Mantel-Cox en las curvas de supervivencia.

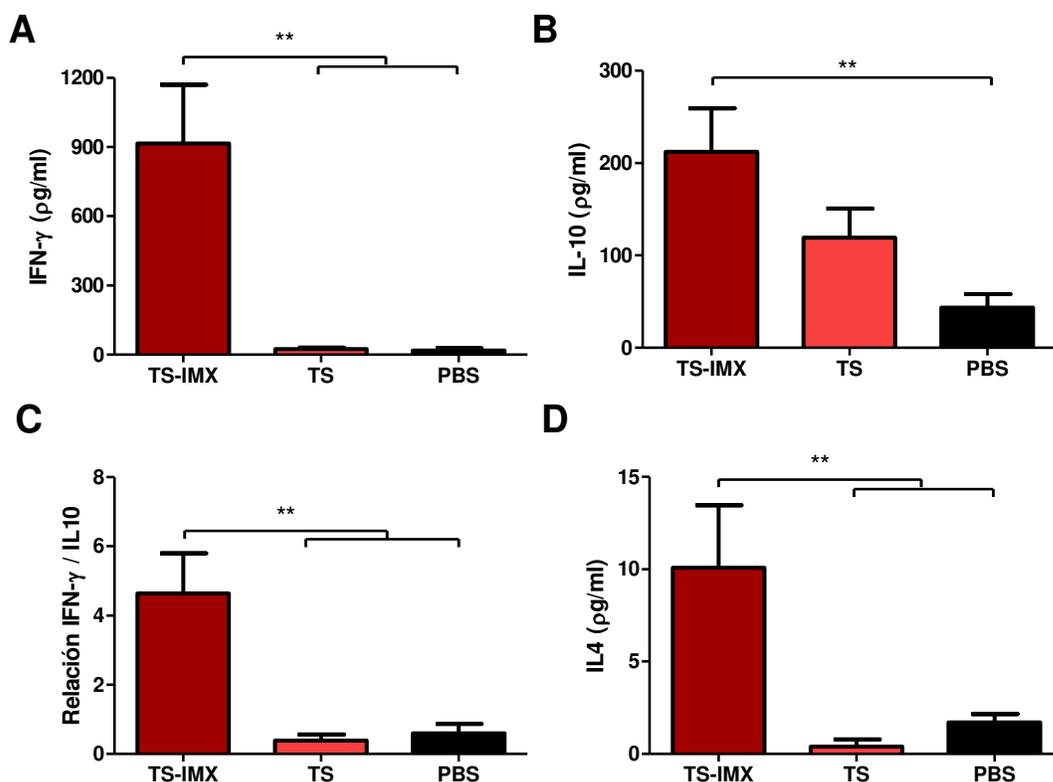
Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad 4.0 (GraphPad).

## IV.3. RESULTADOS

### IV.3.1. Evaluación de la respuesta celular luego de la inmunización

#### IV.3.1.1. Citoquinas de sobrenadante de cultivo

En el capítulo III se observó que los ratones inmunizados con TS-IMX presentaban, en el test de hipersensibilidad retardada, una inflamación mayor que en el grupo TS o PBS (Figura 19 y Figura 24; Capítulo III). Para caracterizar la respuesta celular que provoca la inmunización con TS-IMX, esplenocitos obtenidos 14 días después de la última inmunización se cultivaron en presencia del antígeno TS para evaluar el IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (Figura 28). Los esplenocitos cultivados a partir de ratones inmunizados con TS-IMX produjeron un aumento de los niveles de IFN- $\gamma$  en comparación con esplenocitos de ratones inmunizados con TS y PBS (Figura 28A,  $P < 0,01$ ). Con respecto a la IL-10, los ratones inmunizados con TS-IMX produjeron niveles elevados de esta citoquina en comparación con el grupo PBS (Figura 28B,  $P < 0,01$ ), el grupo TS también produjo concentraciones notables de IL-10. Como resultado se observó un aumento en la relación IFN- $\gamma$ /IL-10 en el grupo TS-IMX en comparación con el grupo TS de 4,64 vs 0,39 veces respectivamente (Figura 28C,  $P < 0,01$ ). Se detectaron niveles bajos de la IL-4 aunque si fueron superiores en el grupo TS-IMX con respecto al grupo TS y PBS (Figura 28D,  $P < 0,01$ ).

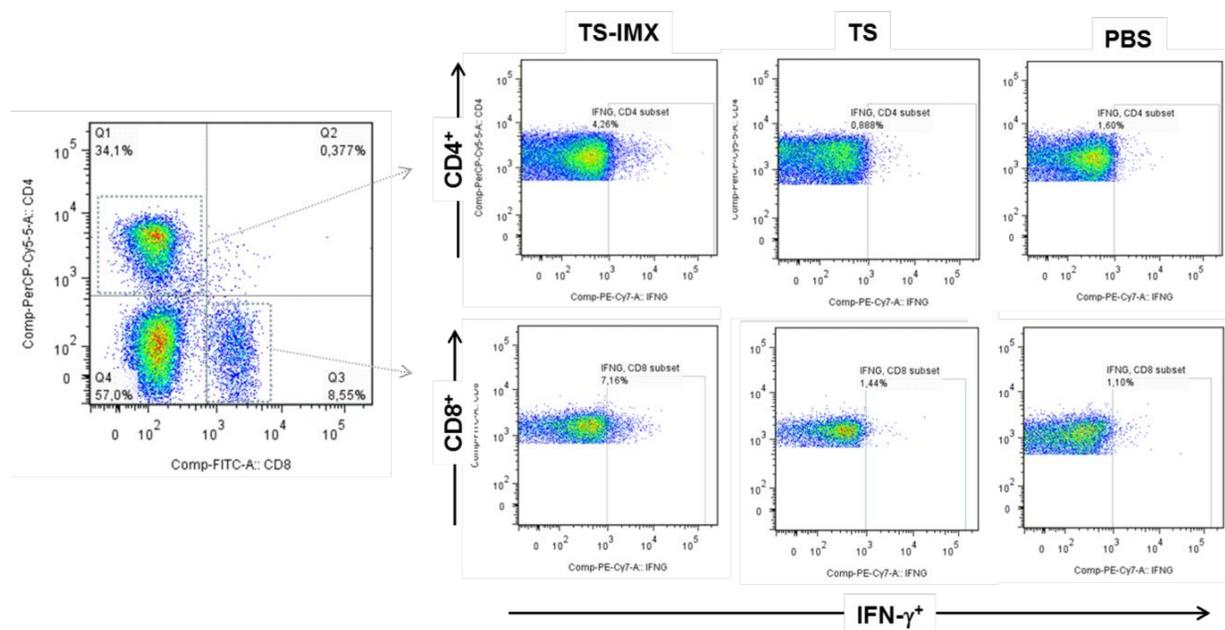


**Figura 28: Evaluación de la respuesta celular luego de la inmunización.** Los esplenocitos se cultivaron por triplicado durante 72 h en presencia de TS. **(A)** Determinación de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo. **(B)** Determinación de IL-10 en el sobrenadante de cultivo. **(C)** Relación entre IFN- $\gamma$ /IL-10 y **(D)** Determinación de IL-4 en el sobrenadante de cultivo. Las citoquinas se midieron mediante ELISA de captura. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01).

#### IV.3.1.2. Células T y producción de IFN- $\gamma$ intracelular

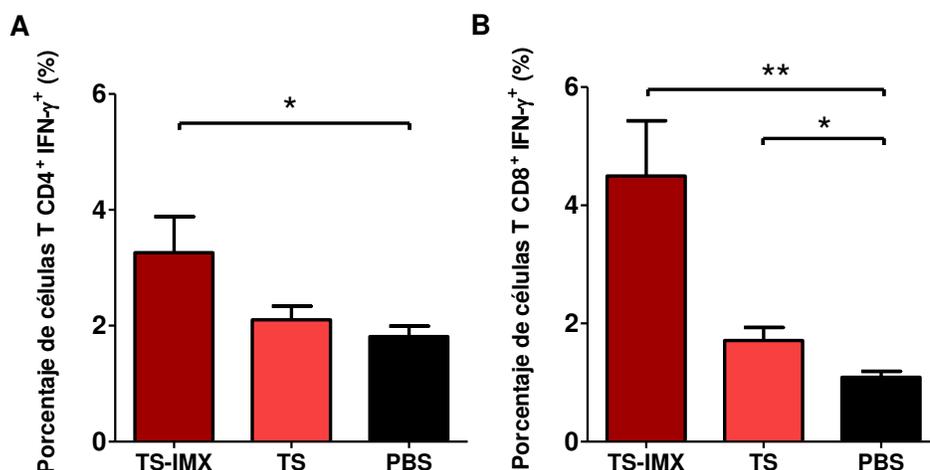
Una respuesta inmunológica mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 y linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos es crucial para lograr protección inmune contra *T. cruzi*. La expresión de IFN- $\gamma$  en la población linfocitaria es un fiel indicador para valorar este tipo de respuesta. Para determinar si la formulación de TS-IMX favorece activación de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> específicas para TS, analizamos si la misma podría aumentar la producción intracelular de IFN- $\gamma$  cuando se estimula a linfocitos T con TS en comparación con los grupos inmunizado solo con la TS o con PBS. Los esplenocitos de los ratones inmunizados se obtuvieron 14 días después de la última inmunización. La presencia de células productoras de IFN- $\gamma$  en las células del bazo de ratones inmunizados se determinó después de la re-estimulación ex vivo con TS. En la Figura 29 se observan los datos arrojados por el software FlowJo 9.4.4. Luego de una primera selección de la región de los

linfocitos, se obtuvo una gráfica que muestra en el eje de abscisas las células  $CD4^+$  y en el eje de ordenadas las células  $CD8^+$  (Figura 29, izquierda). De ahí se seleccionaron dos regiones correspondientes a las células  $CD4^+CD8^-$  y las  $CD4^-CD8^+$  respectivamente y se las evaluó para cada grupo la producción de  $IFN-\gamma$  (Figura 29, derecha).



**Figura 29: Evaluación de las poblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  que expresan el  $IFN-\gamma$  luego de la inmunización.** Gráficos de dot plots de los esplenocitos de los grupos inmunizados con TS-IMX, TS y PBS luego de ser estimulados durante 24 h ex vivo con TS para evaluar la producción intracelular del  $IFN-\gamma$ . A la izquierda se ilustra la distribución de la población de linfocitos capturadas por el citómetro de flujo FACS ARIA II luego de procesar una muestra. Los gráficos de la izquierda discriminan las poblaciones de linfocitos  $CD4^+$  (arriba) y  $CD8^+$  (abajo), para un ratón de cada grupo TS-IMX, TS, PBS. Cada gráfico indica que población de células expresa  $IFN-\gamma$  intracelular.

Se graficaron los datos de las poblaciones de células  $CD4^+$  y  $CD8^+$  que expresan  $IFN-\gamma$  después de la reestimulación con TS (Figura 30). La frecuencia de linfocitos T  $CD4^+$  que expresan  $IFN-\gamma$  fue mayor en el grupo de ratones inoculados con TS-IMX en comparación con los grupo PBS (Figura 30A,  $P < 0,05$ ), mientras que el grupo TS no generó una producción  $IFN-\gamma$  diferente al grupo PBS. En el caso de las linfocitos T  $CD8^+$ , fue sustancialmente mayor la proporción de células productoras  $IFN-\gamma$  que en los ratones inmunizados con PBS ( $P < 0,01$ ; Figura 30B), a su vez el grupo TS mostró diferencias en la producción de  $IFN-\gamma$  con respecto al grupo PBS, aunque en menor proporción que el grupo TS-IMX ( $P < 0,05$ ; Figura 30B).



**Figura 30: Evaluación de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que expresan el IFN-γ (A).** Porcentaje de células que expresan IFN-γ entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, luego de la estimulación *ex vivo* con TS. **(B)** Porcentaje de células que expresan IFN-γ entre los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, luego de la estimulación *ex vivo* con TS. (n = 4-5 / grupo). \* P <0,05, \*\* P <0,01.

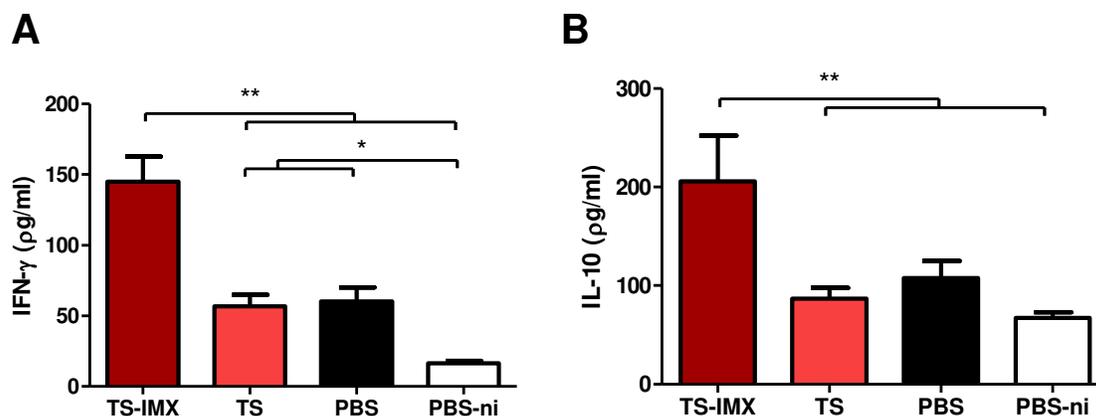
### IV.3.2. Evaluación de los grupos inmunizados durante la infección aguda con *T. cruzi*

En el capítulo tres se evaluó la parasitemia y supervivencia de los grupos TS-IMX, TS y PBS entre otros. Como se observó anteriormente, el grupo TS-IMX generó una parasitemia muy inferior al grupo TS y PBS, lo que se debería reflejar en un menor daño cardíaco y carga parasitaria en tejido durante ese estadio. En esta sección, en grupos inmunizados y que cursaron una infección por *T. cruzi* durante 15 días, evaluamos no solo el daño cardíaco y carga parasitaria, sino también el tipo de respuesta celular.

#### IV.3.2.1 Evaluación de la respuesta celular en el estadio agudo de la infección

Luego del cultivo y estimulación *ex vivo* con TS, los esplenocitos de ratones inmunizados con TS-IMX e infectados con *T. cruzi*, produjeron mayores niveles de IFN-γ con respecto a los grupos TS, PBS y PBS-ni (no infectado), (P<0,01; Figura 31A). A su vez, esta estimulación *in vitro* generó en los grupos TS y PBS diferencias en la producción de IFN-γ con respecto al grupo PBS ni (P<0,05; Figura 31A). En el caso de la IL-10, la producción fue superior en el grupo TS-IMX con respecto a los grupos TS, PBS y PBS-ni luego de la estimulación con TS (P <0,01; Figura 31B). En contraposición con el mismo análisis para los ratones inmunizados pero no infectados, cuando se

compararon las relaciones IFN- $\gamma$ /IL-10 en los distintos grupos, los valores fueron similares. Los niveles de IL-4 mostraron valores muy bajos, no presentando diferencias entre los distintos grupos (datos no presentados).



**Figura 31: Evaluación de la respuesta celular de los grupos inmunizados durante la infección aguda con *T. cruzi*.** Respuesta inmune celular en ratones inmunizados e infectados durante 15 días. Los esplenocitos se cultivaron por triplicado durante 72 h en presencia de TS. (A) Determinación de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo. (B) Determinación de IL-10 en el sobrenadante de cultivo. Las citoquinas se cuantificaron mediante ELISA de captura. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01.

#### IV.3.2.2. Evaluación del daño cardíaco en el estadio agudo de la infección

Para analizar si la inmunización con TS-IMX evita o aminora el daño tisular causado por *T. cruzi*, la miocarditis se evaluó en los corazones de los ratones a los 15 días (Figura 32).

En la Figura 32 se observan cortes histológicos de los grupos infectados en el estadio agudo, teñidos con hematoxilina y eosina, en 200x y 400x. En el grupo TS-IMX se observaron sólo dos nidos de parásitos en los cortes histológicos, mientras que en TS y PBS se observaron entre cuatro y seis nidos respectivamente.

A pesar de que el análisis histológico reveló infiltración inflamatoria y presencia de nidos de amastigotes en todos los grupos infectados, los ratones TS-IMX y TS presentaron significativamente menos focos inflamatorios comparados con el grupo PBS infectado (P < 0,01; Figura 33).

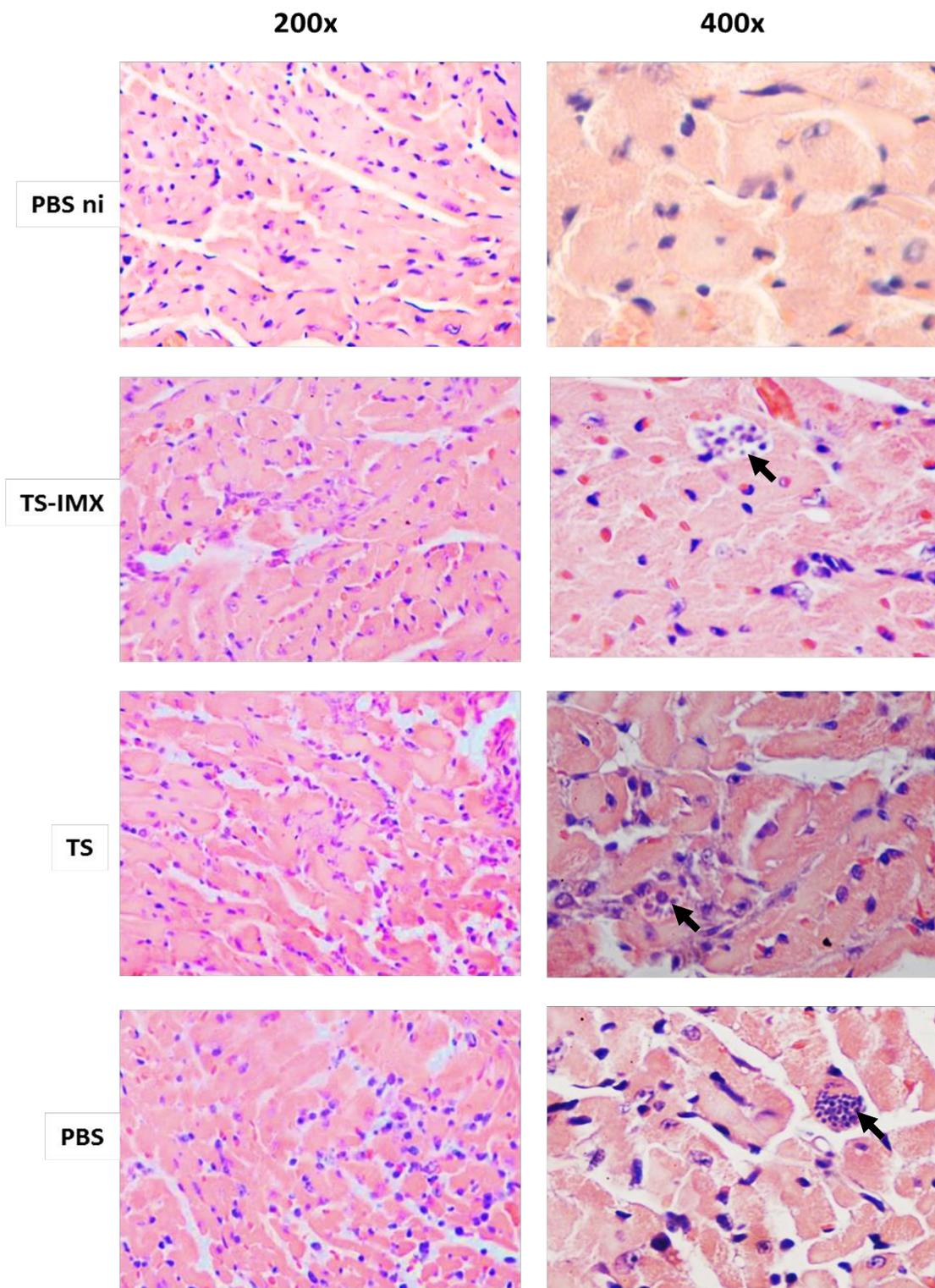
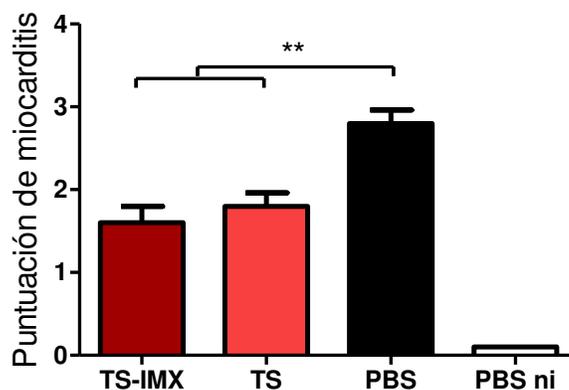


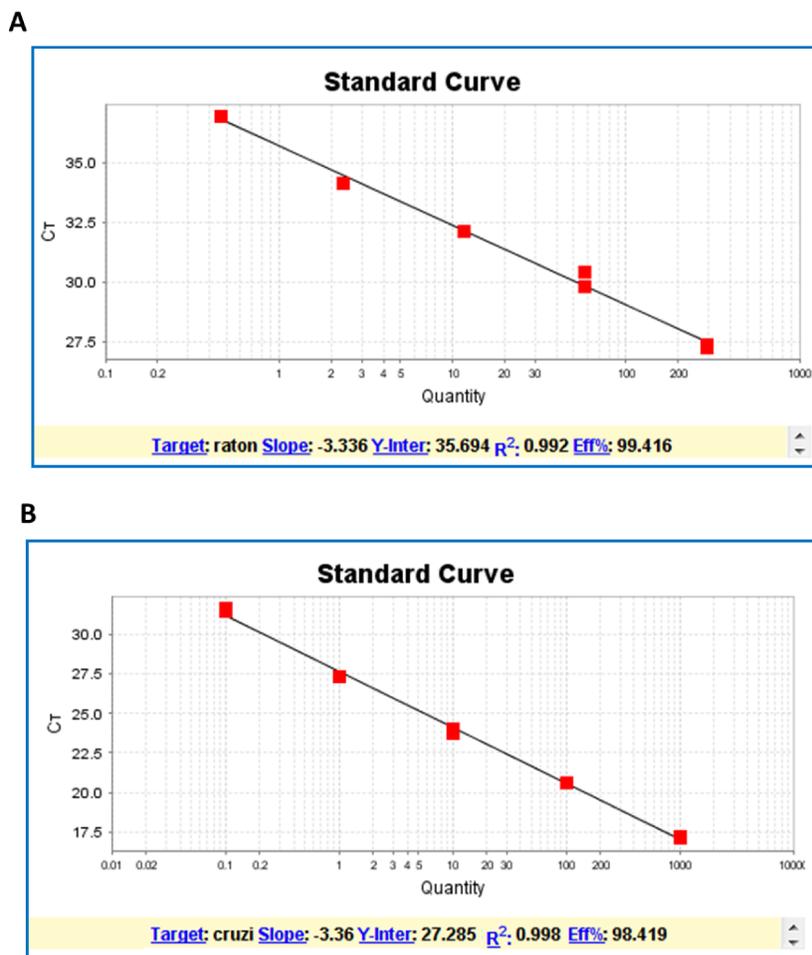
Figura 32: Evaluación de la miocarditis en los preparados histológicos de los corazones de los grupos inmunizados durante la infección aguda con *T. cruzi*. Microfotografías de los cortes histológicos de secciones del corazón de los grupos TS-IMX, TS, PBS infectados durante 15 días con *T. cruzi* y de grupo control sin infectar PBS-ni, teñidos con tinción de H&E. En azul se tiñen los núcleos, en rosa se tiñe el citoplasma de las células musculares. Las flechas indican nidos de amastigotes.



**Figura 33: Medición de la miocarditis en los corazones de los grupos inmunizados durante la infección aguda con *T. cruzi*.** Puntuación de la miocarditis presente en los corazones de los grupos TS-IMX, TS, PBS infectados durante 15 días con *T. cruzi* y de un grupo control sin infectar PBS-ni. La puntuación se calculó en base al grado de infiltración, daño de fibras y presencia de nidos de parásitos observadas con la tinción de H&E. \*\* P< 0,01.

#### IV.3.2.3. Carga parasitaria en el tejido cardiaco en el estadio agudo de la infección

Para la cuantificación de *T. cruzi* en el tejido cardiaco, se realizó una curva estándar de parásitos y una curva estándar de ADN murino (Figura 34). Estas se optimizaron, no solo para tener una elevada eficiencia (Eff%) y  $R^2$ , sino para poder hacer una correcta normalización. Las eficiencias para las curvas estándar de ADN murino y de parásitos equivalentes fueron del 99,4 % y 98,4 % respectivamente.

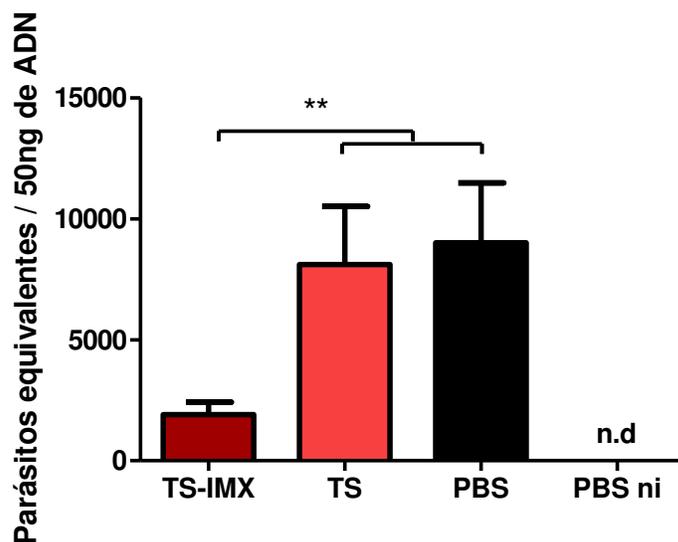


**Figura 34: PCR en tiempo real para cuantificar parásitos.** Se utilizó el software StepOne 2.1. para procesar los resultados obtenidos. **A.** Curva de cuantificación para el ADN murino. **B.** Curva de cuantificación de parásitos equivalentes.

Para cada muestra de ADN evaluada, se obtuvo por un lado la cantidad de ADN murino total y por el otro la cantidad de parásitos equivalentes. La cuantificación del ADN murino mediante la PCR en tiempo real se realizó para contemplar, en el resultado final de cada muestra, los errores en las distintas técnicas de cuantificación del ADN. Debido a la sensibilidad de la PCR en tiempo real, es imprescindible partir de la misma cantidad de muestra para poder realizar una correcta comparación entre las poblaciones. De este modo, los valores obtenidos en la cuantificación de ADN murino fueron normalizados a 50 ng de muestra, y con el valor corregido de la cuantificación de parásitos se realizó la comparación entre grupos (Figura 35).

El análisis de la carga parasitaria en el tejido, mediante la PCR en tiempo real, arrojó una reducción significativa de ~4,7 veces del grupo TS-IMX en comparación con el grupo TS y PBS (P

<0,01, Figura 35). Este resultado es consistente con el conteo de nidos de amastigotes presente en el corazón a los 15 dpi y con la parasitemia observada en el capítulo III para los mismos grupos evaluados.



**Figura 35: Cuantificación de la carga parasitaria de los grupos inmunizados durante la infección aguda.** Se determinó la cantidad de parásitos equivalentes a los grupos TS-IMX, TS y PBS luego de ser infectados con *T. cruzi* durante 15 días y un grupo control sin infectar PBS-ni, mediante PCR en tiempo real. Se amplificó la secuencia de 195 pb del ADN satélite del *T. cruzi* normalizada con la secuencia del gen murino TNF- $\alpha$ .

### IV.3.3. Evaluación de los grupos inmunizados durante la etapa crónica de la infección con *T. cruzi*

El modelo de infección utilizado en este trabajo, es un modelo de infección aguda que fue optimizado para generar un 50 % de mortalidad a los 21 días en el grupo control infectado. Si bien en forma paralela a lo realizado en este trabajo, se trató de optimizar la carga parasitaria para generar un modelo crónico, en el cual los ratones se infecten sin mortalidad, no ha podido ser realizado con la cepa de parásitos y ratones utilizados en este trabajo. Cuando se redujo la carga parasitaria para tratar de conseguir cronicidad sin mortalidad, los ratones no se infectaban, eliminando al parásito naturalmente (datos no mostrados). Utilizando el modelo planteado originalmente, se evaluó el estadio crónico con los ratones que sobrevivieron a la infección luego de 100 días.

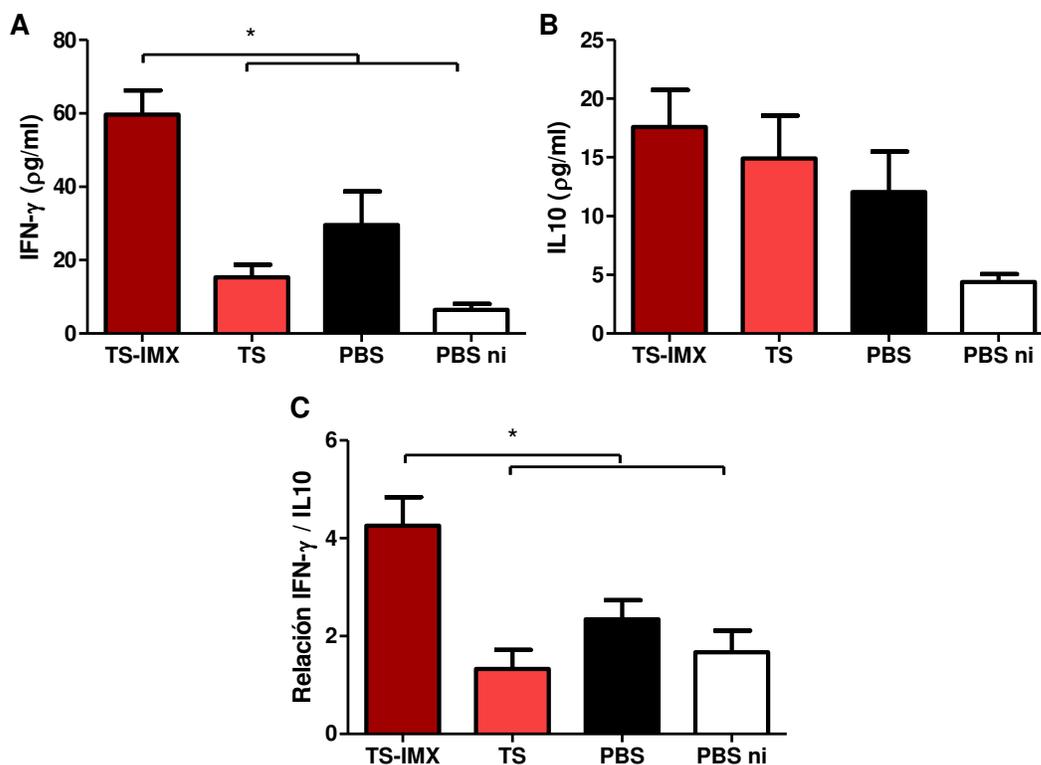
En el capítulo tres, observamos que la supervivencia del grupo TS-IMX fue del 100 % siendo superior a los grupos TS y PBS, las cuales fueron del 20% y 40% respectivamente. En esta sección evaluamos en el estadio crónico de la infección, la expresión de citoquinas estimuladas *in vitro*, la carga parasitaria en el tejido cardiaco y el daño generado por la infección a lo largo de 100 días.

#### **IV.3.3.1 Evaluación de la respuesta celular en el estadio crónico de la infección**

Los esplenocitos de ratones inmunizados con TS-IMX e infectados con *T. cruzi*, produjeron mayores niveles de IFN- $\gamma$  con respecto a los grupos TS, PBS y PBS ni, luego del cultivo y estimulación *in vitro* con TS ( $P < 0,05$ ;

Figura 36A). En el caso de la IL-10, la producción no generó diferencias significativas en los distintos grupos ( $P = 0,064$ ;

Figura 36B). Sin embargo la relación IFN- $\gamma$ /IL-10 arrojó diferencias del grupo TS-IMX con respecto al grupo TS, PBS y PBS ni. Los niveles de IL-4 fueron muy bajos, no presentando diferencias entre los distintos grupos (datos no presentados).



**Figura 36: Evaluación de la respuesta celular de los grupos inmunizados en el estadio crónico de la infección con *T. cruzi*.** Respuesta inmune celular en ratones inmunizados e infectados durante 100 días. Los esplenocitos se cultivaron por triplicado durante 72 h en presencia de TS. **(A)** Determinación de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo. **(B)** Determinación de IL-10 en el sobrenadante de cultivo. Las citoquinas se cuantificaron mediante ELISA de captura. **(C)** Relación de las concentraciones de IFN- $\gamma$ /IL-10. \* P < 0,05.

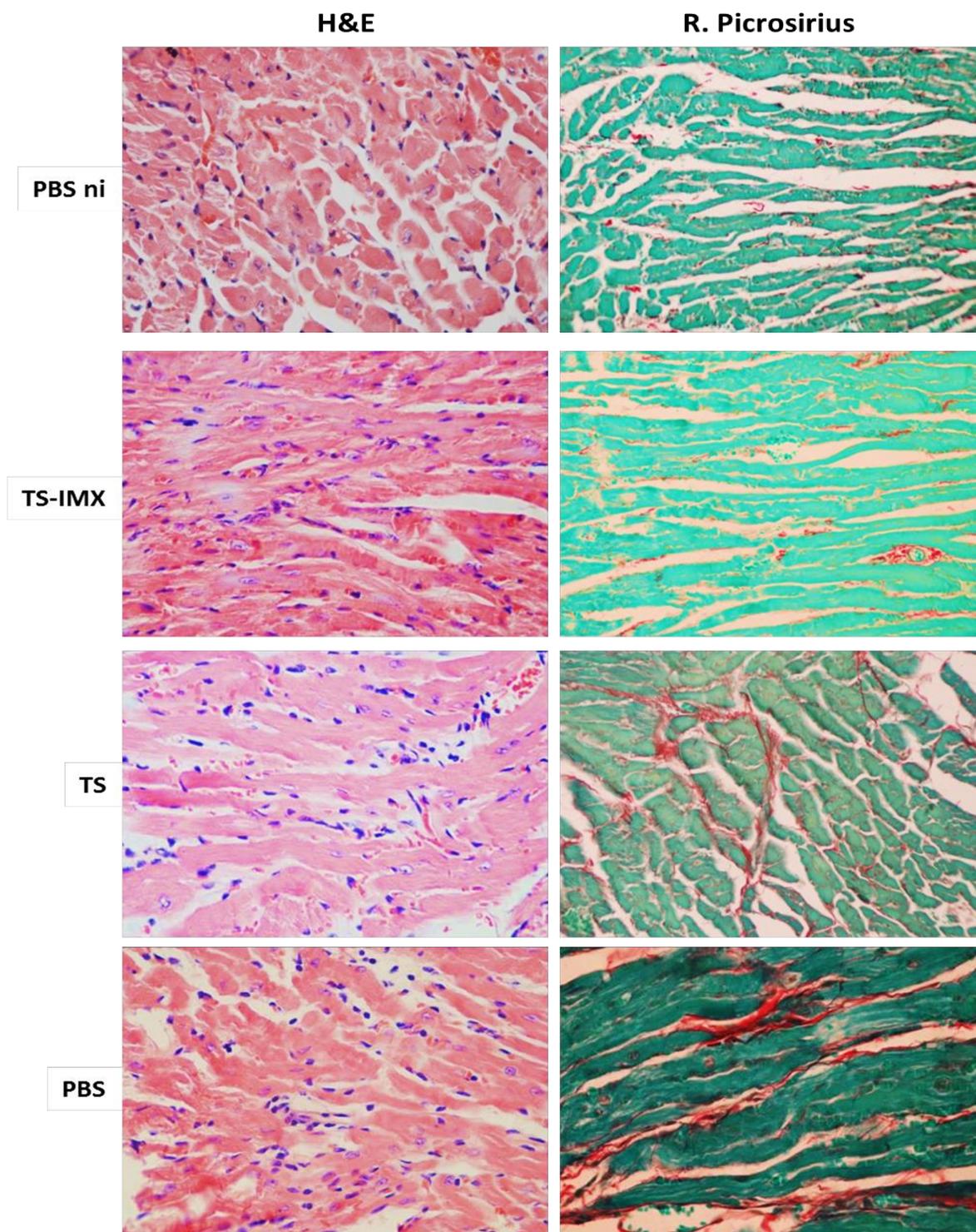
#### IV.3.3.2. Evaluación del daño cardíaco en el estadio crónico de la infección

Para analizar el impacto de las inmunizaciones en el daño tisular crónico causado por *T. cruzi*, la miocarditis se evaluó en los corazones de los ratones a los 100 dpi. En la Figura 37 se observan imágenes representativas de cortes histológicos de los grupos inmunizados e infectados, más un grupo control sin infectar. Las mismas fueron teñida con H&E y con rojo Picosirius.

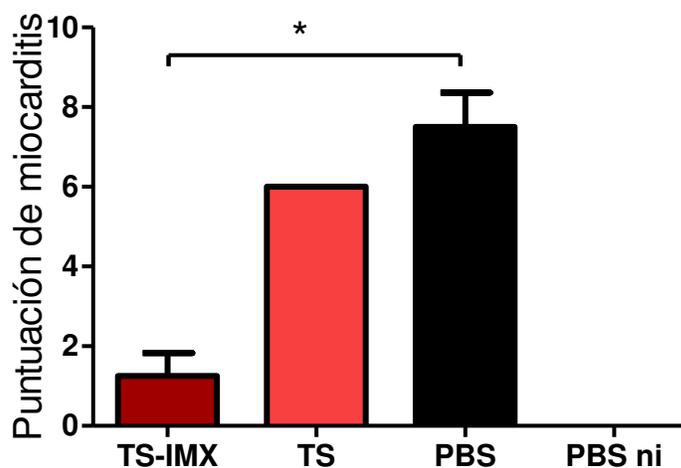
En la fase crónica, los ratones inmunizados con TS-IMX mostraron una disminución drástica de infiltrados inflamatorios en el corazón en comparación con los ratones PBS, que mostraron persistencia de focos inflamatorios difusa (Figura 37, H&E). En este estadio de la infección no se ha observado, luego de una extensa búsqueda a lo largo de los cortes histológicos, presencia de nidos de amastigotes.

Analizando el grado de daño tisular mediante la tinción de R. Picrosirius, los grupos TS y PBS mostraron una extensa fibrosis, mientras que en los corazones de los ratones inmunizados con TS-IMX se observó una ligera fibrosis (Figura 37, R. Picrosirius).

Cuando se calculó el grado de miocarditis, integrando la puntuación obtenida mediante la tinción con H&E más la obtenida por tinción con el rojo Picrosirius, se observó que el grupo TS-IMX presentó una miocarditis 4 veces menor al grupo PBS (Figura 38;  $P < 0,05$ ).



**Figura 37: Efecto de la formulación evaluada sobre el desarrollo de lesiones cardíacas en el estadio crónico de la infección con *T. cruzi*.** Microfotografías de los cortes histológicos de secciones del corazón de los grupos TS-IMX, TS, PBS infectados durante 100 días con *T. cruzi* y de grupo control sin infectar PBS-ni. **H&E.** A la derecha se muestran los preparados teñidos con tinción de H&E, en azul se tiñen los núcleos, en rosa se tiñe el citoplasma de las células musculares. **R. Picrosirius.** A la izquierda se muestran los preparados teñidos con la tinción de rojo de picrosirius, en verde se tiñe el citoplasma de las células musculares y en rojo las fibras musculares.

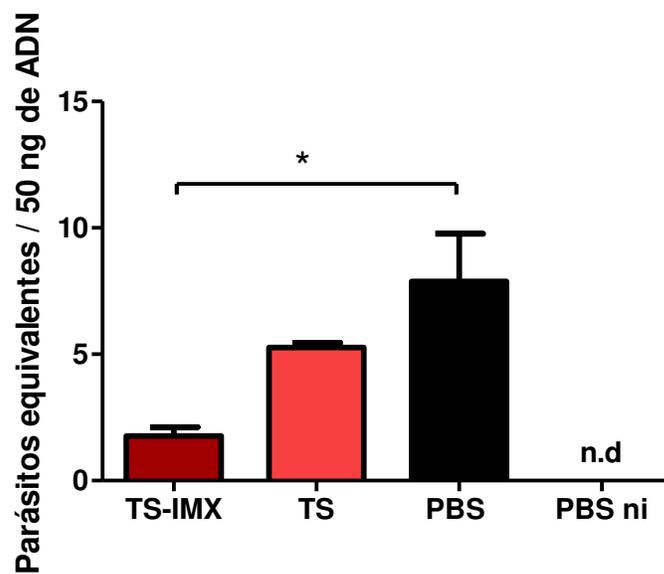


**Figura 38: Comparación de la miocarditis para las distintas formulaciones evaluadas en el estadio crónico de la infección con *T. cruzi*.** Los corazones de los grupos TS-IMX, TS, PBS infectados durante 100 días con *T. cruzi* y de un grupo control sin infectar PBS-ni, se les determinó la puntuación de la miocarditis. Dicho cálculo fue realizado multiplicando la puntuación obtenida con la tinción de H&E y la puntuación calculada con la tinción de R. Picrosirius. \*  $P < 0,05$ .

#### IV.3.3.3. Carga parasitaria en el tejido cardiaco en el estadio crónico de la infección

En la fase crónica de la infección con *T. cruzi*, la parasitemia disminuye sustancialmente, así como también la concentración de parásitos en los tejidos. Observamos esa disminución cuando se compararon los grupos infectados en la fase aguda con los grupos de la fase crónica.

Los resultados de la carga parasitaria en los grupos inmunizados e infectados, en la fase crónica mostraron una reducción de 4,5 veces la concentración de parásito en el grupo TS-IMX en comparación con el grupo PBS (Figura 39).



**Figura 39: Cuantificación de la carga parasitaria en el estadio crónico de la infección con *T. cruzi* para los diferentes grupos inmunizados.** Se determinó la cantidad de parásitos equivalentes en los grupos TS-IMX, TS y PBS luego de ser infectados con *T. cruzi* durante 100 días y en un grupo control sin infectar (PBS-ni), mediante PCR en tiempo real. Se amplificó la secuencia de 195 pb del ADN satélite del *T. cruzi* normalizado su cantidad con la secuencia del gen murino TNF- $\alpha$ .

## IV.4. DISCUSIÓN

Existe un consenso creciente de que la enfermedad de Chagas ya no se limita a un mal de las zonas rurales pobres de América Latina, sino que es más bien un problema de salud pública en todo el mundo y que, previsiblemente, lo seguirá siendo en el futuro (Bonney, 2014).

Las opciones de tratamiento para la enfermedad de Chagas resultan actualmente limitadas. Esto se debe principalmente a la baja eficacia de las drogas convencionales, el nifurtimox o benznidazol en los infectados crónicos. Debido a que la enfermedad de Chagas es principalmente asintomática durante la fase aguda, es muy común que la enfermedad se manifieste en la fase crónica, donde la mayoría de los individuos son resistentes al tratamiento por lo que llevan la infección de por vida. Además, estos tratamientos con frecuencia causan reacciones adversas, haciendo que muchos pacientes lo abandonen o no lo cumplan estrictamente. Por lo tanto, la falta de un tratamiento farmacológico eficaz requiere el desarrollo de nuevas estrategias para prevenir la enfermedad o mejorar la calidad de vida en las personas infectadas. La vacunación constituiría un enfoque alternativo para la prevención de la enfermedad de Chagas mediante el control profiláctico de la infección. De este modo, una vacuna eficaz podría prevenir complicaciones cardíacas entre los cerca de 40.000 nuevos casos de la enfermedad de Chagas que se producen en América Latina cada año, evitaría los 662 mil años de vida potencialmente perdidos y prevendría más de 10.000 muertes al año.

Como estrategia para el diseño de vacunas para *T. cruzi*, las subunidades recombinantes formuladas con adyuvantes que potencian y orientan una respuesta adecuada permitirían disminuir ampliamente los requisitos de evaluación necesarios de vacunas humanas. En este trabajo se ensayó un enfoque de vacuna a subunidades contra *T. cruzi* orientado a lograr una formulación que pueda ser rápidamente transferida a evaluaciones clínicas. Seleccionamos una proteína de la familia TS a la que se ha neutralizado la actividad por una mutación (Laroy y Contreras, 2003). Este antígeno ha sido expresado en levaduras permitiendo una glicosilación postraduccional muy próxima a la del *T. cruzi* y niveles de expresión deseables para el escalado de

la producción (Bontempi y col., 2015). Además ha brindado inmunoprotección en ensayos preliminares al ser usada como subunidad recombinante (Fontanella y col., 2008). Como adyuvante se seleccionó al ISCOMATRIX que permite una respuesta celular/humoral equilibrada (Sun y col., 2009) y está siendo evaluado en pruebas clínicas en humanos (Drane y col., 2007). Se prefiere el uso de ISCOMATRIX en lugar de ISCOM porque, aunque ambas partículas tienen la misma composición, el IMX nos permite formular el antígeno por absorción directa, evitando la incorporación del antígeno durante la síntesis de la partícula. Esta ventaja facilitaría el escalado en el proceso de producción de la vacuna en el futuro (Morelli y col., 2012). En lo relativo a *T. cruzi*, el adyuvante ISCOMATRIX sólo fue evaluado en dos artículos en la década de los 90' (Araujo y Morein, 1991; Hansen y col., 1996). Si bien las protecciones obtenidas en los grupos inmunizados con ISCOM o ISCOMATRIX frente al desafío con *T. cruzi* fueron prometedoras, no se realizaron nuevas evaluaciones, ni en modelos de vacunas recombinantes, ni en de vacunas de ADN. Esto podría deberse en primer lugar a la veda impuesta por la teoría de la autoinmunidad sobre la investigación en vacunas contra este parásito y por otro lado, a los primeros informes de toxicidad que generaba el componente de la saponina del IMX (Mohan y col., 2013), concentrando las investigaciones de este adyuvante en vacunas veterinarias. Hoy en día ya se estableció que la fracción altamente purificada del extracto de saponina quillalla, la QS21, es una fracción muy inmunogénica y no presentó toxicidad en las pruebas preclínicas y clínicas realizadas (Drane y col., 2007).

En la primera parte de este capítulo, se evaluó la respuesta celular en los ratones inmunizados con la formulación TS-IMX. Los esplenocitos de ratones inmunizados con la formulación TS-IMX, estimulados con la TS, produjeron altos niveles de IFN- $\gamma$ . EL IFN- $\gamma$  es una citoquina clave en contra de la infección por *T. cruzi* por estar involucrados en mecanismos efectores tales como la activación de LTC, de macrófagos y de mejorar la presentación antigénica (Aliberti y col., 1996; Hoft y col., 2000). Previo al desafío, se obtuvo una relación IFN- $\gamma$ /IL-10 >1 que para el caso de la infección por Leishmaniasis, también causado por un tripanosomátido, se considerada como un buen predictor de éxito para una vacuna en modelos de ratón Balb/c (Stober y col., 2005). Cabe aclarar sin embargo que en esta etapa se produjo un aumento correlativo de la IL10 que, en esta infección sería necesario para evitar un efecto exacerbado inflamatorio perjudicial para los tejidos (Costa y col., 2009; Jankovic y col., 2007). Sin embargo, la relación IFN- $\gamma$ /IL-10 generada por los esplenocitos de los grupos inmunizados con TS-IMX denotan claramente la inducción sesgada de un perfil Th-1. Además la formulación TS-IMX mejoró la activación de

linfocitos CD4 Th1 y CD8 en términos de producción de IFN- $\gamma$ . Se sabe que, tanto las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> juegan un papel fundamental en el control de la infección por *T. cruzi* (Fujimura y col., 2001; Padilla y col., 2009; Pellegrini y col., 2011; Rodrigues y col., 2000; Rodrigues y col., 2009). En nuestro modelo, la producción de IFN- $\gamma$  por las células T CD4<sup>+</sup> podría favorecer la eliminación de los parásitos mediante la activación de los macrófagos y ayudar a la producción de anticuerpos IgG2a, coincidiendo con nuestras observaciones (Figura. 17 y Figura. 30). Por otra parte, la producción de IFN- $\gamma$  por las células T CD4<sup>+</sup> es necesaria para la activación óptima y la producción de IFN- $\gamma$  por las células efectoras CD8<sup>+</sup> (Fujimura y col., 2001; Green y col., 2013). Curiosamente, la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> que produjeron INF- $\gamma$  en los ratones TS-IMX alcanzó el ~5% después de la reestimulación con TS, mientras que el grupo PBS fue del ~1%, lo que sugiere que la formulación TS-IMX favorece el priming y la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Notablemente, en un trabajo realizado por Guptha y Garg (Gupta y col., 2012; Gupta y col., 2013), se evaluó una vacuna altamente protectora mediante la inmunización génica de los antígenos TcG2 y TcG4 de *T. cruzi*, más un refuerzo con las proteínas recombinante. En dicho trabajo, los autores encuentran niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  similares a los alcanzados por nuestra formulación. Si bien se trata de dos estudios independientes, en ambos se realizó una técnica de medición de LTC similar, obteniéndose porcentajes muy similares de LTC específicos contra el antígeno inoculado. Este resultado muestra que la formulación TS-IMX es capaz de desencadenar una respuesta celular comparable con los enfoques de vacunación con genes (Gupta y Garg, 2012-2013).

Por otra parte, en ausencia de adyuvante, curiosamente la TS indujo un perfil inverso al obtenido para IMX. Se obtuvo un perfil regulador cuando se estimularon ex vivo con TS los esplenocitos de los ratones inmunizados con la proteína sin el adyuvante. Esta respuesta coincidió con la gran mortandad y parasitemia observada en este grupo en las evaluaciones realizadas en el capítulo III y concuerda con los datos que indican un efecto inmunológico perjudicial causado por TS en el huésped (Mucci y col., 2002; Nardy y col., 2013; Risso y col., 2007; Woronowicz y col., 2004). Aunque la TS carece de actividad enzimática, otras características singulares aun no conocidas de la secuencia y que deben ser investigadas podrían desencadenar este tipo de respuesta. El efecto perjudicial de la TS al ser inmunizada aun en una dosis menor a 5  $\mu$ g por ratón, ya había sido descrito en un trabajo en el que se atribuyó dicho comportamiento a un efecto de la proteína sobre el sistema inmune del ratón (Chuenkova y col., 1995). Sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre no fue descrito. Es interesante que nosotros hayamos

obtenido el mismo resultado, encontrando en forma adicional que la utilización de adyuvantes revierte este fenómeno. En particular, nuestros resultados indican que IMX puede modificar la respuesta perjudicial impulsada por la TS hacia una respuesta favorable. Cabe destacar que, más allá de permitir cambiar el perfil de respuesta en términos de calidad, el uso del IMX también ha sido señalado para aumentar la respuesta en términos de cantidad, dada la característica de este adyuvante de necesitar una dosis 100 veces más baja de antígeno en relación a otros adyuvantes para generar, de igual manera, una fuerte respuesta inmune (DiStefano y col., 2013; Lenarczyk y col., 2004). Disminuyendo la dosis del inmunógeno, además de prevenir efectos tóxicos que pudieran estar asociados al mismo, una ventaja no menor sería el impacto notable en los costos de la formulación.

El siguiente paso de la evaluación consistió en realizar el desafío con *T. cruzi* a los ratones inmunizados y estudiar los parámetros inmunológicos e histológicos en la fase aguda de la infección a los 15 dpi. Los esplenocitos de los ratones inmunizados con TS-IMX e infectados durante 15 días, produjeron los niveles más altos de IFN- $\gamma$  e IL-10 comparados con los demás grupos, luego de ser estimulados ex vivo con TS. Asimismo, el infiltrado inflamatorio y la presencia de nidos de amastigotes fue menor en el grupo TS-IMX comparado con el grupo control, siendo ~5 veces menor la relación entre la carga de parásitos en el tejido entre el grupo evaluado y el control. Por lo tanto, observamos que durante la infección aguda, el grupo TS-IMX controló la parasitemia (Figura 21 y 25), disminuyó la carga parasitaria en corazón (Figura 35) y generó un infiltrado inflamatorio controlado (Figura 32 y 33), todo esto en un entorno de respuesta de citoquinas IFN- $\gamma$  e IL10 balanceada (Figura 31). Esto estaría indicando la presencia de una respuesta altamente inflamatoria pero controlada, siendo considerada este tipo de respuesta actualmente un buen predictor del éxito de una vacuna contra *T. cruzi* (Cazorla y col., 2008; Gupta y col., 2012-2013; Serna y col., 2014; Tekiel y col., 2009). De hecho, una respuesta inmune específica, pero regulada, parece ser beneficioso en la enfermedad de Chagas. Esto se ha observado en los perfiles inmunológicos en pacientes asintomáticos con respecto a los pacientes sintomáticos (revisado en Machado y col., 2012). En consecuencia, puede ser planteada la hipótesis de trabajo de que un patrón similar de respuesta sería deseable en vacunas humanas.

Por último se evaluó el nivel de protección que proporcionó la inmunización en la etapa crónica de la infección a los 100 dpi. Como se mencionó anteriormente, en esta etapa la parasitemia y los parásitos en tejidos disminuyen drásticamente. El sistema inmune se encuentra

más normalizado, comparado con la gran activación linfocitaria que se genera en la fase aguda de la infección. De igual manera, en esta etapa el daño en los tejidos, producto de la eliminación de los nidos y reparación de las fibras miocárdicas, es lo que más se pone en evidencia.

Luego de 100 días de infección con *T. cruzi*, evaluamos en las células del bazo de los diferentes grupos, que tipo de memoria podría haber generado el sistema inmune frente a la presencia del antígeno TS. Interesantemente, al grupo TS-IMX se le encontró una capacidad de respuesta de IFN- $\gamma$  superior, luego de la estimulación específica, comparados con los demás grupos (Figura 36). Esta citoquina marca la activación de una respuesta inflamatoria necesaria para la eliminación del parásito, evitando así la reactivación de la parasitemia, como es observada en paciente crónicos inmunodeprimidos después del trasplante de corazón (Campos y col., 2008) o en pacientes con SIDA (Cordova y col., 2008). Con respecto a la evaluación del tejido cardiaco, fue notoria la participación de la formulación TS-IMX, en la reducción significativa de la patología en la infección en la fase crónica. Esto se puso de manifiesto luego de que el 100% de los ratones del grupo TS-IMX, que sobrevivieron al desafío letal, mostraran lesiones leves en el miocardio. Sin embargo, el grupo PBS infectado manifestó lesiones severas puntuadas con las diferentes tinciones realizadas, presentando una extensa fibrosis a lo largo del tejido (Figura 37 y 38). La disminución del daño en el tejido muscular cardiaco o esquelético ya ha sido mencionado en algunos de los trabajos realizados con modelos de infección de vacunas contra *T. cruzi*; aunque en su mayoría fueron realizadas en plataformas de inmunización genómica o prime-boots (revisado en Vázquez-Choragoyán y col., 2011; Gupta y Garg, 2012-2013). Al evaluar la carga parasitaria en el corazón en el estadio crónico, todos los grupos presentaron menor cantidad de parásitos que en la fase aguda (en el orden de  $10^3$ ). De igual manera, el grupo TS-IMX presentó una relación de ~4,5 veces menos en la cantidad de parásitos en relación con el grupo control infectado (Figura 39). Estos resultados son muy prometedores, teniendo en cuenta que en la enfermedad de Chagas humana, la presencia de infiltrado inflamatorio en el corazón se correlacionó con la persistencia del parásito (Higuchi y col., 1997; Marcon y col., 2011).

De acuerdo con los diseños de vacunas con IMX para otros patógenos (Sun y col., 2009), nuestros resultados demuestran que la formulación TS-IMX induce respuestas inmunes humorales y celulares óptimas, lo que confiere una fuerte protección contra *T. cruzi*. Sorprendentemente, la inmunización TS-IMX impide el desarrollo de la miocarditis severa en la fase crónica, el sello distintivo de la enfermedad de Chagas. Subunidades recombinantes potenciadas con

coadyuvantes ya evaluados y aprobados requieren pasos de evaluación menos exigentes que otros enfoques, para lograr vacunas adecuadas para el uso humano. Por lo tanto, la formulación actual es un candidato a vacuna *T. cruzi* altamente prometedor.

## IV.5. CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ La inmunización de ratones con la formulación TS-IMX estimuló la producción tanto de la citoquina proinflamatoria IFN- $\gamma$ , como de la citoquina regulatoria IL-10, cuando se estimuló ex vivo a esplenocitos de dichos ratones con la proteína TS. La relación IFN- $\gamma$ /IL-10 en el grupo TS-IMX fue mayor a 1, revelando la inducción sesgada hacia un perfil Th-1.
- ✓ En la evaluación de las poblaciones celulares, se evidenció que la formulación TS-IMX aumentó la activación de linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1 y CD8<sup>+</sup>, siendo estas fundamentales en el control de la infección por *T. cruzi*
- ✓ Se observó en el estadio agudo de la infección con *T. cruzi* que en los ratones inmunizados con la formulación TS-IMX generó, en esplenocitos ex vivo estimulados con TS, un aumento de la producción en concentraciones equilibradas de IFN- $\gamma$  y IL-10. Este resultado indicaría que la formulación favorece el establecimiento de un ambiente inflamatorio y a su vez regulador durante la eliminación del parásito siendo este equilibrio necesario para el control inmunológico de la infección sin daños colaterales.
- ✓ Se evidenció una disminución de la carga parasitaria y daño en el tejido cardíaco, en el grupo TS-IMX comparado con el grupo control, durante la infección aguda con *T. cruzi*.
- ✓ En el estadio crónico de la infección con *T. cruzi* se obtuvo, para el grupo TS-IMX, una respuesta de citoquinas proinflamatoria luego de la estimulación específica ex vivo de esplenocitos con TS. Además, en este grupo se evidenció una disminución en la carga parasitaria y una disminución muy significativa de daño del tejido cardíaco.

## Conclusiones Finales

- ✓ De la evaluación de los antígenos proteicos de *T. cruzi*, los inmunógeno Tc3 y TS fueron los que mayor protección presentaron frente al desafío con *T. cruzi*, permitiendo obtener una menor parasitemia y mayor supervivencia en los ratones inoculados.
- ✓ De la evaluación de los adyuvantes de nueva generación evaluados, el ISCOMATRIX potenció la respuesta humoral y celular, generando un perfil de respuesta Th1 en el grupo inmunizado. Además, generó una mayor protección frente al desafío con *T. cruzi* comparado con los adyuvantes AF e IMT.
- ✓ Nuestros resultados demuestran que la formulación TS-IMX induce una respuesta inmune humoral y celular protectora, lo que confiere una fuerte protección contra *T. cruzi*.
- ✓ La inmunización TS-IMX impide el desarrollo de la miocarditis severa en la fase crónica, siendo este el sello distintivo de la enfermedad de Chagas. Por lo tanto, aun en el caso en que no se consiga inmunidad profiláctica esterilizante, este resultado obtenido es muy auspicioso.
- ✓ Dado que para lograr vacunas adecuadas para el uso humano, las elaboradas mediante subunidades recombinantes y potenciadas con coadyuvantes, ya evaluados y aprobados en humanos, requieren pasos de evaluación menos exigentes que otros enfoques experimentales. La formulación TS-IMX aquí propuesta es un candidato vacunal contra *T. cruzi* altamente prometedor.

---

## Bibliografía

- Aliberti, J. C.; Souto, J. T.; Marino, A. P.; Lannes-Vieira, J.; Teixeira, M. M.; Farber, J.; Gazzinelli, R. T.; & Silva, J. S. (2001). *Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during Trypanosoma cruzi infection*. The American Journal of Pathology, 158(4), 1433–1440.
- Almeida, I. C.; & Gazzinelli, R. T. (2001). *Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses*. Journal of Leukocyte Biology, 70(4), 467–477.
- Alvarez, M. N.; Piacenza, L.; Irigoín, F.; Peluffo, G.; & Radi, R. (2004). *Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to Trypanosoma cruzi*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 432(2), 222–232.
- Araújo, A. F. S.; de Alencar, B. C. G.; Vasconcelos, J. R. C.; Hiyane, M. I.; Marinho, C. R. F.; Penido, M. L. O.; Boscardin, S. B.; Hoft, D. F.; Gazzinelli, R. T.; & Rodrigues, M. M. (2005). *CD8+-T-cell-dependent control of Trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2*. Infection and Immunity, 73(9), 6017–6025.
- Araujo, F. G.; & Morein, B. (1991). *Immunization with Trypanosoma cruzi epimastigote antigens incorporated into iscoms protects against lethal challenge in mice*. Infection and Immunity, 59(9), 2909–2914.
- Bafica, A.; Santiago, H. C.; Goldszmid, R.; Ropert, C.; Gazzinelli, R. T.; & Sher, A. (2006). *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 177(6), 3515–3519.
- Ballou, W. R. (2009). *The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons*. Parasite Immunology, 31(9), 492–500.

- 
- Barrias, E. S.; de Carvalho, T. M. U.; & De Souza, W. (2013). *Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation*. *Frontiers in Immunology*, 4, 186.
  - Bertini, R.; Howard, O. M.; Dong, H. F.; Oppenheim, J. J.; Bizzarri, C.; Sergi, R.; Caselli, G.; Pagliei, S.; Romines, B.; Wilshire, J. A.; Mengozzi, M.; Nakamura, H.; Yodoi, J.; Pekkari, K.; Gurunath, R.; Holmgren, A.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A.; & Ghezzi, P. (1999). *Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(11), 1783–1789.
  - Bixby, L. M.; & Tarleton, R. L. (2008). *Stable CD8+ T Cell Memory during Persistent Trypanosoma cruzi Infection*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(4), 2644–2650.
  - Bonney, K. M. (2014). *Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat?*. *Parasite (Paris, France)*, 21, 11.
  - Bonney, K. M.; & Engman, D. M. (2008). *Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?*. *Current Molecular Medicine*, 8(6), 510–518.
  - Bontempi, I. A.; Vicco, M. H.; Cabrera, G.; Villar, S. R.; González, F. B.; Roggero, E. A.; Ameloot, P.; Callewaert, N.; Pérez, A. R.; & Marcipar, I. S. (2015). *Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease*. *Vaccine*, 33(10), 1274–1283.
  - Brown, J.; Wang, H.; Hajishengallis, G. N.; & Martin, M. (2011). *TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk*. *Journal of Dental Research*, 90(4), 417–427.
  - Buscaglia, C. A.; Alfonso, J.; Campetella, O.; & Frasch, A. C. (1999). *Tandem amino acid repeats from Trypanosoma cruzi shed antigens increase the half-life of proteins in blood*. *Blood*, 93(6), 2025–2032.
  - Buscaglia, C. A.; Campetella, O.; Leguizamón, M. S.; & Frasch, A. C. (1998). *The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain*. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(2), 431–436.

- 
- Caetano, B. C.; Carmo, B. B.; Melo, M. B.; Cerny, A.; dos Santos, S. L.; Bartholomeu, D. C.; Golenbock, D. T.; & Gazzinelli, R. T. (2011). *Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 187(4), 1903–1911.
  - Campos, S. V.; Strabelli, T. M. V.; Amato Neto, V.; Silva, C. P.; Bacal, F.; Bocchi, E. A.; & Stolf, N. A. G. (2008). *Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation*. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, 27(6), 597–602.
  - Cardillo, F.; Voltarelli, J. C.; Reed, S. G.; & Silva, J. S. (1996). *Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells*. *Infection and Immunity*, 64(1), 128–134.
  - Cazorla, S. I.; Becker, P. D.; Frank, F. M.; Ebensen, T.; Sartori, M. J.; Corral, R. S.; Malchiodi, E. L.; & Guzmán, C. A. (2008). *Oral vaccination with Salmonella enterica as a cruzipain-DNA delivery system confers protective immunity against Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 76(1), 324–333.
  - Cazorla, S. I.; Frank, F. M.; & Malchiodi, E. L. (2009). *Vaccination approaches against Trypanosoma cruzi infection*. *Expert Review of Vaccines*, 8(7), 921–935.
  - Cazorla, S. I.; Matos, M. N.; Cerny, N.; Ramirez, C.; Alberti, A. S.; Bivona, A. E.; Morales, C.; Guzmán, C. A.; & Malchiodi, E. L. (2014). *Oral Multicomponent DNA Vaccine Delivered by Attenuated Salmonella Elicited Immunoprotection Against American Trypanosomiasis*. *The Journal of Infectious Diseases*.
  - Chuenkova, M.; & Pereira, M. E. (1995). *Trypanosoma cruzi trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease*. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(5), 1693–1703.
  - Clay, G. M.; Sutterwala, F. S.; & Wilson, M. E. (2014). *NLR proteins and parasitic disease*. *Immunologic Research*, 59(1-3), 142–152.
  - Coffman, R. L.; Sher, A.; & Seder, R. A. (2010). *Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work*. *Immunity*, 33(4), 492–503.

- 
- Cordova, E.; Boschi, A.; Ambrosioni, J.; Cudos, C.; & Corti, M. (2008). *Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007*. International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases, 12(6), 587–592.
  - Costa, G. C.; da Costa Rocha, M. O.; Moreira, P. R.; Menezes, C. A. S.; Silva, M. R.; Gollob, K. J.; & Dutra, W. O. (2009). *Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy*. The Journal of Infectious Diseases, 199(3), 451–454.
  - Coura, J. R.; & Borges-Pereira, J. (2012). *Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review*. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 45(3), 286–296.
  - Coura, J. R.; & Dias, J. C. P. (2009). *Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery*. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1, 31–40.
  - Criado, M. T.; Sánchez, S.; & Ferreirós, C. M. (2008). *[Classic vaccinology and advances in vaccine design]*. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, 26(9), 564–572.
  - Cummings, K. L.; & Tarleton, R. L. (2003). *Rapid quantitation of Trypanosoma cruzi in host tissue by real-time PCR*. Molecular and Biochemical Parasitology, 129(1), 53–59.
  - Cunha-Neto, E.; Coelho, V.; Guilherme, L.; Fiorelli, A.; Stolf, N.; & Kalil, J. (1996). *Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient*. The Journal of Clinical Investigation, 98(8), 1709–1712.
  - Da Silveira, null; Paranhos, G. S.; Cotrim, P. C.; Mortara, R. A.; Camargo, M. E.; Rassi, A.; Wanderley, J.; Corral, R.; Freilij, H. L.; & Grinstein, S. (1990). *Antigens de Trypanosoma cruzi with clinical interest cloned and expressed in Escherichia coli*. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 85(4), 507–511.
  - De Alencar, B. C. G.; Persechini, P. M.; Haolla, F. A.; de Oliveira, G.; Silverio, J. C.; Lannes-Vieira, J.; Machado, A. V.; Gazzinelli, R. T.; Bruna-Romero, O.; & Rodrigues, M. M. (2009). *Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, Trypanosoma cruzi, elicited by*

- heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination*. *Infection and Immunity*, 77(10), 4383–4395.
- De Carvalho, T. M.; & de Souza, W. (1989). *Early events related with the behaviour of Trypanosoma cruzi within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages*. *Cell Structure and Function*, 14(4), 383–392.
  - De Souza, W.; de Carvalho, T. M. U.; & Barrias, E. S. (2010). *Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction*. *International Journal of Cell Biology*, 2010.
  - Dias, J. C. P.; Prata, A.; & Correia, D. (2008). *Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis*. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 41(2), 193–196.
  - DiStefano, D.; Antonello, J. M.; Bett, A. J.; Medi, M. B.; Casimiro, D. R.; & ter Meulen, J. (2013). *Immunogenicity of a reduced-dose whole killed rabies vaccine is significantly enhanced by ISCOMATRIX™ adjuvant, Merck amorphous aluminum hydroxylphosphate sulfate (MAA) or a synthetic TLR9 agonist in rhesus macaques*. *Vaccine*, 31(42), 4888–4893.
  - Dominguez, M. R.; Silveira, E. L. V.; de Vasconcelos, J. R. C.; de Alencar, B. C. G.; Machado, A. V.; Bruna-Romero, O.; Gazzinelli, R. T.; & Rodrigues, M. M. (2011). *Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite*. *PLoS One*, 6(7), e22011.
  - Drane, D.; Gittleson, C.; Boyle, J.; & Maraskovsky, E. (2007). *ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines*. *Expert Review of Vaccines*, 6(5), 761–772.
  - Dumonteil, E. (2007). *DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges*. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2007(6), 90520.
  - Dumonteil, E. (2009). *Vaccine development against Trypanosoma cruzi and Leishmania species in the post-genomic era*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(6), 1075–1082.
  - Dumonteil, E.; Bottazzi, M. E.; Zhan, B.; Heffernan, M. J.; Jones, K.; Valenzuela, J. G.; Kamhawi, S.; Ortega, J.; Rosales, S. P. de L.; Lee, B. Y.; Bacon, K. M.; Fleischer, B.; Slingsby, B. T.; Cravioto, M. B.; Tapia-Conyer, R.; & Hotez, P. J. (2012). *Accelerating the development*

- of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects*. Expert Review of Vaccines, 11(9), 1043–1055.
- Dumonteil, E.; Escobedo-Ortegon, J.; Reyes-Rodriguez, N.; Arjona-Torres, A.; & Ramirez-Sierra, M. J. (2004). *Immunotherapy of Trypanosoma cruzi infection with DNA vaccines in mice*. Infection and Immunity, 72(1), 46–53.
  - Eisenbarth, S. C.; Colegio, O. R.; O'Connor, W.; Sutterwala, F. S.; & Flavell, R. A. (2008). *Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants*. Nature, 453(7198), 1122–1126.
  - Elias, F.; Flo, J.; Lopez, R. A.; Zorzopulos, J.; Montaner, A.; & Rodriguez, J. M. (2003). *Strong cytosine-guanosine-independent immunostimulation in humans and other primates by synthetic oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT motifs*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 171(7), 3697–3704.
  - Elias, F.; Flo, J.; Rodriguez, J. M.; De Nichilo, A.; Lopez, R. A.; Zorzopulos, J.; Nagle, C.; Lahoz, M.; & Montaner, A. (2005). *PyNTTTTGT prototype oligonucleotide IMT504 is a potent adjuvant for the recombinant hepatitis B vaccine that enhances the Th1 response*. Vaccine, 23(27), 3597–3603.
  - El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A.-N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.;..., P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D.; & Andersson, B. (2005). *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. Science (New York, N.Y.), 309(5733), 409–415.
  - Esparza, J. (2013). *A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine*. Vaccine, 31(35), 3502–3518.
  - Finkelman, F. D.; Holmes, J.; Katona, I. M.; Urban, J. F.; Beckmann, M. P.; Park, L. S.; Schooley, K. A.; Coffman, R. L.; Mosmann, T. R.; & Paul, W. E. (1990). *Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection*. Annual Review of Immunology, 8, 303–333.
  - Fontanella, G. H.; De Vusser, K.; Laroy, W.; Daurelio, L.; Nocito, A. L.; Revelli, S.; & Contreras, R. (2008). *Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly*

- protects mice from experimental Trypanosoma cruzi infection: a vaccine candidate. Vaccine*, 26(19), 2322–2334.
- Franco, R.; Rodriguez, J. M.; Elías, F.; Hernando-Insúa, A.; Fló, J.; López, R.; Nagle, C.; Lago, N.; Zorzopulos, J.; Horn, D. L.; & Montaner, A. D. (2014). *Non-clinical safety studies of IMT504, a unique non-CpG oligonucleotide. Nucleic Acid Therapeutics*, 24(4), 267–282.
  - Frank, F. M.; Petray, P. B.; Cazorla, S. I.; Muñoz, M. C.; Corral, R. S.; & Malchiodi, E. L. (2003). *Use of a purified Trypanosoma cruzi antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. Vaccine*, 22(1), 77–86.
  - Franzén, O.; Ochaya, S.; Sherwood, E.; Lewis, M. D.; Llewellyn, M. S.; Miles, M. A.; & Andersson, B. (2011). *Shotgun sequencing analysis of Trypanosoma cruzi I Sylvio X10/1 and comparison with T. cruzi VI CL Brener. PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), e984.
  - Frasch, A. C. (1994). *Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between Trypanosoma cruzi and the mammalian host. Parasitology*, 108 Suppl, S37–44.
  - Frasch, A. C.; Cazzulo, J. J.; Aslund, L.; & Pettersson, U. (1991). *Comparison of genes encoding Trypanosoma cruzi antigens. Parasitology Today (Personal Ed.)*, 7(6), 148–151.
  - Freitas, L. M.; dos Santos, S. L.; Rodrigues-Luiz, G. F.; Mendes, T. A. O.; Rodrigues, T. S.; Gazzinelli, R. T.; Teixeira, S. M. R.; Fujiwara, R. T.; & Bartholomeu, D. C. (2011). *Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of Trypanosoma cruzi reveal an undetected level of complexity. PloS One*, 6(10), e25914.
  - Fujimura, A. E.; Kinoshita, S. S.; Pereira-Chioccola, V. L.; & Rodrigues, M. M. (2001). *DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a Trypanosoma cruzi gene. Infection and Immunity*, 69(9), 5477–5486.
  - Garg, N.; & Bhatia, V. (2005). *Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. Expert Review of Vaccines*, 4(6), 867–880.
  - Giddings, O. K.; Eickhoff, C. S.; Sullivan, N. L.; & Hoft, D. F. (2010). *Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG Adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival Trypanosoma cruzi challenges. Infection and Immunity*, 78(3), 1333–1338.

- 
- Goto, Y.; Carter, D.; & Reed, S. G. (2008). *Immunological dominance of Trypanosoma cruzi tandem repeat proteins*. Infection and Immunity, 76(9), 3967–3974.
  - Green, A. M.; Difazio, R.; & Flynn, J. L. (2013). *IFN- $\gamma$  from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 190(1), 270–277.
  - Gupta, S.; & Garg, N. J. (2012). *Delivery of antigenic candidates by a DNA/MVA heterologous approach elicits effector CD8(+)T cell mediated immunity against Trypanosoma cruzi*. Vaccine, 30(50), 7179–7186.
  - Gupta, S.; & Garg, N. J. (2013). *TcVac3 induced control of Trypanosoma cruzi infection and chronic myocarditis in mice*. PloS One, 8(3), e59434.
  - Hansen, D. S.; Alievi, G.; Segura, E. L.; Carlomagno, M.; Morein, B.; & Villacres-Eriksson, M. (1996). *The flagellar fraction of Trypanosoma cruzi depleted of an immunosuppressive antigen enhances protection to infection and elicits spontaneous T cell responses*. Parasite Immunology, 18(12), 607–615.
  - Higuchi, M. D.; Ries, M. M.; Aiello, V. D.; Benvenuti, L. A.; Gutierrez, P. S.; Bellotti, G.; & Pileggi, F. (1997). *Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 56(5), 485–489.
  - Hoft, D. F.; Eickhoff, C. S.; Giddings, O. K.; Vasconcelos, J. R. C.; & Rodrigues, M. M. (2007). *Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic trypanosoma cruzi immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 179(10), 6889–6900.
  - Hoft, D. F.; Kim, K. S.; Otsu, K.; Moser, D. R.; Yost, W. J.; Blumin, J. H.; Donelson, J. E.; & Kirchhoff, L. V. (1989). *Trypanosoma cruzi expresses diverse repetitive protein antigens*. Infection and Immunity, 57(7), 1959–1967.
  - Hölscher, C.; Mohrs, M.; Dai, W. J.; Köhler, G.; Ryffel, B.; Schaub, G. A.; Mossmann, H.; & Brombacher, F. (2000). *Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice*. Infection and Immunity, 68(7), 4075–4083.

- 
- Hotez, P. J.; Bottazzi, M. E.; Franco-Paredes, C.; Ault, S. K.; & Periago, M. R. (2008). *The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2(9), e300.
  - Hotez, P. J.; Dumonteil, E.; Woc-Colburn, L.; Serpa, J. A.; Bezek, S.; Edwards, M. S.; Hallmark, C. J.; Musselwhite, L. W.; Flink, B. J.; & Bottazzi, M. E. (2012). *Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas."* PLoS Neglected Tropical Diseases, 6(5), e1498.
  - Ibañez, C. F.; Affranchino, J. L.; Macina, R. A.; Reyes, M. B.; Leguizamon, S.; Camargo, M. E.; Aslund, L.; Pettersson, U.; & Frasch, A. C. (1988). *Multiple Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs*. Molecular and Biochemical Parasitology, 30(1), 27–33.
  - Jankovic, D.; Kullberg, M. C.; Feng, C. G.; Goldszmid, R. S.; Collazo, C. M.; Wilson, M.; Wynn, T. A.; Kamanaka, M.; Flavell, R. A.; & Sher, A. (2007). *Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection*. The Journal of Experimental Medicine, 204(2), 273–283.
  - Jelicks, L. A.; & Tanowitz, H. B. (2011). *Advances in imaging of animal models of Chagas disease*. Advances in Parasitology, 75, 193–208.
  - Jimenez, J. (2001). *Vaccines--a wonderful tool for equity in health*. Vaccine, 19(17-19), 2201–2205.
  - Kierszenbaum, F.; Knecht, E.; Budzko, D. B.; & Pizzimenti, M. C. (1974). *Phagocytosis: a defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 112(5), 1839–1844.
  - Kool, M.; Soullié, T.; van Nimwegen, M.; Willart, M. A. M.; Muskens, F.; Jung, S.; Hoogsteden, H. C.; Hammad, H.; & Lambrecht, B. N. (2008). *Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells*. The Journal of Experimental Medicine, 205(4), 869–882.
  - Krauth-Siegel, R. L.; & Comini, M. A. (2008). *Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1780(11), 1236–1248.

- 
- Krautz, G. M.; Kissinger, J. C.; & Krettli, A. U. (2000). *The targets of the lytic antibody response against Trypanosoma cruzi*. Parasitology Today (Personal Ed.), 16(1), 31–34.
  - Krieger, M. A.; Salles, J. M.; Almeida, E.; Linss, J.; Bonaldo, M. C.; & Goldenberg, S. (1990). *Expression and polymorphism of a Trypanosoma cruzi gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen*. Experimental Parasitology, 70(3), 247–254.
  - Lafaille, J. J.; Linss, J.; Krieger, M. A.; Souto-Padrón, T.; de Souza, W.; & Goldenberg, S. (1989). *Structure and expression of two Trypanosoma cruzi genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes*. Molecular and Biochemical Parasitology, 35(2), 127–136.
  - Laroy, W.; & Contreras, R. (2000). *Cloning of Trypanosoma cruzi trans-sialidase and expression in Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 20(3), 389–393.
  - Lee, B. Y.; Bacon, K. M.; Connor, D. L.; Willig, A. M.; & Bailey, R. R. (2010). *The potential economic value of a Trypanosoma cruzi (Chagas disease) vaccine in Latin America*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4(12), e916.
  - Lenarczyk, A.; Le, T. T. T.; Drane, D.; Malliaros, J.; Pearce, M.; Hamilton, R.; Cox, J.; Luft, T.; Gardner, J.; & Suhrbier, A. (2004). *ISCOM based vaccines for cancer immunotherapy*. Vaccine, 22(8), 963–974.
  - Machado, A. V.; Cardoso, J. E.; Claser, C.; Rodrigues, M. M.; Gazzinelli, R. T.; & Bruna-Romero, O. (2006). *Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase*. Human Gene Therapy, 17(9), 898–908.
  - Machado, F. S.; Dutra, W. O.; Esper, L.; Gollob, K. J.; Teixeira, M. M.; Factor, S. M.; Weiss, L. M.; Nagajyothi, F.; Tanowitz, H. B.; & Garg, N. J. (2012). *Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease*. Seminars in Immunopathology, 34(6), 753–770.
  - Machado, F. S.; Tyler, K. M.; Brant, F.; Esper, L.; Teixeira, M. M.; & Tanowitz, H. B. (2012). *Pathogenesis of Chagas disease: time to move on*. Frontiers in Bioscience (Elite Edition), 4, 1743–1758.

- 
- Maggioli, G.; Acosta, D.; Silveira, F.; Rossi, S.; Giacaman, S.; Basika, T.; Gayo, V.; Rosadilla, D.; Roche, L.; Tort, J.; & Carmona, C. (2011). *The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against Fasciola hepatica infection in sheep*. *Vaccine*, 29(48), 9057–9063.
  - Maisonneuve, C.; Bertholet, S.; Philpott, D. J.; & De Gregorio, E. (2014). *Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), 12294–12299.
  - Marcipar, I.; & Lagier, M. C. (2012). *Advances in Serological Diagnosis of Chagas' Disease by Using Recombinant Proteins*. In A. Rodriguez-Morales (Ed.), *Current Topics in Tropical Medicine*. InTech. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-tropical-medicine/advances-in-serological-diagnosis-of-chagas-disease-by-using-recombinant-proteins>
  - Marcon, G. E. B.; de Albuquerque, D. M.; Batista, A. M.; Andrade, P. D.; Almeida, E. A.; Guariento, M. E.; Teixeira, M. A. B.; & Costa, S. C. B. (2011). *Trypanosoma cruzi: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(1), 85–91.
  - Marcondes, M. C.; Borelli, P.; Yoshida, N.; & Russo, M. (2000). *Acute Trypanosoma cruzi infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(4), 347–352.
  - Marin-Neto, J. A.; Cunha-Neto, E.; Maciel, B. C.; & Simões, M. V. (2007). *Pathogenesis of chronic Chagas heart disease*. *Circulation*, 115(9), 1109–1123.
  - Marin-Neto, J. A.; Rassi, A.; Avezum, A.; Mattos, A. C.; Rassi, A.; Morillo, C. A.; Sosa-Estani, S.; Yusuf, S.; & BENEFIT Investigators. (2009). *The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 319–324.
  - Marin-Neto, J. A.; Rassi, A.; Morillo, C. A.; Avezum, A.; Connolly, S. J.; Sosa-Estani, S.; Rosas, F.; Yusuf, S.; & BENEFIT Investigators. (2008). *Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas'*

- cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT)*. American Heart Journal, 156(1), 37–43.
- Martin, D. L.; Weatherly, D. B.; Laucella, S. A.; Cabinian, M. A.; Crim, M. T.; Sullivan, S.; Heiges, M.; Craven, S. H.; Rosenberg, C. S.; Collins, M. H.; Sette, A.; Postan, M.; & Tarleton, R. L. (2006). *CD8+ T-Cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes*. PLoS Pathogens, 2(8), e77.
  - Martins-Melo, F. R.; Alencar, C. H.; Ramos, A. N.; & Heukelbach, J. (2012). *Epidemiology of Mortality Related to Chagas' Disease in Brazil, 1999–2007*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6(2). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279342/>
  - Matos, M. N.; Cazorla, S. I.; Bivona, A. E.; Morales, C.; Guzmán, C. A.; & Malchiodi, E. L. (2014). *Tc52 amino-terminal-domain DNA carried by attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium induces protection against a Trypanosoma cruzi lethal challenge*. Infection and Immunity, 82(10), 4265–4275.
  - Migliaccio, V.; Santos, F. R.; Ciancaglini, P.; & Ramalho-Pinto, F. J. (2008). *Use of proteoliposome as a vaccine against Trypanosoma cruzi in mice*. Chemistry and Physics of Lipids, 152(2), 86–94.
  - Miles, M. A.; Toye, P. J.; Oswald, S. C.; & Godfrey, D. G. (1977). *The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of Trypanosoma cruzi, circulating independently in a rural area of Brazil*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 71(3), 217–225.
  - Miyahira, Y.; Takashima, Y.; Kobayashi, S.; Matsumoto, Y.; Takeuchi, T.; Ohyanagi-Hara, M.; Yoshida, A.; Ohwada, A.; Akiba, H.; Yagita, H.; Okumura, K.; & Ogawa, H. (2005). *Immune responses against a single CD8+-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control Trypanosoma cruzi infection*. Infection and Immunity, 73(11), 7356–7365.
  - Mohan, T.; Verma, P.; & Rao, D. N. (2013). *Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead*. The Indian Journal of Medical Research, 138(5), 779–795.
  - Moncayo, A.; & Ortiz Yanine, M. I. (2006). *An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis)*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 100(8), 663–677.

- 
- Morel, C.; Chiari, E.; Camargo, E. P.; Mattei, D. M.; Romanha, A. J.; & Simpson, L. (1980). *Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77(11), 6810–6814.
  - Morelli, A. B.; Becher, D.; Koernig, S.; Silva, A.; Drane, D.; & Maraskovsky, E. (2012). *ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases*. Journal of Medical Microbiology, 61(Pt 7), 935–943.
  - Moser, D. R.; Kirchhoff, L. V.; & Donelson, J. E. (1989). *Detection of Trypanosoma cruzi by DNA amplification using the polymerase chain reaction*. Journal of Clinical Microbiology, 27(7), 1477–1482.
  - Mucci, J.; Hidalgo, A.; Mocetti, E.; Argibay, P. F.; Leguizamon, M. S.; & Campetella, O. (2002). *Thymocyte depletion in Trypanosoma cruzi infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(6), 3896–3901.
  - Mucci, J.; Mocetti, E.; Leguizamón, M. S.; & Campetella, O. (2005). *A sexual dimorphism in intrathymic sialylation survey is revealed by the trans-sialidase from Trypanosoma cruzi*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 174(8), 4545–4550.
  - Mucci, J.; Risso, M. G.; Leguizamón, M. S.; Frasch, A. C. C.; & Campetella, O. (2006). *The trans-sialidase from Trypanosoma cruzi triggers apoptosis by target cell sialylation*. Cellular Microbiology, 8(7), 1086–1095.
  - Nardy, A. F. F. R.; Luiz da Silva Filho, J.; Pérez, A. R.; de Meis, J.; Farias-de-Oliveira, D. A.; Penha, L.; de Araújo Oliveira, I.; Dias, W. B.; Todeschini, A. R.; Freire-de-Lima, C. G.; Bellio, M.; Caruso-Neves, C.; Pinheiro, A. A.; Takiya, C. M.; Bottasso, O.; Savino, W.; & Morrot, A. (2013). *Trans-sialidase from Trypanosoma cruzi enhances the adhesion properties and fibronectin-driven migration of thymocytes*. Microbes and Infection / Institut Pasteur, 15(5), 365–374.
  - Nasser, J. R.; Gómez, L. E.; Sánchez, D.; Guerin, M.; & Basombrío, M. A. (1997). *Immunogenicity of the recombinant SAPA protein of Trypanosoma cruzi for mice*. The Journal of Parasitology, 83(1), 76–81.

- 
- Nóbrega, A. A.; Garcia, M. H.; Tatto, E.; Obara, M. T.; Costa, E.; Sobel, J.; & Araujo, W. N. (2009). *Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil*. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 653–655.
  - Padilla, A. M.; Bustamante, J. M.; & Tarleton, R. L. (2009). *CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection*. *Current Opinion in Immunology*, 21(4), 385–390.
  - Pays, J.-F. (2012). *No, Chagas disease is not the new AIDS of the Americas!*. *Bulletin De La Société De Pathologie Exotique* (1990), 105(5), 337–348.
  - Pellegrini, A.; Carrera-Silva, E. A.; Arocena, A.; Cano, R. C.; Aoki, M. P.; & Gea, S. (2011). *Trypanosoma cruzi antigen immunization induces a higher B cell survival in BALB/c mice, a susceptible strain, compared to C57BL/6 B lymphocytes, a resistant strain to cardiac autoimmunity*. *Medical Microbiology and Immunology*, 200(4), 209–218.
  - Pereira, K. S.; Schmidt, F. L.; Guaraldo, A. M. A.; Franco, R. M. B.; Dias, V. L.; & Passos, L. A. C. (2009). *Chagas' disease as a foodborne illness*. *Journal of Food Protection*, 72(2), 441–446.
  - Pereira, V. R. A.; Lorena, V. M. B.; Nakazawa, M.; Luna, C. F.; Silva, E. D.; Ferreira, A. G. P.; Krieger, M. A.; Goldenberg, S.; Soares, M. B. P.; Coutinho, E. M.; Correa-Oliveira, R.; & Gomes, Y. M. (2005). *Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental Trypanosoma cruzi infection*. *Parasitology Research*, 96(3), 154–161.
  - Pereira, V. R. A.; Lorena, V. M. B.; Verçosa, A. F. A.; Silva, E. D.; Ferreira, A. G. P.; Montarroyos, U. R.; Silva, A. P. G.; & Gomes, Y. M. (2003). *Antibody isotype responses in Balb/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of Trypanosoma cruzi*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(6), 823–825.
  - Pérez Brandan, C.; & Basombrío, M. Á. (2012). *Genetically attenuated Trypanosoma cruzi parasites as a potential vaccination tool*. *Bioengineered*, 3(4), 242–246.
  - Piacenza, L.; Zago, M. P.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Basombrio, M. A.; & Radi, R. (2009). *Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence*. *International Journal for Parasitology*, 39(13), 1455–1464.

- 
- Piñeyro, M. D.; Parodi-Talice, A.; Arcari, T.; & Robello, C. (2008). *Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?*. Gene, 408(1-2), 45–50.
  - Ponce, N. E.; Carrera-Silva, E. A.; Pellegrini, A. V.; Cazorla, S. I.; Malchiodi, E. L.; Lima, A. P.; Gea, S.; & Aoki, M. P. (2013). *Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1832(3), 485–494.
  - Rassi, A., Jr; Rassi, A.; & Marin-Neto, J. A. (2010). *Chagas disease*. Lancet, 375(9723), 1388–1402.
  - Reed, S. G.; Bertholet, S.; Coler, R. N.; & Friede, M. (2009). *New horizons in adjuvants for vaccine development*. Trends in Immunology, 30(1), 23–32.
  - Ribeiro, C. M.; Budni, P.; Pedrosa, R. C.; Farias, M. S.; Parisotto, E. B.; Dalmarco, E. M.; Fröde, T. S.; Oliveira-Silva, D.; Colepicolo, P.; & Filho, D. W. (2010). *Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benzonidazole in chronic Chagas' heart disease*. International Journal of Cardiology, 145(1), 27–33.
  - Risso, M. G.; Pitcovsky, T. A.; Caccuri, R. L.; Campetella, O.; & Leguizamón, M. S. (2007). *Immune system pathogenesis is prevented by the neutralization of the systemic trans-sialidase from Trypanosoma cruzi during severe infections*. Parasitology, 134(Pt 4), 503–510.
  - Rocha, C. D.; Caetano, B. C.; Machado, A. V.; & Bruna-Romero, O. (2004). *Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases*. International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 7(2), 83–94.
  - Rodrigues, M. M.; de Alencar, B. C.; Claser, C.; Tzelepis, F.; Silveira, E. L.; Haolla, F. A.; Dominguez, M. R.; & Vasconcelos, J. R. (2009). *Swimming against the current: genetic vaccination against Trypanosoma cruzi infection in mice*. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1, 281–287.
  - Rodrigues, M. M.; Ribeirão, M.; & Boscardin, S. B. (2000). *CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate Trypanosoma cruzi through a nitric oxide dependent mechanism*. Immunology Letters, 73(1), 43–50.

- 
- Rodriguez, J. M.; Elías, F.; Fló, J.; López, R. A.; Zorzopulos, J.; & Montaner, A. D. (2006). *Immunostimulatory PyNTTTTGT oligodeoxynucleotides: structural properties and refinement of the active motif*. *Oligonucleotides*, 16(3), 275–285.
  - Rosenberg, C. S.; Martin, D. L.; & Tarleton, R. L. (2010). *CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of Trypanosoma cruzi infection but are not required for resistance*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(1), 560–568.
  - Rötzschke, O.; Falk, K.; & Strominger, J. L. (1997). *Superactivation of an immune response triggered by oligomerized T cell epitopes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14642–14647.
  - Rubio, I.; Bolchi, A.; Moretto, N.; Canali, E.; Gissmann, L.; Tommasino, M.; Müller, M.; & Ottonello, S. (2009). *Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20 -- 38) peptide displayed on bacterial thioredoxin*. *Vaccine*, 27(13), 1949–1956.
  - Sanchez-Burgos, G.; Mezquita-Vega, R. G.; Escobedo-Ortegon, J.; Ramirez-Sierra, M. J.; Arjona-Torres, A.; Ouaisi, A.; Rodrigues, M. M.; & Dumonteil, E. (2007). *Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against Trypanosoma cruzi in mice*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(3), 333–341.
  - Sánchez-Valdéz, F. J.; Pérez Brandán, C.; Ferreira, A.; & Basombrío, M. Á. (2014). *Gene-deleted live-attenuated Trypanosoma cruzi parasites as vaccines to protect against Chagas disease*. *Expert Review of Vaccines*, 1–17.
  - Schmunis, G. A.; & Yadon, Z. E. (2010). *Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem*. *Acta Tropica*, 115(1-2), 14–21.
  - Serna, C.; Lara, J. A.; Rodrigues, S. P.; Marques, A. F.; Almeida, I. C.; & Maldonado, R. A. (2014). *A synthetic peptide from Trypanosoma cruzi mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease*. *Vaccine*, 32(28), 3525–3532.
  - Seubert, A.; Monaci, E.; Pizza, M.; O'Hagan, D. T.; & Wack, A. (2008). *The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(8), 5402–5412.

- 
- Souto, R. P.; Fernandes, O.; Macedo, A. M.; Campbell, D. A.; & Zingales, B. (1996). *DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83(2), 141–152.
  - Sturm, N. R.; & Campbell, D. A. (2010). *Alternative lifestyles: the population structure of Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 115(1-2), 35–43.
  - Sun, H.-X.; Xie, Y.; & Ye, Y.-P. (2009). *ISCOMs and ISCOMATRIX*. *Vaccine*, 27(33), 4388–4401.
  - Tarleton, R. L. (2003). *Chagas disease: a role for autoimmunity?*. *Trends in Parasitology*, 19(10), 447–451.
  - Tarleton, R. L. (2007). *Immune system recognition of Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), 430–434.
  - Tarleton, R. L.; & Curran, J. W. (2012). *Is Chagas disease really the “new HIV/AIDS of the Americas”?*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1861.
  - Tekiel, V.; Alba-Soto, C. D.; González Cappa, S. M.; Postan, M.; & Sánchez, D. O. (2009). *Identification of novel vaccine candidates for Chagas’ disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library*. *Vaccine*, 27(9), 1323–1332.
  - Tribulatti, M. V.; Mucci, J.; Van Rooijen, N.; Leguizamón, M. S.; & Campetella, O. (2005). *The trans-sialidase from Trypanosoma cruzi induces thrombocytopenia during acute Chagas’ disease by reducing the platelet sialic acid contents*. *Infection and Immunity*, 73(1), 201–207.
  - Tzelepis, F.; de Alencar, B. C. G.; Penido, M. L. O.; Claser, C.; Machado, A. V.; Bruna-Romero, O.; Gazzinelli, R. T.; & Rodrigues, M. M. (2008). *Infection with Trypanosoma cruzi restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(3), 1737–1748.
  - Valiente-Gabioud, A. A.; Veaute, C.; Perrig, M.; Galan-Romano, F. S.; Sferco, S. J.; & Marcipar, I. S. (2011). *Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of Trypanosoma cruzi FRA protein*. *Experimental Parasitology*, 127(3), 672–679.

- 
- Vázquez-Chagoyán, J. C.; Gupta, S.; & Garg, N. J. (2011). *Vaccine development against Trypanosoma cruzi and Chagas disease*. *Advances in Parasitology*, 75, 121–146.
  - Vicco, M. H.; Bontempi, I.; Ortiz, S.; Solari, A.; Bottasso, O. A.; & Marcipar, I. (2012). *Chronic Chagas disease with cardiodigestive involvement and the TcVI infective form of Trypanosoma cruzi. A case report*. *Parasitology International*, 61(4), 735–737.
  - Vicco, M. H.; Ferini, F.; Rodeles, L.; Cardona, P.; Bontempi, I.; Lioi, S.; Beloscar, J.; Nara, T.; Marcipar, I.; & Bottasso, O. A. (2013). *Assessment of cross-reactive host-pathogen antibodies in patients with different stages of chronic Chagas disease*. *Revista Española De Cardiología (English Ed.)*, 66(10), 791–796.
  - WHO, W. H. O. (2013, February 28). *Chagas disease: control and elimination*. Available: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA63/A63\\_17-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf).
  - Williams, J. A.; Carnes, A. E.; & Hodgson, C. P. (2009). *Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production*. *Biotechnology Advances*, 27(4), 353–370.
  - Wilson, N. S.; Duwell, P.; Yang, B.; Li, Y.; Marsters, S.; Koernig, S.; Latz, E.; Maraskovsky, E.; Morelli, A. B.; Schnurr, M.; & Ashkenazi, A. (2014). *Inflammasome-dependent and -independent IL-18 production mediates immunity to the ISCOMATRIX adjuvant*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 192(7), 3259–3268.
  - Wilson, N. S.; Yang, B.; Morelli, A. B.; Koernig, S.; Yang, A.; Loeser, S.; Airey, D.; Provan, L.; Hass, P.; Braley, H.; Couto, S.; Drane, D.; Boyle, J.; Belz, G. T.; Ashkenazi, A.; & Maraskovsky, E. (2012). *ISCOMATRIX vaccines mediate CD8+ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway*. *Immunology and Cell Biology*, 90(5), 540–552.
  - Woronowicz, A.; De Vusser, K.; Laroy, W.; Contreras, R.; Meakin, S. O.; Ross, G. M.; & Szewczuk, M. R. (2004). *Trypanosome trans-sialidase targets TrkA tyrosine kinase receptor and induces receptor internalization and activation*. *Glycobiology*, 14(11), 987–998.
  - Yoshida, N. (2009). *Molecular mechanisms of Trypanosoma cruzi infection by oral route*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 101–107.
  - Yoshida, N.; Tyler, K. M.; & Llewellyn, M. S. (2011). *Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites*. *Trends in Parasitology*, 27(10), 459–466.

- Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R. S.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Miles, M. A.; Romanha, A. J.; Sturm, N. R.; Tibayrenc, M.; Schijman, A. G.; & Second Satellite Meeting. (2009). *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI*. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 104(7), 1051–1054.

## **Anexo**

**Artículo científico realizado durante la realización de la Tesis**





















