

Experimento preliminar en ratones BALB/c para desarrollar un tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica que combine un parasiticida y una vacuna Cha, Ulises

Laboratorio de tecnología inmunológica (LTI)

Director: Marcipar Ivan

Codirectora: Cacik Paula

Área: Ciencias Biológicas

Palabras Claves: Benznidazol, Tratamiento, Trypanosoma

Introducción:

La enfermedad de Chagas causada el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) afecta actualmente a más de 7 millones de personas (OMS 2017). En etapa crónica de la infección se pueden presentar distintos niveles de disfunción cardíaca e intestinal que disminuyen la calidad de vida y pueden causar la muerte (Rassi A. y col 2017). Si bien existen los fármacos Benznidazol (Bz) y Nifurtimox que tienen acción parasiticida muy efectiva en la infección aguda, estos son menos efectivos en la etapa crónica y su utilización no evidencia beneficios para prevenir la sintomatología de la enfermedad (Morillo C. y col 2015). Además, en las dosis utilizadas, estos fármacos desarrollan efectos secundarios graves que obligan a discontinuar su uso y, por lo tanto, afectan aún más su efectividad (Castro J. y col 2006). Por eso, se requiere investigar nuevas alternativas para el tratamiento del Chagas crónico. En ese sentido y en el marco de una investigación sobre un tratamiento efectivo de esta dolencia, en el Laboratorio de tecnología inmunológica (LTI) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), se propuso una terapia basada en la utilización mixta de parasiticida y vacuna. En trabajos previos, se determinó que una vacuna basada en la proteína la transialidasa (TS) de *T. cruzi* y el adyuvante ISPA permite aliviar los síntomas en ratones infectados en forma crónica por *T. cruzi* (Prochetto E. y col 2022). En el mismo trabajo se determinó que la administración de Benznidazol, aplicado en forma posterior a la vacuna durante un mes, mejora la respuesta al tratamiento. A pesar de haber sido efectivos en cuanto a disminuir lesiones en tejidos, dichos tratamientos aun requieren una optimización para lograr la eliminación completa del parásito con bajas dosis de Benznidazol para evitar sus efectos tóxicos y que logren un perfil de respuesta inmune beneficioso para el control de la enfermedad. Por eso, en esta oportunidad se propuso un nuevo esquema que consiste en administrar primero un tratamiento con una dosis subóptima de Bz, que, sin causar efectos secundarios, tiene como objeto disminuir la carga parasitaria y mejorar la respuesta inmune en la etapa crónica de la infección, tal como ya ha sido descrito (Bustamante JM. y col 2008). Luego de este primer tratamiento corto, se propone aplicar la vacuna terapéutica que, en función de lo antes mencionado, debería mejorar su desempeño en comparación con la aplicación inicial de la vacuna sin el tratamiento previo con Benznidazol. Finalmente, luego de la aplicación del esquema de vacunación y de esperar

PICT 2018-03462. Título: Uso terapéutico de la formulación vacunal Transialidasa-ISPA durante la fase crónica de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Investigador Responsable: Iván Marcipar.

PROYECTO CAI+D 2020 PI TIPO II. Título: Uso terapéutico de la formulación vacunal Transialidasa ISPA durante la fase crónica de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Investigador Responsable: Iván Marcipar

que estimule una respuesta inmune específica, se propone un segundo tratamiento con una dosis subóptima Bz que, sin causar efectos secundarios, y con la asistencia de la respuesta inmune desarrollada por la vacuna, permita la eliminación del parásito, o eventualmente, evite el desarrollo de las lesiones características de la enfermedad crónica, estableciendo un perfil de respuesta inmune efector/regulatorio balanceado. Para investigar esta estrategia, se llevó a cabo un primer paso exploratorio. El objetivo fue evaluar si, tal como ha sido descrito en otros modelos y condiciones experimentales (Bustamente y col 2008), un tratamiento con Bz iniciado en la etapa temprana de la infección crónica permite mejorar la respuesta inmune y reducir la carga parasitaria en el modelo animal de infección utilizado en el laboratorio.

OBJETIVOS

Con vistas a mejorar el tratamiento de vacuna terapéutica y Bz previamente descrito en el grupo de trabajo, se busca evaluar si un tratamiento adicional con Bz iniciado en la etapa temprana de la infección crónica a los 45 días post-infección (dpi), podría mejorar la respuesta inmune y reducir la carga parasitaria.

METODOLOGÍA

Este primer ensayo se conformó por grupos de ratones BALB/c infectados en forma intradérmica con 1000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen cl2. Un grupo compuesto por 6 ratones, recibió el tratamiento de Bz (grupo Bz) a los 46 dpi, utilizando la dosis subóptima de 100mg/kg durante 7 días consecutivos. Para verificar la eficacia de la respuesta inmune, se decidió comparar los parámetros inmunológicos del tratamiento con Bz y el de la vacuna. Esta comparación se realizó para determinar si efectivamente el benznidazol favorece una mejora en los parámetros inmunológicos en la etapa crónica de la infección con respecto al uso de la vacuna tal como se había aplicado en los experimentos previos realizados por el grupo de trabajo (Prochetto E. y col 2022). Por lo que se ensayó también, un grupo de 5 ratones que solo recibió la vacuna TSNT-ISPA (TSNT) a los días 46, 56 y 66 post infección. Como control de la evolución sin tratamiento, se incluyó un grupo de 5 ratones infectados, pero no tratados (PBS). A los 100 dpi los ratones fueron sacrificados para la obtención de muestras. Para estudiar el daño en tejidos, se analizaron los niveles de la transaminasa GOT y GPT. Además, se determinó el nivel de inflamación mediante la determinación de óxido nítrico en plasma y carga parasitaria en corazón mediante qPCR.

Se realizó una citometría de flujo con esplenocitos frescos y cultivados 15 horas totales con 10ug de homogenato de *T. cruzi* por well (6hs sin Stop Golgi + 9hs con Stop Golgi). Se co-cultivó con células dendríticas activadas para potenciar la presentación antigénica. Para tener información lo más amplia posible sobre la respuesta inmune obtenida y poder analizar la multifuncionalidad de las células con los distintos tratamientos, teniendo en cuenta los canales del citómetro (Accuri C6 plus) y a los anticuerpos disponibles, se decidió realizar dos marcaciones por separado. Por un lado, CD4, CD44, IL-10 e INF- γ y por otro, CD8, CD107, TNF- α e INF- γ (Fig. 2).

RESULTADOS

En lo que refiere al análisis de transaminasas y nivel de inflamación, el grupo PBS mostró valores más elevados que los grupos tratados presentando mayor significancia en los grupos Bz que TSNt (Fig. 1A, 1B, 1C). Lo mismo se observó para la medición de carga parasitarias en tejido cardíaco (Fig. 1D). En los resultados obtenidos de la citometría de flujo, se pudo observar una tendencia al incremento en el número absoluto de células de los grupos tratados con respecto al grupo control PBS, en particular se encontraron diferencias significativas en el número de Linfocitos T (LT) CD8+ (Fig. 2A), CD107+ (Fig. 2B), CD4+ (Fig. 2E), CD4+ productores de INF γ (Fig. 2G) y LT CD4+ secretores de IL-10 (Fig. 2H) del grupo Bz y diferencias significativas en los LT CD4+ productoras de INF- γ del grupo TSNt (Fig. 2C). El análisis de la multifuncionalidad de los esplenocitos mostró ser significativo en los dos grupos tratados con relación al no tratado (Fig. 2I).

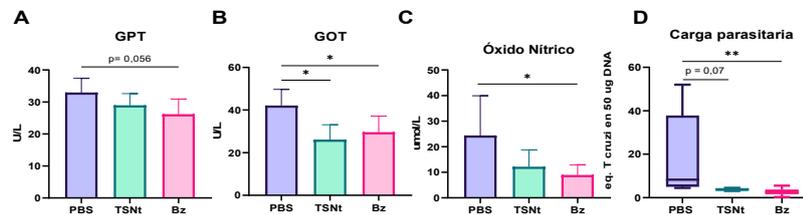


Figura 1: Evaluaciones post infección del experimento preliminar. **(A)** Niveles de transaminasa GPT en suero. **(B)** Niveles de GOT en suero ($p = 0,0140$ PBS vs TSNt, $p = 0,0430$ PBS vs Bz, Kruskal-Wallis test). **(C)** Niveles de óxido nítrico en suero ($p = 0,0388$ PBS vs Bz Kruskal-Wallis test). **(D)** Cuantificación de *T. cruzi* en tejido cardíaco por qPCR ($p = 0,0016$ PBS vs Bz, Kruskal-Wallis test).

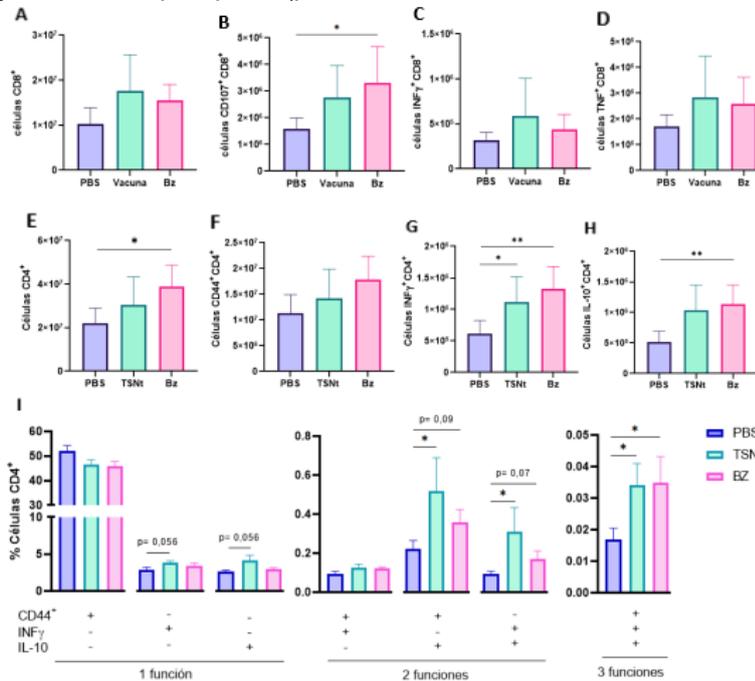


Figura 2: Poblaciones LT CD4+, CD8+ en los animales infectados y tratados del experimento preliminar. **(A)** Número absoluto de células CD8+ . **(B)** Número absoluto de células CD107+CD8+ . **(C)** Número absoluto de células INF γ +CD8+ . **(D)** Número absoluto de células TNF+CD8+ . **(E)** Número absoluto de células CD4+ en el bazo. **(F)** Número absoluto de células CD44+CD4+ . **(G)** Número absoluto de células INF γ +CD4+ . **(H)** Número absoluto de células IL-10+ CD4+ . **(I)** Proporción de perfiles funcionales en células T CD4+ con 1, 2 o tres funciones luego de estimular. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$, Kruskal-Wallis test, post test de Dunn).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que, en el modelo animal analizado, el tratamiento con dosis subóptimas de Bz en un lapso de 7 días o alternativamente la vacuna, generan una disminución del nivel inflamatorio, de la carga de parásitos en sangre y de daño en los tejidos. Además, la citometría de flujo arroja un aumento en la concentración de esplenocitos con respecto al grupo control y, en algunos casos (como en los LT CD4+ productores de INF- γ), mayor al grupo vacunado, a la vez que se presenta un aumento en la multifuncionalidad de estas células, con respecto al grupo control PBS. A partir de esta evidencia, se concluye que el tratamiento con Bz en la etapa crónica temprana de la infección permite similares resultados que la aplicación terapéutica de la vacuna para los parámetros que se evaluaron, siendo superior para el caso de los LTCD4+/INF γ y LTCD4+/IL-10 que son de interés para una respuesta inmune balanceada. En consecuencia, se proyecta ensayar el esquema completo propuesto consistente en una terapia que incluya un tratamiento corto de Bz inicial, luego la vacuna y finalmente un segundo tratamiento corto de Bz.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Bustamante, JM. Bixby, LM. Tarleton, RL. 2008. Drug-Induced Cure Drives Conversion to a Stable and Protective CD8+ T Central Memory Response in Chronic Chagas Disease. *Nature Medicine* 14, n.o 5.

Castro, JA. de Mecca, MM. Bartel, LC. 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 112(3): 224–235.

Morillo, CA. Marin-Neto, JA. Avezum, A. Sosa-Estani, S. Rassi, AJr. Rosas, F. Villena, E. Quiroz, R. Bonilla, R. Britto, C. Guhl, F. Velazquez, E. Bonilla, L. Meeks, B. Rao-Melacini, P. Pogue, J. Mattos, A. Lazdins, J. Rassi, A. Connolly, SJ. Yusuf, S. 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine* 373, n.o 14.

OMS. 2017. La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana) Nota descriptiva. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.

Prochetto, E. Bontempi, I. Rodeles, L. Cabrera, G. Vicco, M. Cacik, P. Pacini, MF. Pérez Ganeselli. M. Pérez, AR. Marcipar, I. 2022. Assessment of a combined treatment with a therapeutic vaccine and benznidazole for the *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Acta Trop.* 229:106334.

Rassi, A Jr. Marin, JA. Rassi, A. 2017. Chronic Chagas Cardiomyopathy: A Review of the Main Pathogenic Mechanisms and the Efficacy of Aetiological Treatment Following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) Trial. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 112.