



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL**  
UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Efecto de las dosis y adyuvante en la protección inducida por el gen TcSPR y las  
proteínas recombinantes TcENO y TcSPR en el modelo murino de la enfermedad de  
Chagas**

**T E S I S**

Que presenta:

**MARIAM SHISBELLYS TINOCO HERNÁNDEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Director de tesis:**

**Dr. José Luis Rosales Encina**

**Ciudad de México**

**Julio, 2023**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de biología molecular del departamento de Infectómica y Patogénesis molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección del Dr. José Luis Rosales Encina y la asesoría de la Dra. Patricia Talamas Rohana y el Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi

Durante la realización de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CINVESTAV por todo el apoyo recibido y ser el soporte para poder realizar mi maestría y al DIPM por tantas enseñanzas hacia el camino de la investigación

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

A mi director de tesis el Dr. José Luis Rosales Encina por darme la oportunidad de crecer en su laboratorio, por su apoyo incondicional, sus consejos, paciencia y dedicación.

A mis asesores la Dra. Patricia Talamas Rohana y al Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi por la orientación brindada, por sus consejos y apoyo.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, por abrirme las puertas de su laboratorio, por todo el apoyo durante mi proceso en el departamento y por siempre tener un abrazo cálido para regalarme.

Infinitas gracias a la Biól. Lidia Baylón Pacheco, por su apoyo incondicional en cada uno de los experimentos realizados en este trabajo, por su paciencia, por escucharme y por los consejos brindados. A la M. en C. Patricia Espíritu Gordillo por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo. A la Dra. María Angelica Burgos Reyes por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio, por sus asesorías en el desarrollo de mis experimentos y por su paciencia.

Finalmente, quiero agradecer a la Q.F.B Silvia Galindo Gómez, por su apoyo brindado en el procesamiento de muestras para tinción con H&E. A la Biól. Lizbeth Iliana Salazar Villatoro por su apoyo en el procesamiento de las muestras para microscopia electrónica de transmisión.

## DEDICATORIA

A mi familia, por ser los mayores forjadores de sueños, por su ejemplo, amor, paciencia, confianza, por darme la fuerza para continuar y por sus valiosos consejos.

A mi novio, por alegrarme la vida y acompañarme en toda esta montaña rusa de emociones. Gracias amor mío, por todo tu apoyo, por cuidarme, por aconsejarme, por escucharme, por todo tu amor y por creer en mí. Es un orgullo para mí tenerte en mi vida.

A mis amigos infinitas gracias por llenarme la vida de risas, felicidad, anécdotas y de mucho amor. Siempre estaré agradecida con la vida por haberlos puesto en mi camino.

Con mucho amor, por y para ustedes.

## Tabla de contenido

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. EPIDEMIOLOGÍA	3
1.2. CICLO DE VIDA	5
1.3. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN	6
1.3.1. <i>Transmisión vectorial</i>	6
1.3.2. <i>Transmisión por vía oral</i>	7
1.3.3. <i>Transmisión por transfusión sanguínea</i>	8
1.3.4. <i>Transmisión vertical</i>	8
1.4. RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>T. CRUZI</i>	8
1.6. DESARROLLO DE VACUNAS PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	14
1.6.1. <i>Vacunas de DNA para T. cruzi</i>	14
1.7. ADYUVANTES	16
1.7.1. <i>ADN CpG como adyuvante</i>	16
1.7.2. <i>Nanopartículas de hidróxido de aluminio como adyuvante</i>	17
1.8. ANTÍGENOS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS	19
<b>2. ANTECEDENTES PARTICULARES</b>	<b>21</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>48</b>

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Considerada por Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida, relacionada con la pobreza y las malas condiciones sanitarias. En México, se estima que hay alrededor de 1.1 millones de individuos infectados por *T. cruzi* y 29.5 millones están en riesgo de infectarse. Sus características clínicas la convierten en una enfermedad de difícil diagnóstico, manejo y tratamiento. Por lo tanto, los mecanismos de prevención de la enfermedad se han basado en el control de la transmisión y el diseño de nuevos fármacos, así como el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas. En los últimos años, se han realizado estudios probando diferentes antígenos del parásito para evaluar la eficacia de estos en el control de la infección. Se ha observado que la inmunización con ADN o proteínas recombinantes generan diferentes grados de protección. Con base en resultados previos, se planteó evaluar el efecto de la dosis en la inmunización con el gen TcSPR y el uso de nanopartículas de hidróxido de aluminio como adyuvante en la inmunización con las proteínas recombinantes rTcSPR y rTcENO en un modelo murino de la enfermedad de Chagas. Nuestros resultados sugieren que la inmunización con menor cantidad del DNA puede generar una protección contra la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, la efectividad de esta puede estar asociada con el inóculo de infección. La inmunización de las proteínas recombinantes acopladas a las nanopartículas, indujo una mayor producción de anticuerpos comparado con la inmunización de las proteínas recombinantes sin adyuvante, corroborando su capacidad de actuar como adyuvante. Sin embargo, se debe tener en cuenta los métodos de síntesis, las propiedades químicas, la cantidad de nanopartículas y la vía de administración para el diseño de las vacunas, ya que se ha observado que dichos parámetros juegan un rol importante en la eficiencia y en la citotoxicidad de los nanomateriales.

## ABSTRACT

Chagas disease or American trypanosomiasis is a parasitic disease caused by the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*. It is considered by the World Health Organization (WHO) as a neglected tropical disease, related to poverty and poor sanitary conditions. In Mexico, it is estimated that there are about 1.1 million individuals infected by *T. cruzi* and 29.5 million are at risk of infection. Its clinical characteristics make it a difficult disease to diagnose, manage and treat. Therefore, disease prevention mechanisms have been based on transmission control and the design of new drugs, as well as the development of prophylactic and therapeutic vaccines. Recently, studies have been carried out testing different antigens of the parasite to evaluate their efficacy in controlling the infection. It has been observed that immunization with DNA or recombinant proteins generates different degrees of protection. Based on previous results, we proposed to evaluate the effect of the dose in immunization with the TcSPR gene and the use of aluminum hydroxide nanoparticles as adjuvant in immunization with rTcSPR and rTcENO recombinant proteins in a murine model of Chagas disease. Our results suggest that immunization with a lower amount of DNA can generate protection against *T. cruzi* infection. However, its effectiveness may be associated with the inoculum of infection. Immunization of recombinant proteins coupled to nanoparticles induced higher antibody production compared to immunization of recombinant proteins without adjuvant, corroborating their ability to act as an adjuvant. Nonetheless, synthesis methods, chemical properties, amount of nanoparticles and route of administration should be taken into account for vaccine design, as these parameters have been observed to play an important role in the efficiency and cytotoxicity of nanomaterials.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana fue descrita desde 1909 por el médico e investigador Brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (da Costa et al., 2021). Es una enfermedad parasitaria causada por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) el cual, pertenece a la familia *Trypanosomatidae* y al orden *kinetoplastida* (Melo et al., 2020). Es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida, relacionada con la pobreza y las malas condiciones sanitarias. Dicha enfermedad, tiene un impacto a nivel de salud pública, ya que representa una de las enfermedades con más años de vida saludable perdidos por discapacidad en América Latina (Instituto Nacional de Salud, 2022).

La infección por *T. cruzi* puede presentar varias manifestaciones clínicas, iniciando con una fase aguda con una duración de aproximadamente dos meses, caracterizada por una elevada parasitemia. Durante esta fase, la mayoría de los casos son asintomáticos. Sin embargo, se pueden presentar manifestaciones clínicas como lesión cutánea (Chagoma), edema de párpados (signo de Romaña), anorexia, fiebre, cefalea, disnea, hepatoesplenomegalia, edemas, mialgias y miocarditis (Andrade & Andrews, 2005; Lidani et al., 2017).

La mayoría de las personas infectadas progresan a la fase crónica de la enfermedad, caracterizada por una baja parasitemia. Inicialmente entran a una forma asintomática prolongada, conocida como forma indeterminada ya que nunca desarrollan sintomatología relacionada con la enfermedad. Sin embargo, se estima que del 30-40% de los infectados crónicamente pasan a una fase sintomática donde presentan manifestaciones clínicas cardio-digestivas, siendo la miocardiopatía Chagásica la principal causa de miocarditis no isquémica en América Latina (Lidani et al., 2017; Rodríguez-Bejarano et al., 2021).

### 1.1. Epidemiología

Durante un tiempo la enfermedad de Chagas estuvo confinada en áreas rurales de América latina. Sin embargo, el patrón epidemiológico de la enfermedad ha cambiado, principalmente por la migración poblacional en las últimas décadas, y esto ha traído la propagación a países no endémicos, en particular a Estados Unidos, Canadá, países europeos y algunos africanos (Martins-Melo et al., 2021).

A nivel mundial se estima que hay entre seis y siete millones de personas infectadas por *T. cruzi*, 14,000 muertes al año y alrededor de 70 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2019). Asimismo, se considerada como una enfermedad endémica en 21 países de América Latina. Siendo la región del cono sur de América (Brasil, Argentina, Chile, Paraguay y Uruguay) la que presenta un mayor número de casos (Instituto Nacional de Salud, 2022). A nivel general, en América, la enfermedad presenta una incidencia anual de 30,000 casos con 12,000 muertes al año y 8,600 recién nacidos infectados durante la gestación (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2019).

En el caso particular de México, se estima que hay alrededor de 1.1 millones de individuos infectados por *T. cruzi* y 29.5 millones están en riesgo de infectarse (Arnal et al., 2019). Según datos epidemiológicos de la Secretaría de Salud, la enfermedad es prevalente en los 32 estados que conforman el país, observándose una mayor prevalencia en las zonas sur y sureste (Velázquez-Ramírez et al., 2022). Para el periodo de 2000-2012 se reportaron 5,463 casos de la enfermedad de Chagas, 247 fueron casos agudos, 171 crónicos sintomáticos y 5,045 casos crónicos asintomáticos. La tasa de incidencia para el periodo del 2000-2007 se mantuvo en 0.07 a 0.37 por 100,000 habitantes. Sin embargo, para el 2008-2012 ascendió de 0.61 a 0.70 por 100,000 habitantes. El mayor número de casos se presentó en Oaxaca con 161 casos, seguido de Guerrero con 53 casos, Chiapas con 20 casos, Ciudad de México con 16 casos y Veracruz con 12 casos. Para el mismo periodo, se reportaron 371 defunciones por enfermedad de Chagas, con una tasa de mortalidad de 0.02 por 100,000 habitantes (Secretaría de Salud, 2014).

En el año 2017 se notificaron 126 casos de Chagas agudo y 738 casos de Chagas crónico a través del boletín epidemiológico de la Dirección General de Epidemiología. El mayor número de casos se reportó en Veracruz con un 17.8%, seguido de Oaxaca y Yucatán con un 10.5% y 10.3% respectivamente. Estudios como el de Arnal et al., (2019) estimaron una prevalencia nacional para el periodo 2006-2017 de 3.38% lo que sugiere que en el país hay alrededor de 4.06 millones de casos de enfermedad de Chagas.

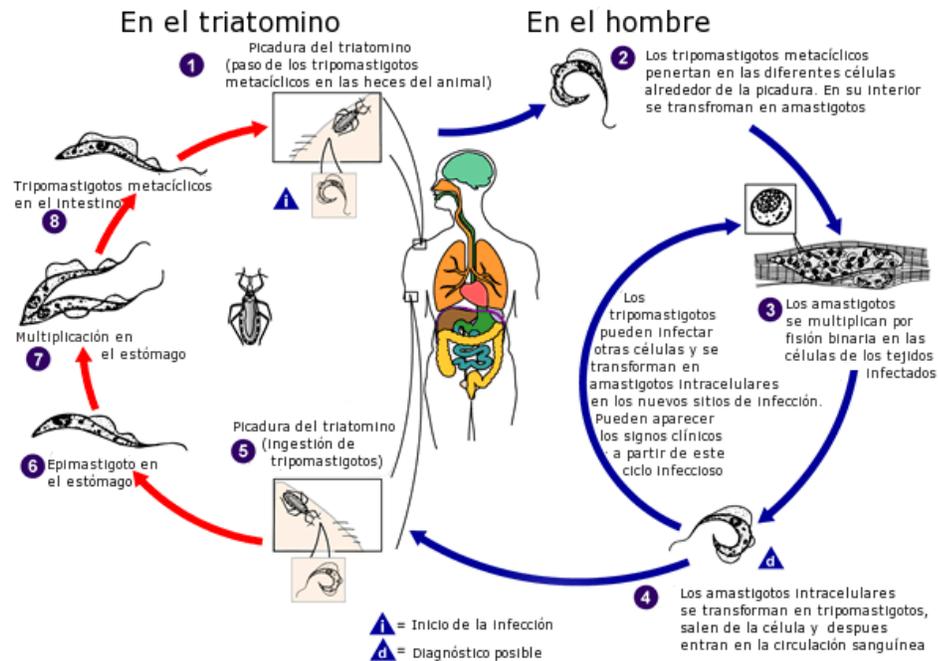
Para el periodo 2017-2019 la tasa de incidencia por estados para Chagas agudo varió entre 0.2 a 1.8 y para Chagas crónico entre 2 a 10 por cada 100.000 habitantes. Chiapas, Morelos y Guerrero presentaron un mayor número de casos con una tasa de incidencia de 1.8 para Chagas agudo. Mientras que, el estado que presentó un mayor número de casos

de Chagas crónico con una tasa de incidencia de 10, fue Yucatán (Velázquez-Ramírez et al., 2022).

## **1.2. Ciclo de vida**

*T. cruzi* presenta diferentes etapas de desarrollo durante su ciclo de vida que pueden ser replicativas y no replicativas, así como infectivas y no infectivas. En su hospedero mamífero se presentan dos etapas de desarrollo: amastigotes y tripomastigotes sanguíneos. Mientras que, en el insecto vector se encuentran: tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes. Los tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos son formas infectivas, no replicativas. Los epimastigotes son no infectivos y replicativos. Mientras que, los amastigotes son replicativos a nivel intracelular y se ha demostrado que también pueden ser infectivos (Mosquillo, 2017).

El ciclo de vida comienza en el huésped mamífero cuando los tripomastigotes metacíclicos contenidos en las heces del vector penetran a través de la herida generada por la picadura. Una vez dentro del hospedero se unen a receptores de células nucleadas fagocíticas y no fagocíticas, y son internalizados en la célula mediante vacuolas endocíticas llamadas vacuolas parasitóforas (PV). El medio se acidifica y los tripomastigotes se van diferenciando en amastigotes. El parásito secreta proteínas líticas lo que lleva a la ruptura de la vacuola parasitófora y, por ende, la liberación del parásito al citoplasma. Una vez libre, proliferan por fisión binaria. En este punto, los amastigotes se alargan, y vuelven a adquirir los flagelos largos y se diferencian en tripomastigotes sanguíneos que finalmente son liberados al torrente sanguíneo e invaden otras células. Asimismo, pueden ser ingeridos por el insecto vector y, transformarse en el intestino medio del insecto en epimastigotes, los cuales proliferan. Finalmente, los epimastigotes migran al intestino posterior del vector para diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos (Martín-Escolano et al., 2022; Mosquillo, 2017)



**Figura 1.** Ciclo de vida de *T. cruzi*. Un triatomo infectado se alimenta de sangre y libera tripomastigotes metacíclicos en sus heces cerca del sitio de la herida de la mordedura. Los tripomastigotes metacíclico ingresan al huésped a través de la herida o a través de membranas mucosas intactas, como la conjuntiva (1). Dentro del huésped, los tripomastigotes metacíclico invaden las células cercanas al sitio de inoculación, donde se diferencian en amastigotes intracelulares (2). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria (3) y se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, y luego se liberan a la circulación como tripomastigotes en el torrente sanguíneo (4). Los tripomastigotes sanguíneos infectan células de una variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en nuevos sitios de infección. El insecto vector se infecta al alimentarse de sangre humana o animal que contiene parásitos circulantes (5). Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector (6). Los parásitos se multiplican y diferencian en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior (8). Tomado de (CDC, 2019).

### 1.3. Mecanismos de transmisión

Aunque, la transmisión vectorial es la más importante, no es el único mecanismo de transmisión de *T. cruzi*. Se ha reportado que el parásito puede transmitirse por mecanismos no vectoriales, tales como transmisión por transfusiones sanguíneas, transmisión oral, transmisión vertical, trasplante de órganos, y por accidente de laboratorio, debido al mal manejo de material biológico infectado. Siendo los dos últimos menos frecuentes.

#### 1.3.1. Transmisión vectorial

En América Latina, la infección por *T. cruzi*, ocurre principalmente a través de la transmisión vectorial por insectos hematófagos pertenecientes a la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* y al géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, con 137 especies

distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina, de las cuales se estima que al menos 40 son capaces de hospedar a *T. cruzi*. La capacidad del vector para generar la infección humana va a depender de la tasa de infección de triatominos, el tiempo transcurrido entre la mordedura y la defecación, el número y cantidad de evacuaciones, número de parásitos eliminados y la intensidad de la picazón durante la mordedura (Lidani et al., 2017; Martínez, 2018).

Los triatominos son insectos que poseen adaptaciones conductuales, morfológicas y moleculares para alimentarse de diversos vertebrados durante su ciclo de vida, en el que pasa por cinco estadios ninfales hasta llegar a adulto. Por lo tanto, sus hábitos alimenticios garantizan que actúen como potenciales vectores de *T. cruzi* en cualquier etapa de desarrollo, permitiendo la transmisión de *T. cruzi* a aproximadamente 120 especies de mamíferos, incluidos los humanos. Reflejando así su naturaleza zoonótica, caracterizada por varios ciclos de transmisión en entornos domésticos y salvajes (Alarcón de Noya et al., 2022; Vieira et al., 2018). En el ciclo doméstico, la mayoría de los triatominos viven en nidos, gallineros, grietas y huecos de las casas en zonas rurales y suburbanas, donde permanecen ocultos durante el día y salen en horas nocturnas para alimentarse (Ramsey et al., 2015).

En México, se han reportado alrededor de 31 especies de triatominos, principalmente de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma*, *Panstrongylos*, *Dipetalogaster*, *Belminus*, *Eratyrusy*, *Paratriatoma*, de las cuales se han encontrado 21 infectadas naturalmente con *T. cruzi* (Martínez, 2018).

### **1.3.2. Transmisión por vía oral**

La transmisión oral es uno de los mecanismos más importantes en la Amazonía Brasileña donde se estima que para el 2000 al 2013 el 70% de los casos se dieron por transmisión oral. Sin embargo, otros países latinoamericanos como Colombia, Venezuela, Bolivia, Argentina y Ecuador han reportado brotes asociados al consumo de alimentos contaminados con tripomastigotes metacíclicos. Se han asociado alimentos como carnes, verduras, extracto de caña de azúcar, pulpa de acai, jugo de guayaba, vacaba y vino de palma (Silva-dos-Santos et al., 2017).

Se ha sugerido que la glicoproteína gp82 de *T. cruzi* interacciona con la mucina gástrica promoviendo la invasión y replicación en las células epiteliales de la mucosa, permitiendo una mayor difusión sistémica del parásito. Esto se ha relacionado con la severidad de las

manifestaciones clínicas de este mecanismo de transmisión, tales como fiebre, dolor de cabeza, edema facial y de extremidades inferiores, mialgias, meningoencefalitis y afección cardiaca. Se estima que la tasa de mortalidad de este mecanismo en las dos primeras semanas de infección es del 8 al 35%, siendo más alta que la tasa de mortalidad de la transmisión vertical (Silva-dos-Santos et al., 2017).

### **1.3.3. Transmisión por transfusión sanguínea**

La transfusión sanguínea es el principal mecanismo de transmisión en los países no endémico. Se estima que el riesgo de adquirirla por dicho mecanismo es del 10 al 20% y depende de la parasitemia del donante, el componente sanguíneo transfundido, estado inmunitario del receptor y el genotipo de *T. cruzi* involucrado. El parásito tiene la capacidad de sobrevivir a largos periodos de tiempo en diferentes componentes sanguíneos. Se estima que los periodos de sobrevivencia van de 18 días a 4 °C hasta 250 días a temperatura ambiente (Angheben et al., 2015).

### **1.3.4. Transmisión vertical**

La enfermedad de Chagas congénita se caracteriza por ser una infección aguda asintomática en recién nacidos. Sin embargo, algunos recién nacidos pueden presentar patologías crónicas, tales como miocarditis, meningoencefalitis y/o dificultad respiratoria. El desarrollo de la enfermedad congénita va a depender de la interacción entre el parásito, la placenta, el sistema inmune materno y la respuesta inmune neonatal en desarrollo. Este mecanismo de transmisión materno-fetal ha generado interés en países endémicos donde se ha controlado la transmisión vectorial, ya que se estima que representa el 22% de los casos nuevos. Asimismo, en los países no endémicos se estima que los casos nuevos son el resultado de dicho mecanismo de transmisión (Kemmerling et al., 2019).

## **1.4. Respuesta inmune contra *T. cruzi***

La respuesta inmune innata y adaptativa son importantes para el control de la infección por *T. cruzi*. Con respecto a la inmunidad innata, esta se caracteriza por una fuerte activación de un perfil proinflamatorio, que incluye la expresión de IFN- $\gamma$ , el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6 y la producción de óxido nítrico (NO). Dicha respuesta suprime la replicación y propagación del parásito (Kayama & Takeda, 2010).

En relación con los mecanismos inmunes innatos activados por el parásito, se ha evidenciado que el sistema de complemento, es el principal obstáculo para el establecimiento de la infección y es un mediador entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Anteriormente, se ha demostrado que todas las formas de *T. cruzi* pueden

activar el sistema de complemento. Sin embargo, solo los epimastigote y algunas cepas de tripomastigotes metacíclicos son susceptibles a la actividad efectora del complemento (Acevedo et al., 2018; Lidani et al., 2017).

A través de la identificación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) *T. cruzi* puede activar el sistema de complemento por las tres vías: clásica, lectina y alternativa. La vía clásica es activada cuando el complejo C1 reconoce anticuerpos específicos de tipo IgM e IgG en la superficie del parásito. Por otro lado, la vía de las lectinas se activa cuando la lectina se use a la Manosa (MBL por sus siglas en ingles) y ficolinas reconocen glicoproteínas y carbohidratos presentes en la superficie del parásito, esta interacción genera cambios conformacionales en MBL y ficolinas, y activa a la serin-proteasas asociadas a multidominios (MASP-1 y MASP-2 por sus siglas en ingles), que dividen a C4 en C4a y C4b y a C2 en C2a y C2b, generando la convertasa de C3 (C4b2a). Finalmente, la vía alternativa es activada por la hidrólisis espontanea de C3; donde C3b se deposita en la superficie del parasito y es el soporte de la convertasa de C3. Así, todas las vías convergen en la formación de la convertasa de C3, la cual se divide en C3a y C3b, continuando la cascada enzimática que lleva a la formación de la convertasa de C5 que a su vez se divide en C5a y C5b. Este último, se ancla a la superficie del patógeno, reclutando a C6, C7 y C8, formando el complejo de ataque de membrana (MAC, por su siglas en ingles), lo que induce la lisis del patógeno (Lidani et al., 2017; Ramírez-Tolosa et al., 2021).

Como se mencionó anteriormente, la activación del sistema del complemento induce la formación de fragmentos peptídicos como C4a, C3a y C5a, que son anafilotoxinas importantes para la migración y activación de células inflamatorias, como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Estas células de la inmunidad innata reconocen al parásito a través de los receptores de reconocimiento de patógeno (PRRs), específicamente los receptores tipo *Toll* (TLR) 2, 4, 7 y 9. *T. cruzi* presenta una variedad de moléculas que pueden activar los TLR, tales como el glicoinositolfosfolípido (GIPL), las moléculas de superficie tipo mucina, secuencias de DNA y RNA. Así, GPI es reconocida por el receptor TLR2, GIPLs es reconocido por el receptor TLR4. Por otra parte, el DNA del parásito que contiene motivos CpG y el RNA son reconocidos por los receptores TLR9 y TLR7, respectivamente. Una vez se genera dicho reconocimiento, los TLR transmiten señales a través de dominios citoplasmáticos, lo que permite el reclutamiento de moléculas adaptadoras, incluida MyD88, que induce la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, lo que lleva

a la producción de IL-12 y a una polarización de una respuesta de tipo Th1 que finalmente inducirá la síntesis de IFN- $\gamma$  (Cardoso et al., 2016; Lidani et al., 2017).

La activación de las células fagocíticas, especialmente macrófagos, induce la activación de la óxido nítrico sintetasa, lo que genera la producción del radical NO a partir de L-arginina, este radical reacciona en el fagolisosoma con el radical  $O_2$  generando el radical peroxinitrito, del cual se generan especies radicales secundarias que favorecen el ambiente oxidativo. Por otra parte, los neutrófilos estimulados por *T. cruzi* son capaces de generar trampas extracelulares o NETs compuestas de ADN, histonas y elastasa. Estas estructuras inmovilizan una amplia gama de patógenos, y se ha evidenciado que el contacto de *T. cruzi* con los NETs puede limitar la infección. Asimismo, se demostró que la activación de este mecanismo es dependiente del estrés oxidativo e induce la activación a través de TLR2 y TLR4 (Sousa-Rocha et al., 2015).

Otras células de la inmunidad innata que desempeñan un papel importante durante la infección por *T. cruzi* son las células asesinas naturales (NK). La IL-12 producida por las células fagocíticas, activa a las células NK y estimula la liberación de IFN- $\gamma$ , lo que permite la activación de los macrófagos y sesga la respuesta hacia un perfil Th1. Las células NK pueden reconocer directamente células del huésped infectadas, lo que resulta en la lisis de la célula empleado exocitosis de gránulos citotóxicos como perforinas y granzimas (Lieke et al., 2004).

En cuanto a las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) profesionales, que tienen un papel fundamental en la captura, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T (Gutiérrez et al., 2020). Una vez activadas, estas células migran a los órganos linfoides secundarios, a través de CCR7 donde presentan antígenos a las células T y producen citocinas como IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-6 que permiten la activación y liberación de los linfocitos T específicos de antígeno. La interacción de las células DC y los linfocitos T se lleva a cabo por el complejo principal de histocompatibilidad (MCH clase I o MHC clase II) con los receptores de células T (TCR) y con moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD83 y CD86 que interactúan con ligandos coestimuladores de las células T, proporcionando las señales para la dar lugar a la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T. Los péptidos generado por los amastigotes presentes en citoplasma se importan al retículo endoplásmico (ER) para ser presentados a las células T CD8<sup>+</sup> en el contexto de las moléculas MHC clase I. Por lo otro lado, los péptidos generados por fagocitosis se cargan en la hendidura de unión del MHC

clase II y se presentan complejos péptido-MHC en la superficie de la célula huésped a la célula T CD4<sup>+</sup>. La activación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> genera la expansión y diferenciación en células T efectoras y de memoria (Ferragut et al., 2021).

Debido a que *T. cruzi* se replica a nivel intracelular en su huésped, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son esenciales para el control de la infección, ya sea por la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  o por su actividad citotóxica contra las células infectadas. Por último, Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentan diferentes tipos de subpoblaciones (Th1, Th2, Th17, Tregs, ThF) según la citocina secretada. La citocina IL-12 secretada por las células dendríticas, estimula la polarización de las células T CD4<sup>+</sup> hacia una subpoblación Th1. Estas células secretan principalmente IFN- $\gamma$  y tienen un papel importante en el control de las infecciones intracelulares debido a la liberación de citocinas tipo Th1, la activación de los linfocitos T citotóxicos, estimula la proliferación de células B y amplifica la actividad fagocítica de los macrófagos. Se ha demostrado que una respuesta coordinada de tipo Th1/Th2, siendo predominante la respuesta Th1 genera el control o eliminación del parásito (Acevedo et al., 2018).

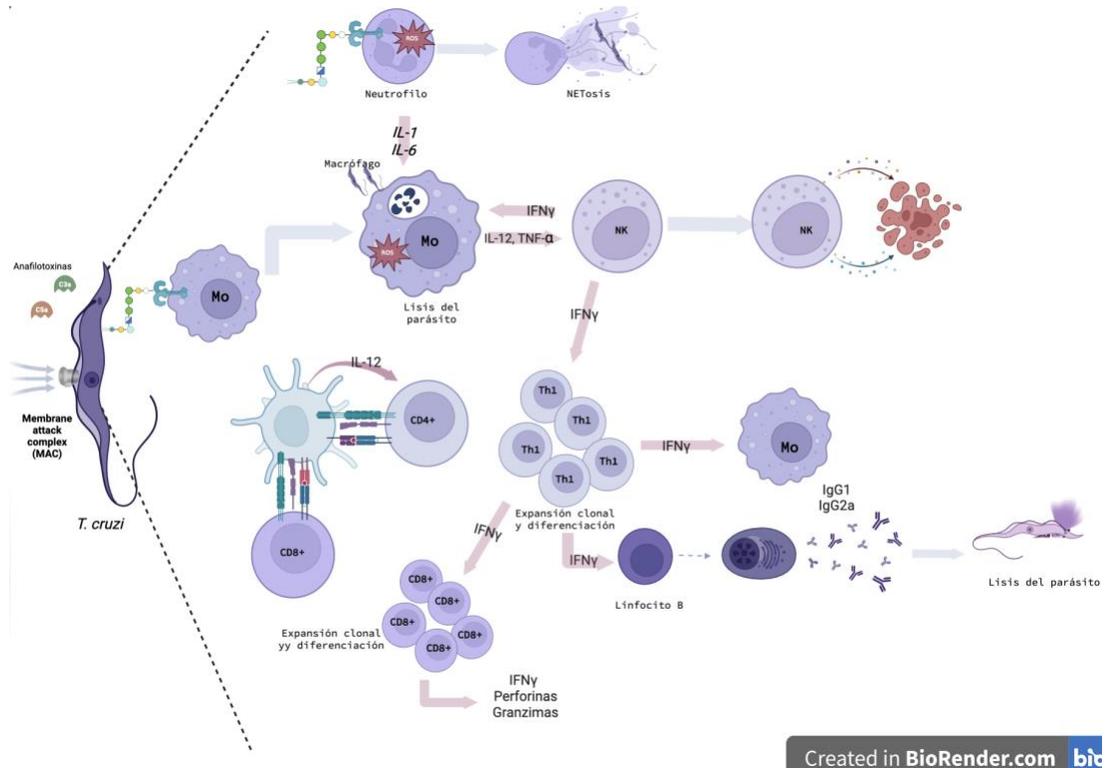


Figura 2. Respuesta inmune innata y adquirida durante la infección por *Trypanosoma cruzi*

Finalmente, los linfocitos B activados son las células efectoras de la inmunidad humoral, las cuales median la secreción de diferentes clases de inmunoglobulinas contra un antígeno específico. Sin embargo, estas células tienen diferentes funciones independientes de anticuerpos, tales como su rendimiento como APC o secreción de citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF e IFN- $\gamma$  que modulan la respuesta inmune asociada con la infección por *T. cruzi*. Asimismo, se ha demostrado que durante la infección por *T. cruzi* los linfocitos B son capaces de producir IL-17 por acción de las trans-sialidasas. También se ha demostrado que los linfocitos B participan en la inmunomodulación y polarización de linfocitos T CD4+ (Somoza et al., 2022).

Es importante mencionar que la inflamación sistémica robusta, la lisis celular y la muerte de parásitos generan daño al tejido del huésped. Por lo tanto, se activan vías reguladoras que amortiguan la respuesta inflamatoria. En conjunto, la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria son importantes durante la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, esta respuesta no es lo suficientemente efectiva para la eliminación completa del parásito, debido a que este ha desarrollado varios mecanismos para evadir el sistema inmunológico del huésped (Acevedo et al., 2018).

### **1.5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune *T. cruzi***

*T. cruzi* ha evolucionado y desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped con el fin de garantizar su sobrevivencia, disminuir el daño causado al hospedero y mantener la transmisibilidad a su vector hematófago.

El parásito presenta muchas moléculas de mucina en su superficie, que son proteínas de membrana acoplada a GPI, las cuales participan en los procesos de adhesión del parásito y en procesos de evasión de la respuesta inmune. La abundancia de dichas moléculas puede ser importante para estimular células dendríticas de manera dependiente de TLR2, lo que lleva a un efecto inmunoregulador y puede contribuir a la respuesta inmune retardada contra el parásito. Asimismo, se ha evidenciado que los glicoinositolfosfolípidos (GIPL) que contienen ceramida inducen apoptosis y regulan la actividad de los macrófagos y las células dendríticas (Cardoso et al., 2016).

Para establecer una infección productiva en los macrófagos, el parásito debe soportar los agentes oxidantes producidos por el macrófago para su eliminación. Para ello, *T. cruzi* cuenta con una red metabólica antioxidante, compuesta por varias enzimas y moléculas

no enzimáticas distribuidas en diferentes compartimentos subcelulares, como las peroxidases. Se han descrito cinco peroxidases: triparedoxinas peroxidases citosólicas (TcCPX) y mitocondriales (TcMPX), encargadas de detoxificar al peroxinitrito y al peróxido de hidrogeno a peróxidos e hidroperóxidos lipídicos. La hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (TcAPX) que le otorga resistencia al peróxido de hidrogeno y, por último, la glutatión peroxidasa I y II que permiten la sobrevivencia del parásito (Acevedo et al., 2018; Cardoso et al., 2016). Una vez que el parásito escapa del fagolisosoma, y alcanza al citosol, se diferencia a la forma de amastigote. Posteriormente, se da la ruptura de la células y salen los tripomastigotes a torrente sanguíneo, donde son diana para la lisis mediada por el sistema del complemento y para la opsonización. *T. cruzi* expresa proteínas de superficie que le permiten eludir la lisis mediada por el complemento, entre ellos la calreticulina (TcCRT), el factor de aceleración de la descomposición de los tripomastigotes (T-DAF), la proteína reguladora del complemento de *T. cruzi* (TcCRP), el inhibidor del receptor C2 del complemento de *T. cruzi* (TcCRIT) y gp58/68. Las cuales, perturban la unión de las moléculas del sistema de complemento, inhibiendo la formación de la convertasa de C3, siendo esta un paso crucial para la activación de las diferentes vías del sistema de complemento (De Bona et al., 2018; Ramírez-Tolosa & Ferreira, 2017).

Por otro lado, se ha evidenciado que *T. cruzi* puede modular la función de las células dendríticas al secretar factores solubles que inducen un perfil tolerógeno al disminuir la producción de IL-12 y TNF alfa. Asimismo, se ha demostrado que inducen disminución de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, y la expresión del co-receptor CD40, disminuyendo así la capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas. Estos efectos se han atribuido al GIPL producido por el parásito (Acevedo et al., 2018).

Además, se ha evidenciado que en la fase inicial de la infección el parásito estimula la activación policlonal de linfocitos B y la consecuente hipergammaglobulinemia, debido a la expresión simultánea de diversas proteínas de superficie altamente inmunogénicas y polimórficas. Asimismo, el parásito expresa proteínas que estimulan y actúan como mitógenos policlonales de los linfocitos. Lo anterior, genera anticuerpos inespecíficos incapaces de controlar la infección (Cardoso et al., 2016).

Finalmente, se ha evidenciado que *T. cruzi* reduce la frecuencia de linfocitos T CD8+ efectores, a través de la inmunodominancia. A pesar de la inmunogenicidad de las proteínas de superficie del parásito, los linfocitos T CD8+ únicamente reconocen un número escaso

de epítomos de dichas proteínas, siendo las tran-sialidasas los principales antígenos inmunodominantes. Asimismo, estas proteínas inhiben la expansión de linfocitos T CD4+ favoreciendo la secreción de citocinas de un perfil Th2, tales como IL4 (Acevedo et al., 2018; Cardoso et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, *T. cruzi* presenta estrategias de escape del sistema inmunológico del huésped, lo que permite la persistencia y el establecimiento del parásito, conduciendo al desarrollo de la miocardiopatía chagásica (De Bona et al., 2018). Asimismo, la ausencia de tratamiento eficiente durante la fase crónica se han convertido en una limitante para el control de la enfermedad. Es por esto que actualmente, los mecanismos de prevención de la enfermedad se han basado en el control de la transmisión y el diseño de nuevos fármacos más eficaces y menos tóxicos, así como el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas (Bivona et al., 2020).

#### **1.6. Desarrollo de vacunas para la enfermedad de Chagas**

Actualmente, no existe ninguna vacuna para prevenir la enfermedad de Chagas. Sin embargo, se han aislado varios antígenos de *T. cruzi* para evaluar diferentes vacunas experimentales, tales como, parásitos vivos atenuados, *Trypanosoma rangeli* (protozooario no patógeno), parásitos muertos, proteínas recombinantes, proteínas nativas purificadas y vacunas de DNA (Bivona et al., 2020).

##### **1.6.1. Vacunas de DNA para *T. cruzi***

Una vacuna de DNA puede generar inmunidad tanto humoral como celular. Consiste en un plásmido vector que contiene genes que codifican para antígenos inmunogénicos y que están bajo la regulación de un promotor de células eucarióticas. El blanco principal de la vacuna de DNA son los miocitos y las células presentadoras de antígenos. Aquí, el plásmido ingresa al núcleo de la célula huésped, el gen de interés se transcribe y se traduce con la maquinaria de la célula huésped. Una vez sintetizadas las proteínas, los péptidos son presentados a través de MHC de clase I y clase II para la activación de las células T. Por otro lado, las secuencias CPG no metiladas presentes en el vector permiten estimular la respuesta inmune innata (Chavda et al., 2021).

Las proteínas de superficie de *T. cruzi* cumplen un papel importante en la interacción parásito-huésped. Dicha interacción es necesaria para la infección, supervivencia y proliferación del parásito. Debido a esto, se consideran factores inmunogénicos y de virulencia más probables para la activación del sistema inmune y, por ende, como antígenos

potenciales para el desarrollo de vacunas eficaces contra el parásito (Maldonado et al., 2022). La familia de las trans-sialidasas es un grupo de proteínas ampliamente estudiado y se han convertido en uno de los antígenos más prometedores para la generación de vacunas contra el parásito.

Diversos estudios han reportado que la inmunización con DNA que contiene genes que codifican para antígenos de trans-sialidasas o antígenos secretores como Tc24 generan protección en modelos murinos. Se han identificado a las proteínas ASP-1, ASP-2 Y TSA-1 ancladas a la membrana por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) como inductoras de linfocitos T citotóxicos CD8+ y de una fuerte respuestas de anticuerpos. La inmunización con uno de estos genes evidenció una protección eficaz contra la infección por *T. cruzi* en un modelo murino; Garg & Tarleton, (2002) demostraron que la coadministración de genes ASP-1, ASP-2 y TSA-1 con genes de interleucina-12 en ratones C57BL/6 generan un aumento en la respuesta inmune y, por ende, una mayor resistencia a la infección. Trabajos posteriores como el de Zapata-Estrella et al., (2006) demostraron que la inmunización con TSA-1 genera un aumento de linfocitos T CD4+ y CD8+ durante la fase aguda, mientras que, en la fase crónica hay un incremento de CD8+ permitiendo confirmar que la inmunización con el plásmido que contiene el gen TSA-1 es capaz de controlar la infección en un modelo murino. Por otro lado, se ha evaluado la utilización de una vacuna de DNA que codifica para el Tc24 en un modelo murino de la enfermedad de Chagas. Los resultados obtenidos demuestran una reducción en la carga parasitaria, una supervivencia del 83% y una disminución de parásitos en tejido cardíaco durante la fase crónica Dumonteil et al., (2004). Así mismo, se ha evaluado el uso de una vacuna bivalente compuesta por dos antígenos TSA-1 y Tc24 y se observó que la inmunización con estos antígenos puede disminuir el daño al tejido cardíaco y el número de parásitos en tejido en modelos murinos Sanchez-Burgos et al., (2007).

Otro antígeno candidato importante es el antígeno de superficie de amastigote 2 (ASP-2). Estudios realizados por Boscardin et al., (2003) demuestran que la inmunización de ratones BALB/C con plásmidos que contenían genes específicos contra *T. cruzi* generó anticuerpos específicos y células CD4+. Asimismo, los antígenos TcG1, TcG2 y TcG4 que se expresan en la superficie de tripomastigotes y amastigotes son de interés para el desarrollo de vacunas. Según estudios realizados por Bhatia & Garg, (2008) la inmunización con vacunas de DNA que codifican los genes TcG1, TcG2 y TcG4, y con IL-12 son capaces de inducir anticuerpos líticos, respuesta de células T CD8+ y citotoxinas que protegen a los

ratones de la parasitemia y del daño al tejido cardiaco en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Finalmente, Arce-Fonseca et al., (2011) utilizaron un gen que codifica para la proteína de superficie de amastigotes (TcSSP4) para desarrollar una vacuna de DNA. Inmunizaron ratones BALB/c con la proteína recombinante y con el cDNA para Tc SSP4. Demostraron que la inmunización con el cDNA controló la fase aguda de la infección. Asimismo, observaron que el tejido cardiaco de los animales vacunados no mostró miocarditis ni daño tisular en comparación con el de los animales de control.

Es importante mencionar, que para lograr una vacuna eficaz y segura para prevenir la enfermedad de Chagas o cualquier enfermedad infecciosa, es importante contar con adyuvantes, ya que juegan un papel importante en la inducción de una respuesta inmune efectiva.

### **1.7. Adyuvantes**

Los adyuvantes son agentes no específicos capaces de potenciar la magnitud, amplitud, calidad y longevidad de la respuesta inmunitaria a través de las asociaciones físicas o químicas con el antígeno. Una vez se mezclan con un antígeno determinado cumplen funciones específicas; promueven la respuesta inmune estabilizando o atrapando el antígeno generando una respuesta inflamatoria en el sitio de inoculación del antígeno y finalmente, presentando señales co-estimuladoras a las células T y B que permite mejorar la inducción de la inmunidad específica (Nazarizadeh et al., 2022).

Se han utilizado múltiples compuestos sintéticos y naturales como adyuvantes, sin embargo, pocos han sido aceptados para el uso en humanos. Dentro de los adyuvantes aprobados para el uso de vacunas en humanos se encuentran las sales de aluminio, virosomas, MPL, AS03, AS04, MF59 (Cárdenas-Vargas, et al., 2016).

Actualmente, se han estudiado nuevos compuestos con potencial actividad de adyuvantes, que se encuentran en estudio clínico o preclínico. Dentro de estas encontramos: ADN CpG, ligandos TLR, saponina, nanopartículas, microesferas y partículas tipo virus (VLPs) (Cárdenas-Vargas, et al., 2016).

#### **1.7.1. ADN CpG como adyuvante**

Los oligonucleótidos CpG (ODN) son secuencias de DNA sintéticas que asemejan los motivos repetidos CpG no metilados del DNA bacteriano, diseñados para estimular el

receptor tipo Toll tipo 9 (TLR-9) y generar una respuesta inmune innata caracterizada por la producción de citocinas proinflamatorias, lo que indirectamente apoya la diferenciación, maduración y proliferación de células asesinas naturales (NK), células T y macrófagos. El tratamiento con CpG ODN regula positivamente genes relacionados con la respuesta inmunitaria (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , TLR-9 y TNF- $\alpha$ ), señalización celular (NF-k B, MYD88, IRAK3) y movimiento celular (NAP-1, EGFR) (Bode et al., 2011).

Existen cuatro clases distintas de CpG ODN (Tipo K, C, D y P). Todas presentan al menos un motivo CpG, pero con variaciones en su estructura y en su actividad inmunológica. Los ODN tipo K codifican múltiples motivos CpG en un esqueleto de fosforotioato, lo que mejora la resistencia a la digestión con nucleasas. Este tipo de ODN desencadena la diferenciación de las células dendríticas plasmocitoides y la proliferación de células B para secretar IgM. En cuanto a los ODN de tipo D contienen un único motivo de CpG y están contruidos en un esqueleto mixto de fosfodiéster/fosforotioato y desencadenan la maduración de las células dendríticas plasmocitoides y secreten IFN- $\alpha$ , pero no tienen efecto sobre las células B (Bode et al., 2011).

Por otro lado, los de tipo C presentan ciertas características con los de tipo K y tipo D. Este tipo de ODN estimulan a las células B para secretar IL-6 y a las células dendríticas plasmocitoides para la secreción de IFN- $\alpha$ . Finalmente, los ODN de tipo P activan células B y células dendríticas plasmocitoides con secreción de IFN - $\alpha$  (Bode et al., 2011).

### **1.7.2. Nanopartículas de hidróxido de aluminio como adyuvante**

Hay dos tipos de adyuvantes de aluminio utilizados en las vacunas humanas, el adyuvante de hidróxido de aluminio y el adyuvante de fosfato de aluminio (HogenEsch et al., 2018). Durante muchos años se han utilizado los adyuvantes que contienen aluminio en vacunas humanas, debido a su perfil de seguridad. Sin embargo, estos adyuvantes solo potencian una débil o moderada respuesta de anticuerpos específicos para el antígeno, siendo incapaces de ayudar a inducir una respuesta inmune celular. Por lo tanto, no es recomendable su uso para vacunas contra patógenos intracelulares (Li et al., 2014; Nazarizadeh et al., 2022).

Los adyuvantes basados en aluminio (Al) forman micropartículas de tamaños que oscilan entre 0.5 - 10  $\mu\text{m}$  e inducen respuesta inmune tipo Th2. Sin embargo, recientemente se ha evidenciado la importancia del tamaño del material adyuvante. Ya que, el uso de partículas a nanoescala permite modificar la adyuvancia del Al induciendo una respuesta inmune más

equilibrada Th1/Th2, robusta y duradera asociada a un mayor número de células T citotóxicas (Nazarizadeh et al., 2022).

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas inorgánicas como el oro, el aluminio y el hierro permiten su empleo como adyuvantes eficientes. Su tamaño facilita una mayor eficiencia en la acumulación en los ganglios linfáticos y a nivel tumoral. Asimismo, en su superficie se pueden cargar cantidades de otros adyuvantes, como CpG, permitiendo que se generen respuestas inmunitarias más fuertes. Se ha demostrado que las nanopartículas de aluminio presentan numerosas ventajas en comparación con las micropartículas, convirtiéndolas en un adyuvante importante para el desarrollo de vacunas para enfermedades infecciosas o como inmunoterapia contra el cáncer (Nazarizadeh et al., 2022).

Los mecanismos de acción por el cual los adyuvantes de aluminio potencian la respuesta inmune no se han dilucidado por completo. Sin embargo, se ha encontrado que los adyuvantes que contienen aluminio pueden aumentar la respuesta inmune por estimulación directa o indirecta de las células dendríticas, por la activación del complemento y por la liberación de citocinas (Li et al., 2014).

Los adyuvantes de aluminio aumentan el transporte de antígenos a través de las células dendríticas migratorias desde el lugar de la inyección hasta el ganglio linfático de drenaje y activan las células dendríticas, lo que resulta en la secreción de IL-1 $\beta$  y una presentación de antígeno más eficiente, debido a que, los adyuvantes de aluminio activan el inflamasoma NLRP3 que emplea pro-caspasa-1 para la maduración de las citocinas IL-1  $\beta$  e IL-18. Por otro lado, activan las vías de la cascada del complemento siendo predominantemente activada la vía alternativa. Esto genera la liberación de C3a y C5a que actúan reclutando células inflamatorias al lugar de la inyección, y la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC, por sus siglas en inglés) que puede inducir la activación del inflamasoma NLP3 (HogenEsch et al., 2018).

Otro parámetro importante a considerar a la hora de diseñar vacunas es el antígeno. En el laboratorio se han utilizado diferentes antígenos para el desarrollo de vacunas de DNA y proteínas, los cuales se describen a continuación

## **1.8. Antígenos utilizados para el desarrollo de vacunas**

### **1.8.1. Proteína TcSP**

La proteína TcSP es miembro de la superfamilia de las transialidasas. Contiene un sitio de GPI de anclaje a la membrana. Asimismo, presenta tres dominios SPA (1367pb), SPR (758 pb) y SPC (317 pb). Estudios han demostrado que la proteína se encuentra expresada en los tres estadios (amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes) del parásito. TcSP presenta una homología del 21% al 26% con otros miembros propuestos como candidatos vacunales (TS, TSA1, ASP-1 and ASP2) (Salgado-Jiménez et al., 2013).

La familia de las trans-sialidasas (TS) contiene 1430 genes y 693 pseudogenes. Se clasifican en ocho grupos de acuerdo con motivos y actividades específicas. Los TS se distribuyen a lo largo del cuerpo celular, el flagelo y el bolsillo flagelar (Pech-Canul et al., 2017). Todos sus miembros comparten el motivo VTxNVxLYNR, aunque algunos pueden presentar una variación de dicho motivo (Herrerros-Cabello et al., 2020)

La actividad catalítica de trans-sialidasa es la función que está mejor caracterizada e implica la transferencia de ácido siálico de los glicoconjugados del huésped a las mucinas del parásito presentes en su membrana plasmática. Hay estudios que demuestran que *T. cruzi* no puede sintetizar su propio ácido siálico y, por lo tanto, utiliza las TS. La sialidación le confiere una capa cargada negativamente que le otorga protección a los tripomastigotes contra anticuerpos humanos anti-  $\alpha$  galactosil. Por otro lado, también se ha descrito una función de neuraminidasa dentro de la superfamilia. La cual, ocurre cuando hay moléculasceptoras no adecuadas para el ácido siálico (Herrerros-Cabello et al., 2020; Pech-Canul et al., 2017).

### **1.8.2. Proteína Enolasa**

La enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa) es una enzima que se encarga de catalizar el 2-fosfoglicerato (PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP) durante la glucólisis. Asimismo, se encarga de la reacción inversa en la gluconeogénesis. Es considerada una metaloenzima, ya que requiere de cationes metálicos que actúan como cofactores, siendo el magnesio el cofactor por excelencia. Sin embargo, puede ser activada por el Manganeso, Zinc, Cadmio, Cobalto y Níquel. Debido a que la enolasa es una enzima que participa en el penúltimo paso de la vía glucolítica, se encuentra ampliamente distribuida en todos los organismos consumidores de glucosa. Por lo tanto, es una proteína que se expresa en el citosol de muchos organismos (Arce-Fonseca et al., 2018; Ponce, 2017).

Además de sus funciones metabólicas se ha evidenciado que cumple otras funciones, entre las cuales se encuentra su papel como proteína receptora del plasminógeno. Esto, debido a que además de expresarse en el citosol también lo hace a nivel de la superficie celular. La interacción entre la enolasa y el plasminógeno, mejora la activación de este último a su forma activa, la plasmina a través de los activadores del plasminógeno. La plasmina, es una potente serina-proteasa involucrada en la degradación de las redes de fibrina y de la matriz extracelular. De esta manera, la enolasa como receptor del plasminógeno se convierte en un importante factor de invasión patogénico (Ponce, 2017).

El mecanismo anterior, se ha reportado en varios patógenos, incluidos *T. cruzi* y *Leishmania spp.* Se ha detectado la enolasa en diferentes etapas del ciclo de vida de *T.cruzi*, siendo mayor la expresión en tripomastigotes y amastigotes (Valera-Vera et al., 2020).

## 2. ANTECEDENTES PARTICULARES

En el laboratorio se evaluó la respuesta inmune inducida por los dominios A, R y C de la proteína TcSP. Los ratones BALB/c inmunizados con 10 µg de las proteínas recombinantes o con 100 µg del ADN plasmídico que codifica las respectivas proteínas, se retaron con tripomastigotes sanguíneos. Los resultados mostraron que los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes tuvieron una reducción variable en el pico de parasitemia y un alto porcentaje de mortalidad. Mientras que, los ratones inmunizados con el plásmido que codifica para el dominio de repetidos de la proteína TcSP mostraron una reducción significativa en el pico de parasitemia y sobrevivieron al desafío letal de la infección por *T. cruzi* (Salgado-Jiménez et al., 2013).

Otro antígeno de interés es la proteína enolasa; en el laboratorio se evaluó el efecto protector de la enolasa, inmunizando ratones BALB/c con la proteína recombinante rTcENO y con el ADN codificante pBKTcENO. Los resultados mostraron que los ratones vacunados con la proteína rTcENO o su ADN codificante generaron una respuesta inmune de tipo Th1/Th2. Asimismo, se observó que la parasitemia se redujo a un 69.8 % y a un 71 % en ratones vacunados con la proteína rTcENO y el ADN, respectivamente. Sin embargo, en los ratones vacunados con la proteína rTcENO se observó una supervivencia del 75% mientras que, los vacunados con pBKTcENO no mostraron supervivencia con respecto al grupo control (Arce-Fonseca et al., 2018).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades parasitarias más importantes en América Latina, generando una alta morbilidad, mortalidad, un gran número de incapacidades y una carga económica en el sistema de salud de USD \$ 627 millones (Lidani et al., 2019). Sus características clínicas la convierten en una enfermedad de difícil diagnóstico, manejo y tratamiento (Bivona et al., 2020).

Por lo anterior, se han buscado estrategias para el control de la enfermedad. En los últimos años, se han realizado estudios probando diferentes antígenos del parásito para evaluar la eficacia de estos en el control de la infección. Donde se ha observado que las inmunizaciones con ADN o proteínas recombinantes mostraron diferentes grados de protección (Arce-Fonseca et al., 2018). En nuestro laboratorio, se ha trabajado con el gen TcSPR y la proteína rTcENO, donde se pudo comprobar que la inmunización con el DNA que codifica para el dominio de repetidos de la proteína TcSP y la proteína rTcENO inducen una respuesta protectora en un modelo murino.

Basado en los resultados anteriores, es de nuestro interés evaluar el efecto de la dosis en la inmunización con el gen TcSPR y el uso de nanopartículas de aluminio como adyuvante en la inmunización con las proteínas rTcSPR y rTcENO en un modelo murino de la enfermedad de Chagas.

#### 4. HIPÓTESIS

- La inmunización con dosis bajas del DNA (TcSPR) es capaz de proteger contra la infección de *T. cruzi* en un modelo murino de la enfermedad de Chagas.
- La inmunización con las proteínas recombinantes rTcSPR y rTcENO con nanopartículas de hidróxido de aluminio como adyuvante induce respuesta inmune protectora contra la infección de *T. cruzi* en un modelo murino de la enfermedad de Chagas.

## **5. OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar el efecto de la dosis y del adyuvante en la protección inducida por el gen TcSPR y las proteínas recombinantes rTcENO y rTcSPR en el modelo murino de la enfermedad de Chagas.

### **Específicos**

- Realizar ensayos de protección en los ratones inmunizados con el gen TcSPR y la proteínas rTcENO y rTcSPR acopladas a nanopartículas de hidróxido de aluminio.
- Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por el gen TcSPR y las proteína rTcENO y rTcSPR en ratones inmunizados

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

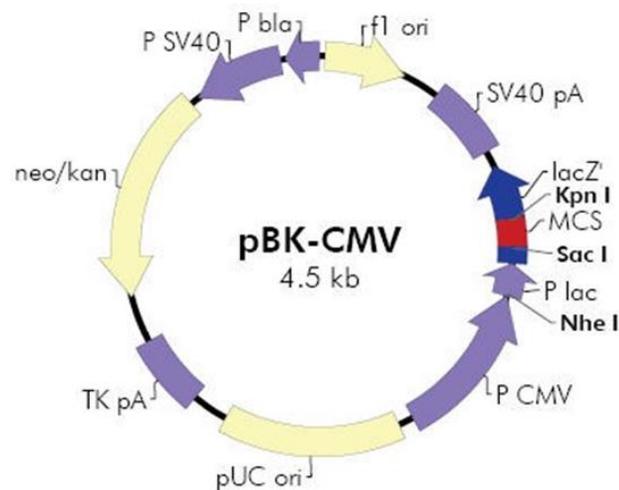
### 6.1. Material biológico

**Parásitos:** Para este trabajo se utilizó la cepa H8 de *Trypanosoma cruzi*, la cual proviene de un paciente Chagásico del estado de Yucatán. Dicha cepa se mantiene a través de pasajes en ratones BALB/c.

**Animales de laboratorio:** Se utilizaron hembras BALB/c. Los animales fueron obtenidos de la Unidad de Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN (México), los cuales se mantuvieron en condiciones normales en el bioterio.

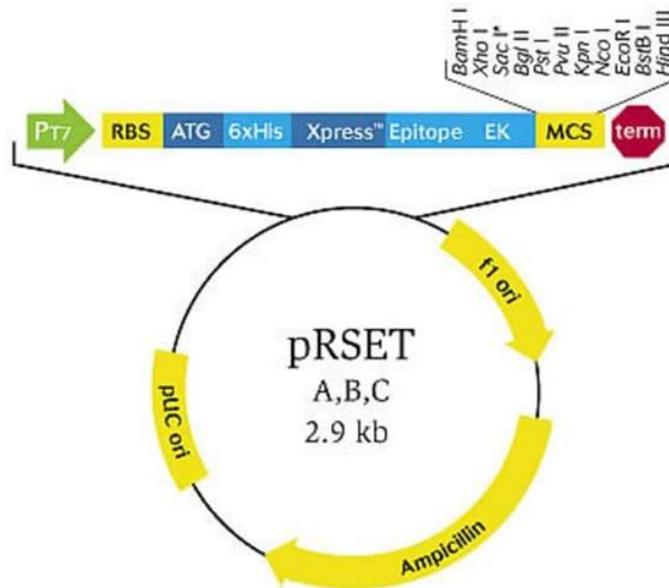
**Cepas bacterianas:** Se utilizó la cepa *Escherichia coli* XL1 Blue con el vector pBKCMV. Asimismo, se utilizó la cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL21 con el vector pRSETB para la expresión y purificación de la proteína recombinante rTcENO. Las cepas bacterianas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) con en el antibiótico de selección kanamicina (50 µg/m) y ampicilina (50 µg/m) respectivamente.

**Vectores:** Los vectores pBKCMV y pRSETB fueron adquiridos de Stratagene e Invitrogen, respectivamente.



**Figura 3.** Mapa de plásmido pBK-CMV. El plásmido tiene un tamaño de 4512 pb, posee un gen de resistencia a la Kanamicina y se caracteriza por tener 17 sitios de clonación flanqueados por los promotores T3 y T7. Posee un promotor temprano CMV lo que le permite la expresión en eucariotas

y una secuencia de poly A del virus SV40, la cual actúa como una señal para la terminación de la transcripción y poliadenilación en eucariotas. Asimismo, permite la expresión en procariontes debido a la presencia del promotor Lac y es inducible en presencia de IPTG.



**Figura 4.** Mapa de plásmido pRSET. El plásmido tiene un tamaño de 2940 pb, tiene 11 sitios de clonación y contiene el gen de resistencia a ampicilina. El promotor T7 se encarga del control de la expresión.

## 6.2. Purificación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se purificó de acuerdo al Kit *Purelink™ HiPure* (K2100-06). En resumen, en condiciones asépticas se inoculó un stock de bacterias transformadas con el plásmido pBKCMV:SPR en 500 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/mL). Se dejó en agitación (>200 ciclos/min) a 37 °C durante 16 h. Posteriormente, se centrifugó a 4000 g por 20 minutos. La pastilla bacteriano se resuspendió en 10 mL de buffer de resuspensión (R3), luego se agregaron 10 mL de buffer de lisis (L7) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se agregaron 10 mL de buffer de precipitación (N3), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a TA. El sobrenadante se agregó a la columna previamente equilibrada y se dejó drenar por gravedad. Se lavó la columna con 60 mL del buffer de lavado (W8), y se eluyó con 15 mL de Buffer de elusión (E4). El DNA se precipitó con 10.5 mL de isopropanol, se centrifugó a 12,000 g por 30 minutos a 4 °C. La pastilla del DNA se resuspendió con 5 mL de etanol al 70%, se centrifugó

12,000 g por 5 min a 4 °C. Finalmente, se dejó secar el pellet de DNA por 10 minutos y se resuspendió con 200 µl de PBS estéril.

### **6.3. Purificación de las proteínas recombinantes rTcSPR y rTcENO**

#### **Purificación rTcSPR**

Se transformaron bacterias con el plásmido pRSET::SPR y se indujeron con 1 mM de IPTG por 2 h a 37°C. Las células recuperadas se incubaron con amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8.5, β-ME 10 mM, PMSF 1 mM). Se adicionó lisozima a una concentración de 1 mg/mL y se incubaron en hielo aproximadamente 15 min. La suspensión celular se sometió a 8 ciclos de sonicación con pausas en hielo de 1 min. Se centrifugó a 8,000 rpm por 15 min. El sobrenadante se cargó en la columna con resina Ni-NTA previamente equilibrada. La columna se lavó con amortiguador A (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, KCl 100 mM, imidazol 20 mM, β-ME 10 mM, glicerol 10 % v/v), amortiguador B (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, KCl 1 M, β-ME 10 mM, glicerol 10% v/v), nuevamente con amortiguador A (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, KCl 100 mM, imidazol 20 mM, β-ME 10 mM, glicerol 10 % v/v), y el último lavado fue con el amortiguador A sin glicerol (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, KCl 100 mM, imidazol 20 mM, β-ME 10 mM). Finalmente, la proteína recombinante se eluyó con el amortiguador C sin glicerol (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, KCl 100 mM, imidazol 100 mM, β-ME 10 mM).

#### **Purificación rTcENO**

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* BL21 con el plásmido pRSETB::ENO. Se seleccionaron las clonas positivas y se incubaron toda la noche en medio Luria-Bertani con ampicilina a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 (O.D. 600 nm) y se indujo con IPTG 1mM a 37°C por 4 h. Posteriormente, se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en 30 mL buffer de lisis (Tris HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Cloruro de Guanidina 4 M e Imidazol 10 mM). Las bacterias se lisaron por sonicación durante 5 min con pulsaciones. El lisado bacteriano se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se colectó el sobrenadante. La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad con Ni-NTA-agarosa (Qiagen). Finalmente, la proteína se eluyó con el buffer de elución (Tris HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, Imidazol 500 mM y Urea 4 M).

#### **6.4. Síntesis de nanopartículas de hidróxido de aluminio**

Las nanopartículas de hidróxido de aluminio se sintetizaron con el método descrito por (Li et al., 2014). Dicho método fue adaptado para usar un pH 10. Brevemente, se realizó una reacción del cloruro de aluminio hexahidratado  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  con hidróxido de sodio en una solución. Un volumen igual de 0.1 M de solución  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y una solución de NaOH 0.075 M se mezclaron en un vial de vidrio. Se agregó NaOH 10 N hasta ajustar el pH a 10. Se dejó en agitación durante 20 minutos a TA y se dejó toda la noche a 4°C. Luego, la suspensión de partículas se sonicó durante 30 minutos. Finalmente, se centrifugó a 3000 g por 20 minutos y la pastilla se lavó con agua.

##### **6.4.1. Adsorción de proteínas por nanopartículas de hidróxido de aluminio**

La adsorción de las proteínas recombinantes en las nanopartículas se realizó mezclando la suspensión de nanopartículas con las proteínas, en una proporción 1:1 (v/v) se agitó durante 30 minutos a TA y se centrifugó a 800 x g durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante. La adsorción de las proteínas en las nanopartículas de hidróxido de aluminio se confirmó por SDS-PAGE. Debido a esta adsorción se denominó a estas vacunas como NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR y NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO.

#### **6.5. Protocolo de inmunización y reto parasitario**

##### **Inmunización con DNA**

Se utilizaron grupos de 4 ratones hembra BALB/c (4-6 semanas). Inicialmente fueron sangrados para la obtención de sueros preinmune y posteriormente se inmunizaron tres veces con diferentes cantidades de DNA (pBKCMV::SPR) 1 µg, 10 µg, 50 µg y 100 µg por vía intramuscular. Al finalizar el esquema de inmunización los ratones se sangraron para obtener sueros inmunes. Asimismo, se inmunizaron ratones con 1 µg del plásmido pBKCMV y con PBS como grupos controles.

##### **Inmunización con las proteínas recombinantes acopladas a nanopartículas de hidróxido de aluminio**

Se utilizaron grupos de 3 ratones hembra BALB/c (4-6 semanas), los cuales fueron inmunizados tres veces con 10 µg de NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR y NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO por vía subcutánea utilizando como adyuvante las nanopartículas del Hidróxido de Aluminio. El intervalo de las inmunizaciones fue de dos semanas. Como controles se inmunizaron

ratones con las NP-Al(OH)<sub>3</sub>, rTcENO, rTcSPR, rTcENO con adyuvante Freund, y rTcSPR con adyuvante de Freund

### **6.6. Reto parasitario**

Los ratones BALB/c inmunizados con el plásmido pBKCMV::SPR se infectaron por vía intraperitoneal con 1,000 y 5,000 parásitos de la cepa H8 de *Trypanosoma cruzi*. En cuanto a los ratones inmunizados con NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR y NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO fueron infectados con 5,000 parásitos. La parasitemia fue monitoreada a partir de los 8 días post-infección.

### **6.7. Determinación de anticuerpos por ELISA**

Los anticuerpos anti-ENO y anti-SPR fueron detectados por ELISA usando placas recubiertas con 10 µg/ml de las proteínas recombinantes disueltas en buffer de carbonatos. En cada pozo se agregaron 50 µl de la proteína disuelta en NaHCO<sub>3</sub> 0.1M pH 9.6 y se incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%. Luego, se bloquearon los pozos con 50 µl de PBS-leche 5% por 1 h a 37°C. Los sueros de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes acopladas a nanopartículas se diluyeron 1:10, se agregaron 50 µl a cada pozo y se incubó a 4°C por 1 hr. Se lavó la placa con PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubó con anticuerpo peroxidado anti-IgG de ratón por 1 h a 37°C. Se realizaron lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y se agregaron 50 µl a cada pozo del sustrato 2,2 azino bis (3-ethylbenzothiazoline 6 sulfuric acid) se dejó en oscuridad por 10 min. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de ELISA.

### **6.8. Isotipificación de anticuerpos**

Las inmunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, e IgM de los ratones inmunizados con el DNA o las proteínas recombinantes se evaluaron mediante ensayos de ELISA indirecto. Las placas se cubrieron con 10 µg/mL de rTcENO o rTcSPR en amortiguador de carbonatos 100 mM pH 9.6 y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se lavaron con PBS 0.05%-Tween 20 (PBS-T), se bloquearon con PBS-leche descremada al 5% por 2 h a 37°C y se lavaron nuevamente con PBS-T. Después de lavar, se agregaron las muestras de suero diluidas (1:100 o 1:50) en PBST, se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron 3 veces después de la reacción. Como control negativo, se usaron los sueros preinmunes en todos los experimentos. Para la isotipificación, las placas se incubaron con anticuerpos de cabra anti-isotipo de ratón marcado con peroxidasa (Abcam, Cambridge,

Reino Unido) a una dilución 1:10000 en PBS-T durante 2 h a TA y luego se lavaron 4 veces con PBST y PBS. La actividad peroxidasa se desarrolló mediante la adición del sustrato de ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico (ABTS) y se leyó la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector de microplacas ELISA (LabSystem Multiskan MS).

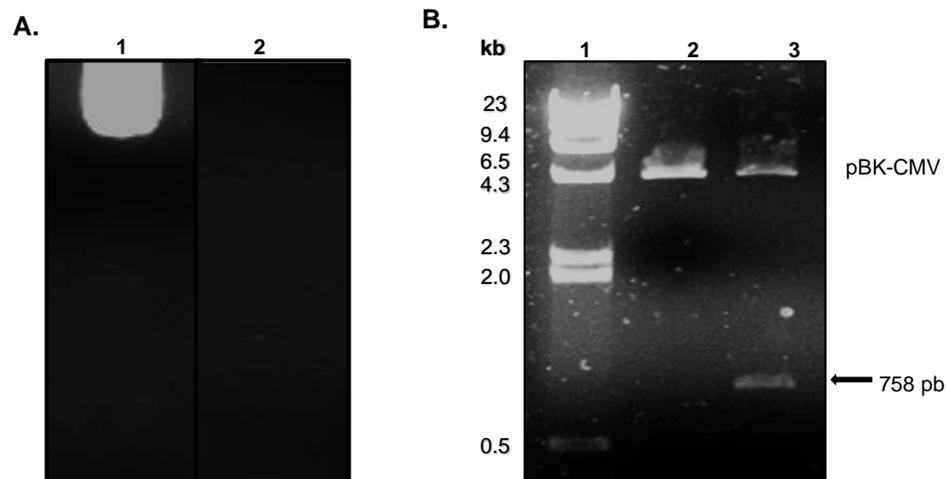
### **6.9. Análisis histológico**

Se disectó el corazón de los animales inmunizados con pBKCMV::SPR y con las proteínas recombinantes acopladas a nanopartículas de hidróxido de aluminio. Se realizó un lavado PBS estéril y se fijó con formaldehído al 10% en PBS durante 24 h. Una vez fijadas las muestras, se resuspendieron en parafina para posteriormente realizar corte de 6  $\mu\text{m}$  y teñirlos con hematoxilina-eosina para su observación al microscopio óptico.

## 7. Resultados

### 7.1 Purificación del DNA plasmídico pBKCMV y pBKCMV-SPR

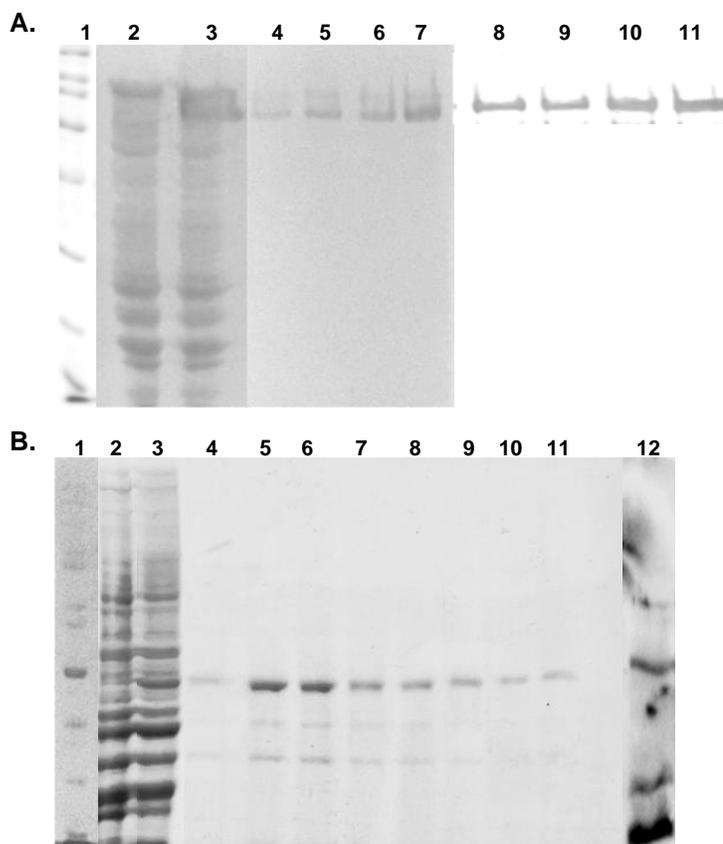
A partir de la construcción del plásmido pBKCMV::SPR previamente generado en nuestro laboratorio, se realizó la extracción y purificación del DNA plasmídico con el kit Purelink™ HiPure-Maxiprep (Figura 5A). Posteriormente, se realizó una restricción con las enzimas HindIII y XhoI para comprobar que se tenía el gen de interés (Figura 5B).



**Figura 5.** Purificación de DNA plasmídico y restricción con las enzimas HindIII y XhoI del plásmido pBKCMV::SPR (Tamaño del plásmido pBKCMV 4518pb). **A.** Carriles: 1) pBK-CMV; 2) pBK-CMV::SPR **B.** 1) Marcadores de peso molecular; 2) pBKCMV; 3) pBK-CMV::SPR. La flecha señala la liberación del inserto de DNA correspondiente a SPR.

### 7.2. Purificación de las proteína recombinantes rTcSPR y rTcENO

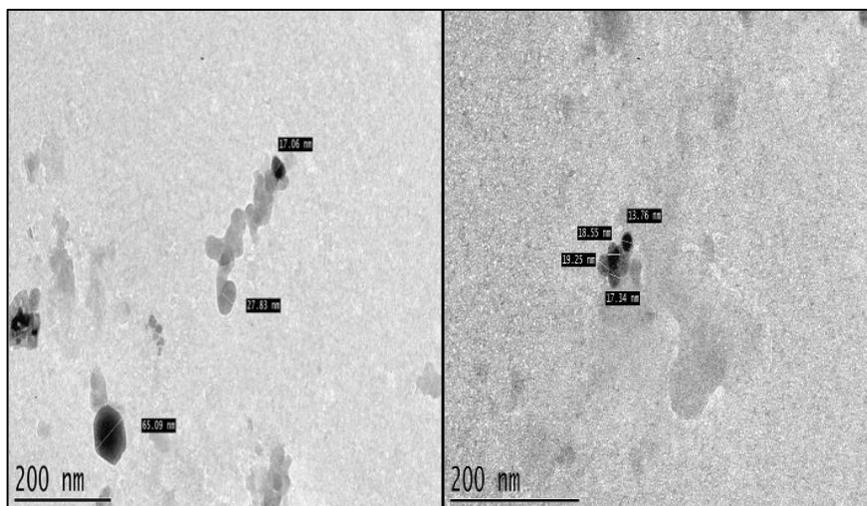
Las proteínas recombinantes rTcSPR y rTcENO acopladas a Histidina (His) se purificaron por cromatografía de afinidad a Ni<sup>2+</sup>, lo cual dio como resultado una proteínas con un pesos moleculares aproximados de 33 kDa y 46 kDa, respectivamente. Para corroborar que las proteínas recombinantes se sintetizaron adecuadamente, se realizaron ensayos de inmunotransferencias con las proteínas purificadas. Para ello, se utilizó el anticuerpo anti-histidina. Los resultados muestran el reconocimiento de la proteína por los anticuerpos policlonales (Figura 6).



**Figura 6.** Purificación de las proteínas recombinantes. **A.** rTcSPR. 1) Marcadores de peso molecular; 2) Bacteria sin inducir; 3) Bacteria inducida; 4-7) Eluidos; 8-11) Reconocimiento de la proteína rTcSPR (33 kDa) por anticuerpos anti-histidinas dilución 1:1000. **B.** rTcENO. 1) Marcadores de peso molecular; 2) Bacteria sin inducir; 3) Bacteria inducida; 4-11) Eluidos; 12) Reconocimiento de la proteína rTcENO (46 kDa) por anticuerpos anti-histidinas dilución 1:1000.

### 7.3 Síntesis de nanopartículas de hidróxido de aluminio

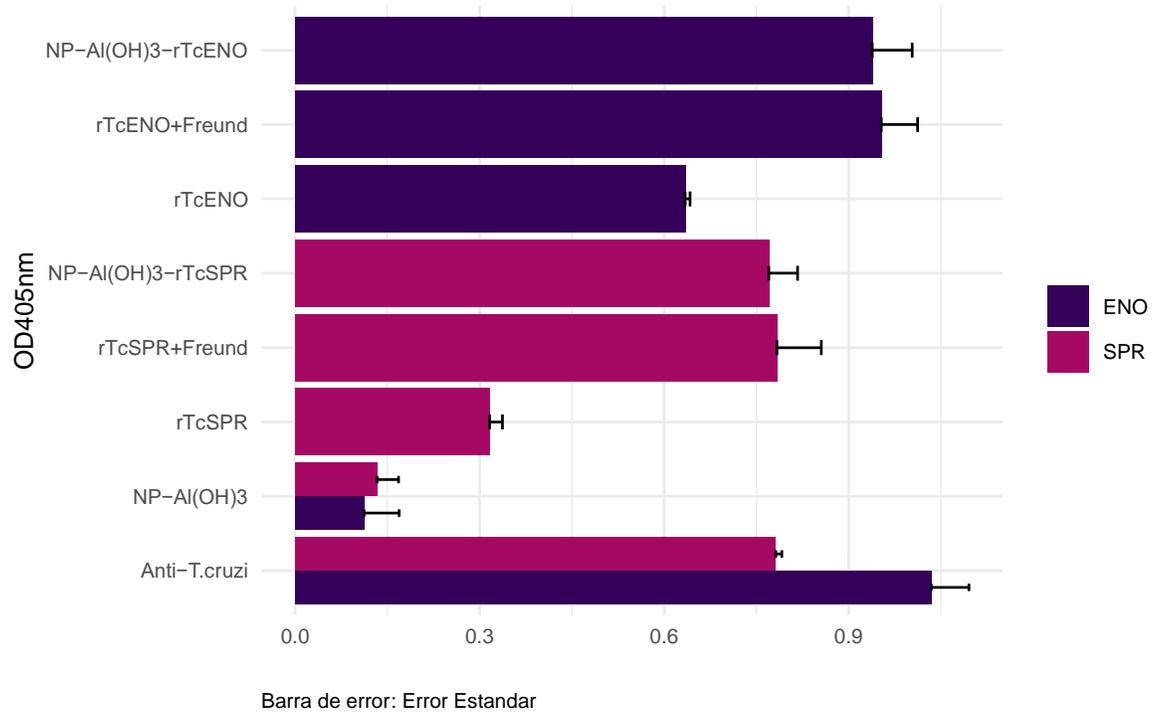
Con la finalidad de observar la morfología, tamaño y distribución de las  $\text{Np-Al(OH)}_3$  sintetizadas, se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), donde se observó que las  $\text{Np-Al(OH)}_3$  eran microesferas amorfas aglomeradas con un diámetro en el rango de 13 a 66 nm como se observa en la figura 7.



**Figura 7.** Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de NP-Al(OH)<sub>3</sub>.

#### **7.4 Respuesta IgG contra las proteínas recombinantes**

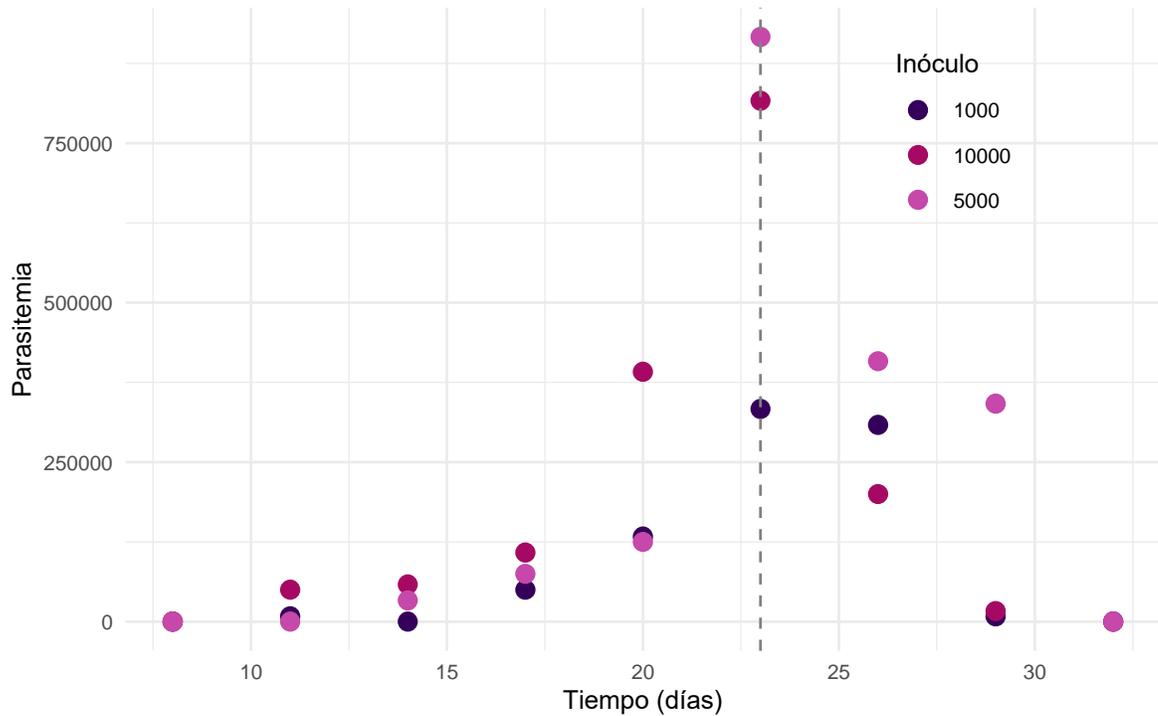
Para analizar la producción de anticuerpos en el suero de los ratones inmunizados con las proteínas acopladas a las nanopartículas, los ratones se sangraron dos semanas después de la segunda inmunización para realizar ensayos de ELISA. Se detectó que el nivel de IgG anti-SPR o anti-ENO en ratones inmunizados con NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR o NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO fue significativamente más alto que en el suero de los ratones inmunizados con rTcSPR o rTcENO. Por otra parte, no se encontraron diferencias en los niveles de anticuerpos producidos por los ratones que fueron inmunizados con rTcSPR o rTcENO más el adyuvante de Freud con los inmunizados con las proteínas acopladas a las nanopartículas de hidróxido de aluminio (Figura 8).



**Figura 8.** Respuesta de IgG en ratones inmunizados con dos dosis de nanopartículas de hidróxido de aluminio (NP-Al(OH)<sub>3</sub>), las proteínas (rTcENO o rTcSPR) y las proteínas acopladas a las nanopartículas (NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR o NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO). Un anti-suero policlonal anti-*T.cruzi* se utilizó como control positivo.

### 7.5 Parasitemia y sobrevivencia

Para determinar el inóculo de infección de la cepa H8 de *T. cruzi* a los ratones BALB/c se realizó una curva de infección. Para la curva de infección se utilizaron tres grupos de 3 ratones hembras BALB/c infectadas con 1,000 5,000 y 10,000 parásitos. Se monitoreó la parasitemia después de 8 días post-infección durante un mes (Figura 9).

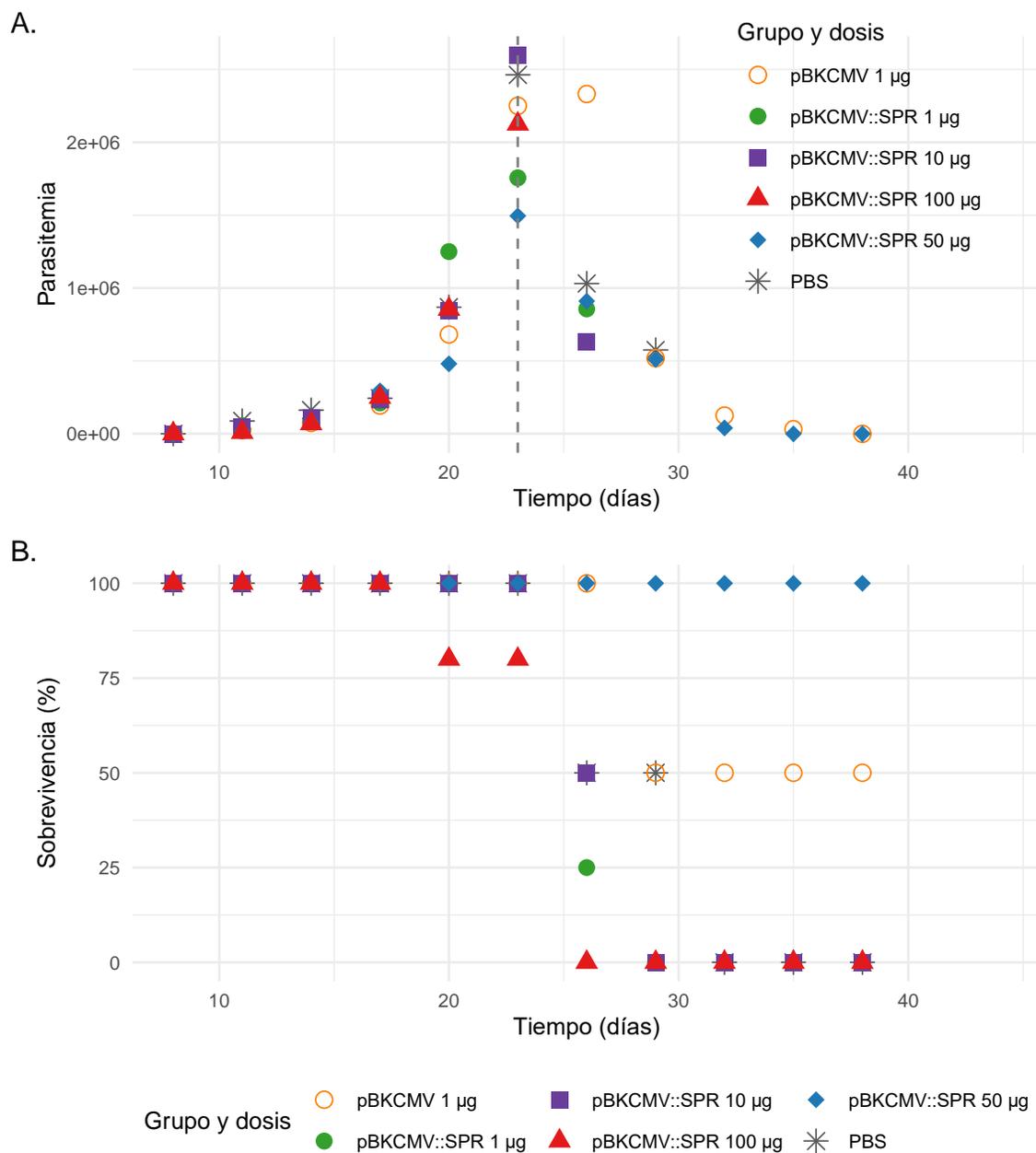


**Figura 9.** Curva de parasitemia con diferentes inóculos de *T. cruzi* cepa H8

Se realizó una ELISA para evaluar la producción de anticuerpos anti-SPR generado por los ratones (datos no mostrados), y se observó que no hubo diferencia en la producción de anticuerpos contra la proteína SPR. Teniendo en cuenta lo anterior y que el inóculo de infección utilizado en el laboratorio para mantener la cepa H8 en pase en ratones hembras BALB/C es de 10,000 parásito, se decidió infectar con dicha cantidad.

Con la finalidad de evaluar si la inmunización con el DNA (pBKCMV::SPR) inducía una respuesta protectora contra la infección por *T. cruzi*, se infectaron los ratones inmunizados con las diferentes cantidades de DNA y sus respectivos controles con 10,000 parásitos de la cepa H8. El monitoreo de la parasitemia se inició a partir de los ocho días post-infección.

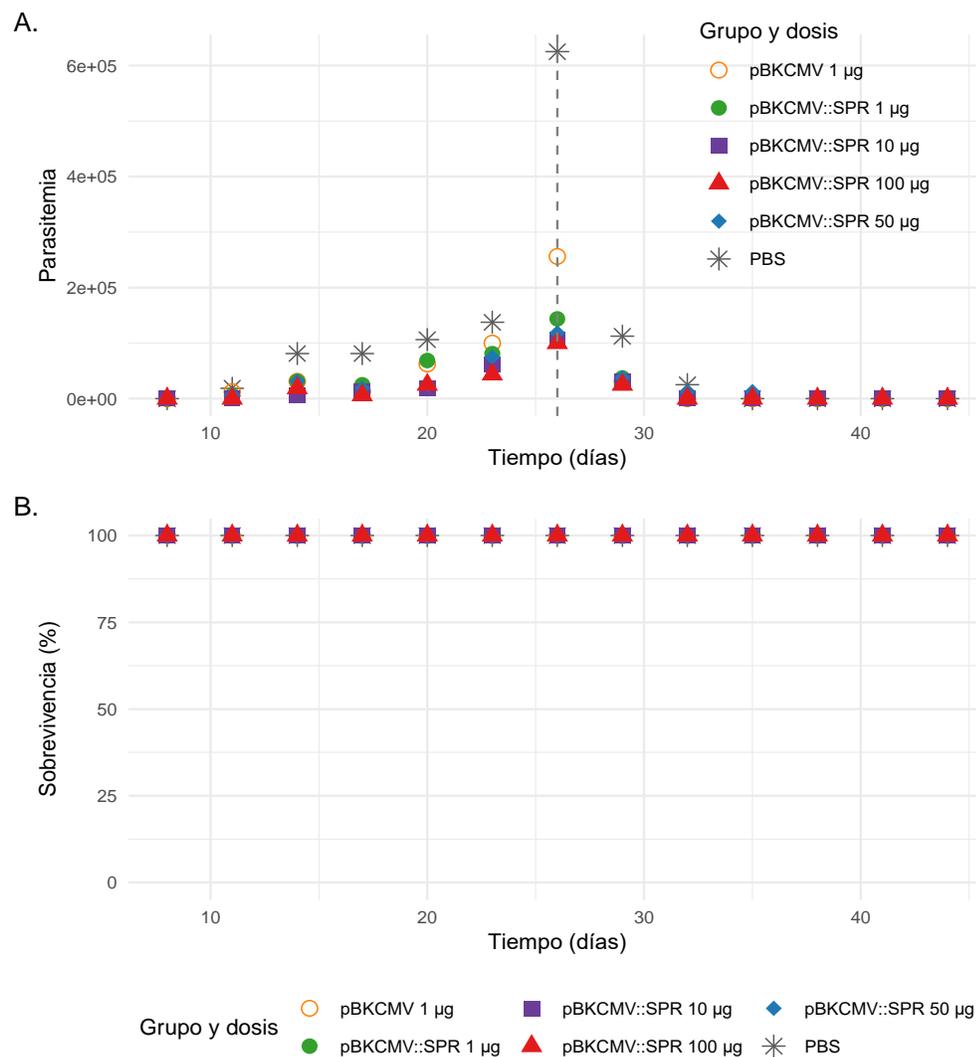
En la inmunización con el DNA se observó que los ratones presentaron una reducción variable de la parasitemia a los 23 días post-infección con respecto a los controles. Después de los 23 post-infección se observó una alta tasa de mortalidad. Sin embargo, los ratones inmunizados con 50 ug controlaron la parasitemia y la mortalidad en comparación con los grupos controles (Figura 10).



**Figura 10.** Parasitemia y mortalidad de los ratones inmunizados con el DNA plasmídico pBKCMV::SPR e infectados con 10,000 parásitos. Se inmunizaron ratones BALB/c con 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 50  $\mu$ g y 100  $\mu$ g de DNA por vía intramuscular. Al octavo día se empezó a monitorear la parasitemia **(A)** y la sobrevivencia **(B)**.

Debido a el comportamiento observado en los animales, se decidió realizar un experimento independiente modificando la dosis de infección. Por lo tanto, los ratones se infectaron con 5,000 parásitos de la cepa H8 de *T. cruzi*.

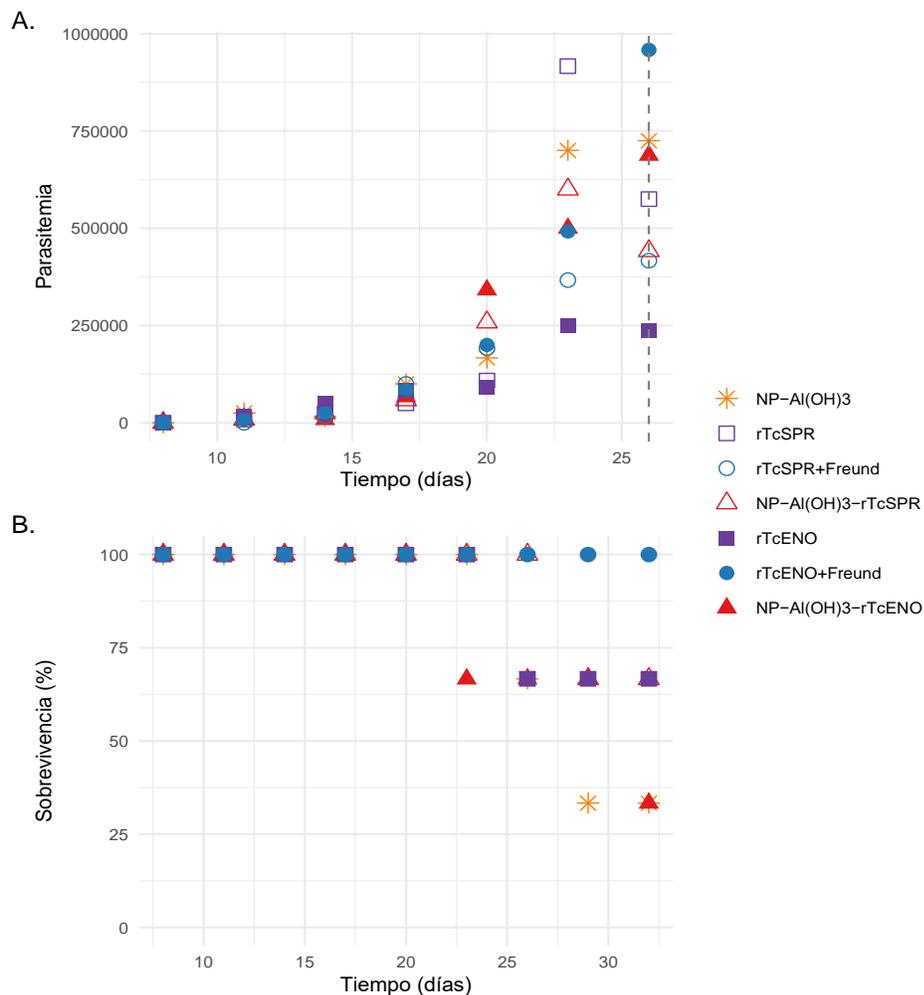
Se observó una disminución de la parasitemia a los 26 días post-infección en los ratones inmunizados con 1 µg, 10 µg, 50 µg y 100 µg con respecto a los controles (Figura 11A). Asimismo, se pudo observar que todos los grupos en estudio fueron capaces de controlar la infección por *T. cruzi* ya que se observó una sobrevivencia del 100% (Figura 11B).



**Figura 11.** Parasitemia y mortalidad de los ratones inmunizados con el DNA plasmídico pBKCMV::SPR e infectados con 5,000 parásitos. Se inmunizaron ratones BALB/c con 1 µg, 10

µg, 50 µg y 100 µg de DNA por vía intramuscular. Al octavo día se empezó a monitorear la parasitemia **(A)** y la sobrevivencia **(B)**

En cuanto, a la inmunización con las proteínas recombinantes acopladas a nanopartículas se observó una mejor respuesta en los ratones inmunizados con NP-Al(OH)<sub>3</sub>rTcSPR comparado con los inmunizados con NP-Al(OH)<sub>3</sub>rTcENO, debido a que se evidenció una disminución en la parasitemia cuando se usó NP-Al(OH)<sub>3</sub>SPR y la SPR con el adyuvante de Freund. Esto va acorde con lo observado en la sobrevivencia donde los ratones inmunizados con NP-Al(OH)<sub>3</sub>ENO tuvieron una sobrevivencia del 33.3% en contrasre con el 66.7% observado en los inmunizados con NP-Al(OH)<sub>3</sub>SPR (Figura 12).



**Figura 12.** Parasitemia y mortalidad de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes acopladas a nanopartículas de hidróxido de aluminio. Al octavo día se empezó a monitorear la parasitemia **(A)** y la sobrevivencia **(B)**.

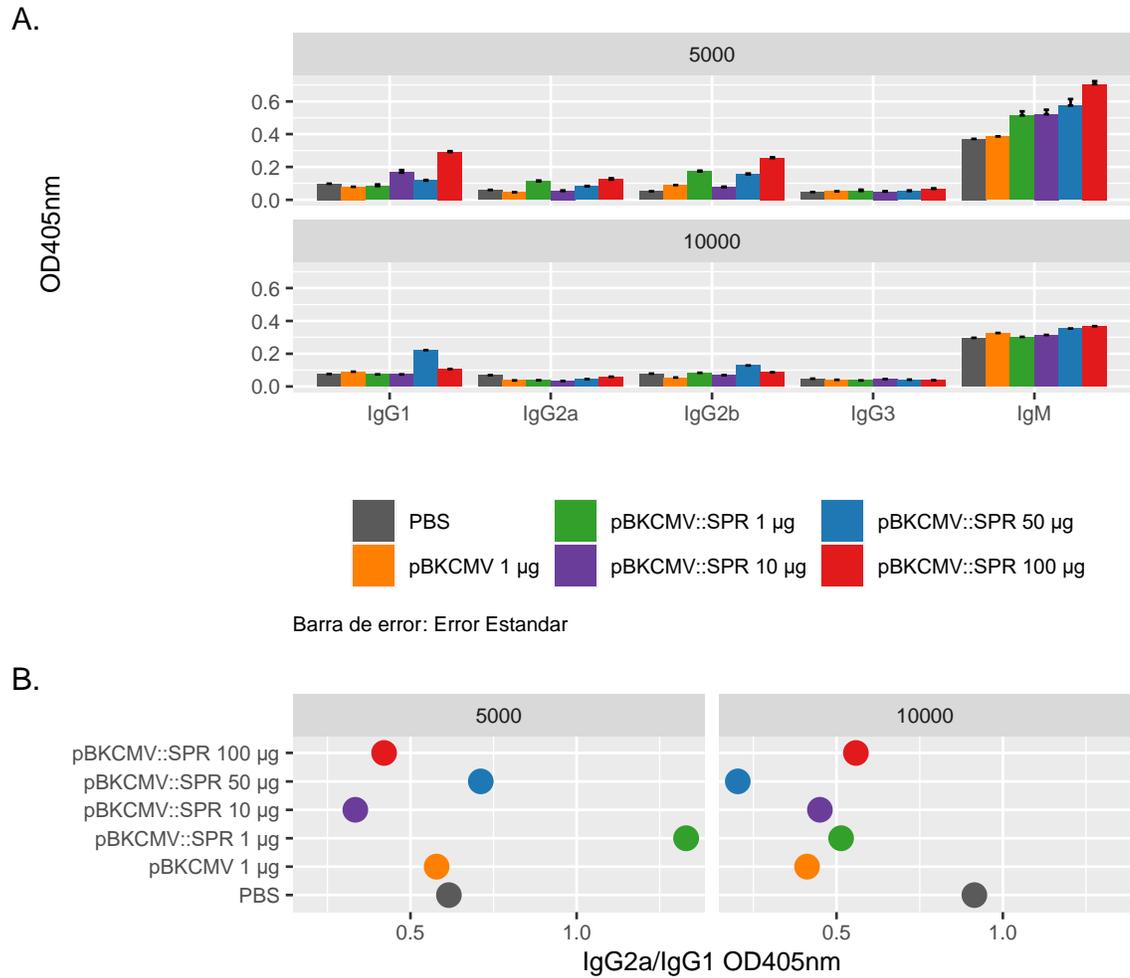
## 7.6 Isotipificación de anticuerpos

Para conocer la respuesta inmune humoral generada por la inmunización NP-Al(OH)<sub>3</sub>SPR, NP-Al(OH)<sub>3</sub>ENO y el DNA (pBKCMV::SPR) se obtuvieron sueros 15 días después de la última inmunización para ensayos de ELISA. Las placas se forraron con 10µg/mL de las proteínas rTcSPR o rTcENO. Se analizó el suero de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes a una dilución 1:100 y el suero de ratones inmunizados con el DNA plasmídico a una dilución 1:10.

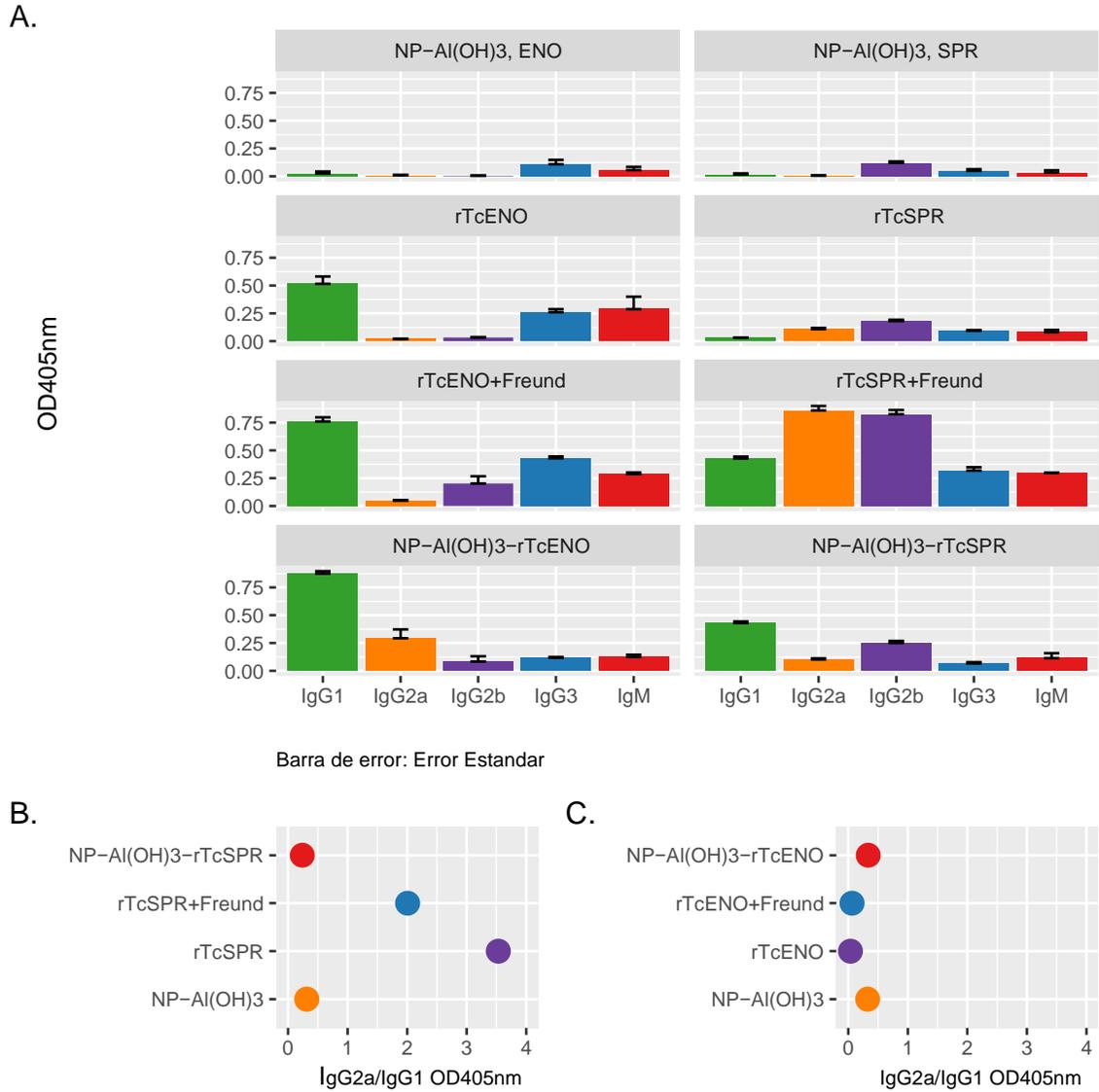
Los resultados muestran que en la inmunización con el DNA no se observó diferencia en la producción de isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Asimismo, se evidenció que todos los grupos inmunizados con el plásmido pBKCMV::SPR y los grupos controles generaron altos títulos de anticuerpos de tipo IgM (Figura 13A).

En la figura 13B, se puede observar que la inmunización con el DNA produjo proporciones de IgG2a/IgG1 < 1, lo que indica más IgG1 que IgG2a. En los grupos controles se observó el mismo comportamiento.

En cuanto a la inmunización con NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR no se observó una producción significativa de anticuerpos con respecto al grupo inmunizado con el adyuvante de Freud, el mismo comportamiento se evidenció en los grupos controles. Sin embargo, los ratones inmunizados con NP-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO generaron niveles elevados de IgG1, IgG2b e IgG2a (figura 14A). En la inmunización con las proteínas acopladas a nanopartículas de hidróxido de aluminio se observó una relación IgG2a/IgG1 < 1 (Figura 14B,C).



**Figura 13.** Respuesta de anticuerpos producidos por la inmunización con el DNA **(A)**. Ratones infectados con 10,000 y 5,000 parásitos de la cepa H8 de *T. cruzi* **(B)**. Relación IgG2a/IgG1

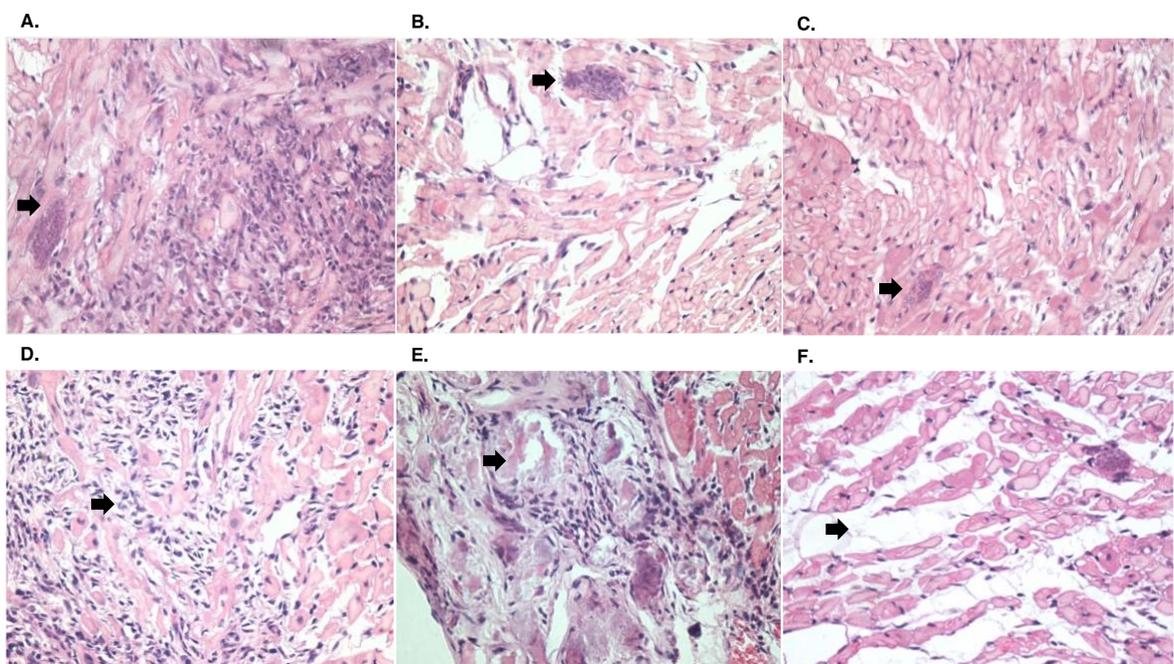


**Figura 14.** Respuesta de anticuerpos producidos por la inmunización con las proteínas recombinantes acopladas a nanopartículas de aluminio **(A)**. Isotipificación de inmunoglobulinas **(B)**. Relación IgG2a/IgG1 en ratones inmunizados con rTcSPR **(C)**. Relación IgG2a/IgG1 en ratones inmunizados con rTcENO.

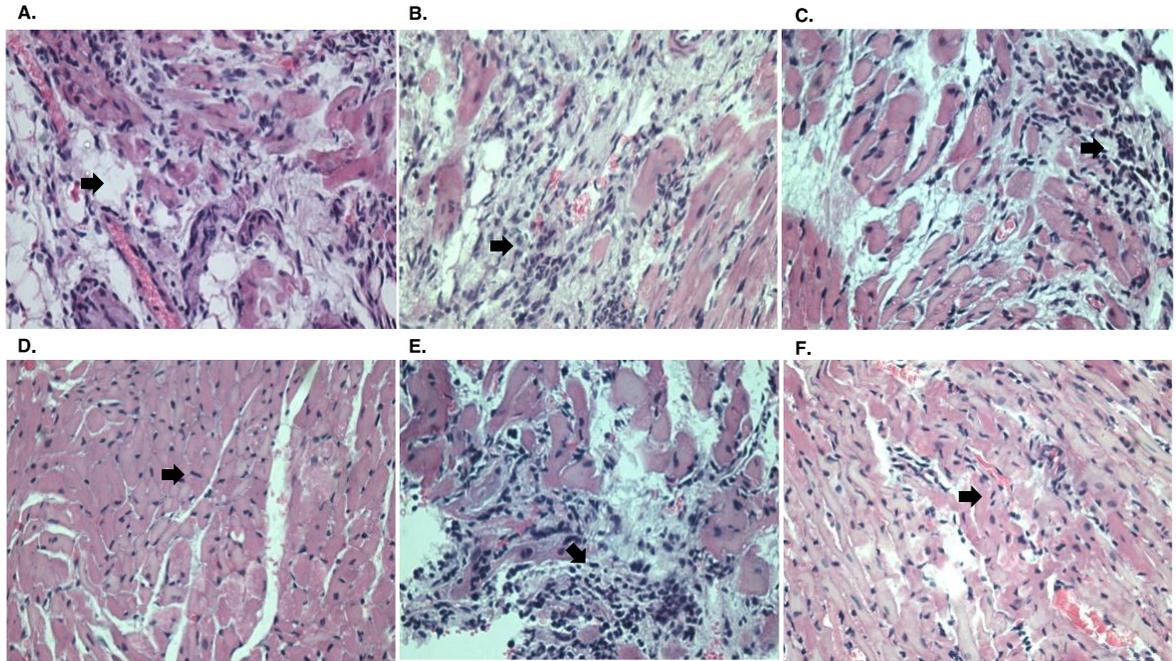
## 8. Análisis histológico en ratones inmunizados con DNA

Se disectó el tejido cardíaco de los ratones inmunizados con DNA que sobrevivieron al reto parasitario. Los corazones se analizaron por tinción con H&E (Figura 15). El análisis por H&E mostró una gran reacción inflamatoria en ratones vacunados y no vacunados e infectados con 10,000 parásitos. Asimismo, se observó una reorganización, necrosis, fibrosis y edema en el tejido cardíaco. En todos los grupos de estudio se observaron nidos de amastigote.

Por otro lado, el análisis por H&E en los ratones vacunados y no vacunados e infectados con 5,000 parásitos mostró una gran reacción inflamatoria, infiltrado de células adiposas, fibrosis e inicio de fibrosis en animales y reorganización de las fibras cardíacas. Sin embargo, en los animales vacunados con 10  $\mu$ g del DNA se observó que las haces de fibras cardíacas presentaban una morfología normal. No se observaron nidos de amastigotes en los grupos de estudio (Figura 16).



**Figura 15.** Tinción con hematoxilina-eosina. (A) PBS, (B) pBKCMV, (C) pBKCMV::SPR 1 ug, (D) pBKCMV::SPR 10 ug (E) pBKCMV::SPR 50 ug (F) pBKCMV::SPR 100 ug. Magnificación 40X. A,B,C) Nidos de amastigotes; D) infiltrado inflamatorio; E) Tejido necrótico; F) Edema.



**Figura 16.** Tinción con hematoxilina-eosina. (A) PBS, (B) pBKCMV, (C) pBKCMV::SPR 1 ug, (D) pBKCMV::SPR 10 ug (E) pBKCMV::SPR 50 ug (F) pBKCMV::SPR 100 ug. Magnificación 40X. A) Infiltrado de células adiposas; B,C, E) Infiltrado inflamatorio; D) Haces de fibras normales; F) Reorganización de las fibras cardiacas.

## 9. Discusión

Las vacunas de DNA y/o proteínas se han descrito como una alternativa para el desarrollo de vacunas terapéuticas o preventivas contra la enfermedad de Chagas, para esto, se han utilizado diversos inmunógenos y vías de administración, así como el uso de adyuvantes. Si bien, ninguna vacuna ha sido capaz de prevenir la infección, en algunos casos se ha descrito que las vacunas inducen una protección parcial (Arce-Fonseca et al., 2015) Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron la inmunogenicidad y el potencial inmunoprotector del gen SPR y la proteína recombinantes rTcENO al obtener una protección del 100% y 80% respectivamente en ratones BALB/c.

Anteriormente se demostró que la inmunización con 100 µg del DNA que codifica para la región de repetidos de la proteína TcSP induce un protección del 100% en ratones BALB/c. Con base en esto, se evaluó si la inmunización con menor cantidad de DNA podía generar una respuesta protectora. Sin embargo, nuestros resultados mostraron una disminución en la protección cuando se realizó la vacunación con 1 µg, 10 µg y 100 µg del DNA, mientras que los ratones vacunados con 50 µg del DNA tuvieron una sobrevivencia del 100% cuando el inóculo fue de 10,000 parásitos. En contraste, cuando el inóculo inicial fue de 5,000 parásitos todos los grupos presentaron un 100% de sobrevivencia. Estos resultados sugieren que una menor cantidad del DNA puede brindar una respuesta protectora, pero está sujeta al inóculo inicial del parásito. Esto va en línea con lo reportado en la literatura donde se ha evidenciado que la cantidad de inóculo y la patogenicidad de la cepa de *T. cruzi* puede determinar la gravedad de la enfermedad. Asimismo, puede influir en la activación de la respuesta inmune y generar un mayor daño tisular en el huésped (Borges et al., 2013).

Se ha demostrado que una respuesta coordinada de tipo Th1/Th2, siendo predominante la respuesta Th1 genera el control o eliminación del parásito, ya que hay una producción de citocinas de tipo Th1 y de anticuerpos líticos (Acevedo et al., 2018). Sin embargo, en este estudio la inmunización con el DNA indujo la producción de inmunoglobulinas IgM>>IgG1>>IgG2b>>IgG2a, mientras que la inmunización con las proteínas recombinantes Np-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO y Np-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR utilizadas para inmunizar, indujeron principalmente la producción de IgG1>>IgG2a>>IgG2b y IgG1>>IgG2b>>IgG2a, respectivamente.

Como se puede observar en la figura 8, las nanopartículas sintetizadas indujeron fuertes respuestas inmunitarias humorales, ya que tanto la inmunización con Np-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR y Np-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO indujo una mayor producción de anticuerpos de tipo IgG comparados con la inmunización de las proteínas recombinantes sin adyuvante. Estos resultados son consistentes con los realizados por Li et al., (2014) y Pegu et al., (2022) donde se observó una alta producción de anticuerpos de tipo IgG cuando se implementan las nanopartículas como adyuvantes.

Diversos estudios han planteado el uso de las nanopartículas de hidróxido de aluminio como un potente adyuvante, ya que han informado que éstas, pueden ser vectores eficaces para la captación de antígenos por las APC, las cuales pueden internalizar de manera más eficiente los antígenos conjugados con nanopartículas de hidróxido de aluminio. La fácil absorción de antígenos juega un papel importante en la inducción de una respuesta inmunitaria más equilibrada de tipo Th1/Th2, generando así una respuesta humoral y celular robusta. Sin embargo, la interacción entre antígeno-nanopartículas puede interferir en el procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T citotóxicos, afectando la respuesta de linfocitos B, lo que conlleva a una baja producción de anticuerpos (Gogoi, Mani, Malik, et al., 2020; Hansen et al., 2007; Pegu et al., 2022).

Como se describió anteriormente, los animales inmunizados con Np-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcSPR y Np-Al(OH)<sub>3</sub>-rTcENO presentaron un porcentaje de sobrevivencia variable con respecto a los inmunizados con NP-Al(OH)<sub>3</sub>. A pesar de la producción de anticuerpos generados por las inmunizaciones, éstos no fueron capaces de controlar la infección por *T. cruzi*. Si bien, el uso de nanopartículas de hidróxido de aluminio incrementó la producción de anticuerpos de tipo IgG, no se observó la inducción de una respuesta inmune Th1. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Gogoi et al., (2020) Gogoi, Mani, Aggarwal, et al., (2020) donde se observó que las nanopartículas de hidróxido de aluminio usadas como adyuvante en vacunas para el *B. anthracis* indujeron una respuesta Th1/Th2 robusta y duradera con altos niveles de IgG1 e IgG2a. Esto puede estar relacionado con la unión del antígeno a las nanopartículas y al método de síntesis, ya que se ha evidenciado que las propiedades de las nanopartículas tienen un papel importante en la eficiencia. Se sabe que el tamaño influye en la unión de las proteínas, en la liberación, la toxicidad, la distribución y la estabilidad de las partículas. Asimismo, estas pueden sufrir de agregación durante el almacenamiento lo que conlleva a la disminución de su eficiencia afectado así la respuesta inmune generada (Chenthamara et al., 2019; Mitchell et al., 2020; Pegu et al., 2022).

Aunque las nanopartículas de hidróxido de aluminio son prometedoras para el uso como adyuvantes, se debe tener en cuenta la cantidad de nanopartículas en el diseño de vacunas, ya que un alto contenido de nanomateriales puede conducir a la citotoxicidad de las células. Además, las vías de administración parece tener un papel importante en la nanotoxicidad así como en la respuesta inmune generada (HogenEsch et al., 2018).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que una menor cantidad del DNA puede generar una protección contra la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, la efectividad de esta pueden estar asociada con el inóculo de infección. En este estudio se utilizaron inóculos de 5,000 y 10,000 parásitos de la cepa H8. Aunque no se obtuvo la respuesta inmune esperada, los animales vacunados e infectados con 5,000 parásitos presentaron una mayor producción de anticuerpos siendo mayoritariamente de isotipo IgM, posiblemente esto puede estar asociado con el número de inmunizaciones y los tiempos de infección, lo que impidió el recambio de anticuerpos. Finalmente, la vacunación con en el DNA no generó una reducción del daño histopatológico a nivel de corazón, ya que se observó una exacerbada respuesta inflamatoria en el tejido cardíaco y presencia de nidos de amastigotes.

Por otra parte, si bien las nanopartículas pueden actuar como un adyuvante se debe tener en cuenta los métodos de síntesis, las propiedades químicas, la cantidad de nanopartículas y la vía de administración para el diseño de las vacunas, ya que se ha observado que dichos parámetros juegan un rol importante en la eficiencia y en la citotoxicidad de los nanomateriales.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la respuesta inmune celular generada en la inmunización con 50 ug de DNA
2. Caracterizar las nanopartículas sintetizadas
3. Evaluar la producción de anticuerpos con dosis de refuerzo
4. Analizar el efecto de ampliar los tiempos entre la última inmunización y el reto parasitario
5. Evaluar diferentes vías de inmunización de las proteínas acopladas a nanopartículas tales como, vía intraperitoneal e intramuscular
6. Probar las nanopartículas como adyuvantes utilizando diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*

## BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gómez, K. A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>
- Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Ruiz-Guevara, R., & Noya, O. (2022). Chagas Disease Expands Its Epidemiological Frontiers From Rural to Urban Areas. *Frontiers in Tropical Diseases*, 3, 21. <https://doi.org/10.3389/FITD.2022.799009>
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). Opinion: The *Trypanosoma cruzi* - Host-cell interplay: Location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>
- Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G., & Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion*, 13(4), 540. <https://doi.org/10.2450/2015.0040-15>
- Arce-Fonseca, M., González-Vázquez, M. C., Rodríguez-Morales, O., Graullera-Rivera, V., Aranda-Fraustro, A., Reyes, P. A., Carabarin-Lima, A., & Rosales-Encina, J. L. (2018). Recombinant enolase of *Trypanosoma cruzi* as a novel vaccine candidate against Chagas disease in a mouse model of acute infection. *Journal of Immunology Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8964085>
- Arce-Fonseca, M., Ramos-Ligonio, A., López-Monteón, A., Salgado-Jiménez, B., Talamás-Rohana, P., Luis Rosales-Encina, J., Pedro Zacatenco, S., & Gustavo Madero, D. A. (2011). A DNA Vaccine Encoding for TcSSP4 Induces Protection against Acute and Chronic Infection in Experimental Chagas Disease. In *Int. J. Biol. Sci* (Vol. 7, Issue 9). <http://www.biolsci.org1230>
- Arce-Fonseca, M., Rios-Castro, M., Del Carmen Carrillo-Sánchez, S., Martínez-Cruz, M., & Rodríguez-Morales, O. (2015). Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13071-015-0738-0/TABLES/1>
- Arnal, A., Waleckx, E., Rico-Chávez, O., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2019). Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 13, Issue 4). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006859>
- Bhatia, V., & Garg, N. J. (2008). Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(8), 1158–1164. <https://doi.org/10.1128/CVI.00144-08>
- Bivona, A. E., Alberti, A. S., Cerny, N., Trinitario, S. N., & Malchiodi, E. L. (2020). Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-

- mediated control. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(5). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165658>
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T., & Klinman, D. M. (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 10, Issue 4, pp. 499–511). <https://doi.org/10.1586/erv.10.174>
- Borges, D. C., Araújo, N. M., Cardoso, C. R., & Lazo Chica, J. E. (2013). Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 138(2), 145. <https://doi.org/10.1111/IMM.12022>
- Boscardin, S. B., Kinoshita, S. S., Fujimura, A. E., & Rodrigues, M. M. (2003). Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infection and Immunity*, 71(5), 2744–2757. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2744-2757.2003>
- Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., & Bartholomeu, D. C. (2016). Evasion of the immune response by *trypanosoma cruzi* during acute infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>
- Chavda, V. P., Pandya, R., & Apostolopoulos, V. (2021). DNA vaccines for SARS-CoV-2: toward third-generation vaccination era. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 20, Issue 12, pp. 1549–1560). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1987223>
- Chenthamara, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, S. G., Krishnaswamy, S., Essa, M. M., Lin, F. H., & Qoronfleh, M. W. (2019). Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomaterials Research 2019 23:1*, 23(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/S40824-019-0166-X>
- da Costa, K. M., Marques da Fonseca, L., dos Reis, J. S., Santos, M. A. R. da C., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., & Freire-de-Lima, L. (2021). *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase as a Potential Vaccine Target Against Chagas Disease. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768450>
- De Bona, E., Lidani, K. C. F., Bavia, L., Omidian, Z., Gremski, L. H., Sandri, T. L., & de Messias Reason, I. J. (2018). Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy? *Frontiers in Immunology*, 9(AUG), 1842. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01842/BIBTEX>
- 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.46-53.2004>

- Ferragut, F., Acevedo, G. R., & Gómez, K. A. (2021). T Cell Specificity: A Great Challenge in Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*, 12, 2501. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.674078/BIBTEX>
- Garg, N., & Tarleton, R. L. (2002). Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*, 70(10), 5547–5555. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5547-5555.2002>
- Gogoi, H., Mani, R., Aggarwal, S., Munde, A. M. M., & Bhatnagar, R. (2020). Crystalline and amorphous preparation of aluminum hydroxide nanoparticles enhances protective antigen domain 4 specific immunogenicity and provides protection against anthrax. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 239–252. <https://doi.org/10.2147/IJN.S219647>
- Gogoi, H., Mani, R., Malik, A., Sehrawat, P., & Bhatnagar, R. (2020). Co-Administration of Aluminium Hydroxide Nanoparticles and Protective Antigen Domain 4 Encapsulated Non-Ionic Surfactant Vesicles Show Enhanced Immune Response and Superior Protection against Anthrax. *Vaccines*, 8(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/VACCINES8040571>
- Gutierrez, B. C., Lammel, E., Ramirez, M. I., González-Cappa, S. M., & Poncini, C. V. (2020). Modulatory Effect of *Trypanosoma cruzi* Infective Stages in Different Dendritic Cell Populations in vitro. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 20. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00020/BIBTEX>
- Hansen, B., Sokolovska, A., HogenEsch, H., & Hem, S. L. (2007). Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. *Vaccine*, 25(36), 6618–6624. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2007.06.049>
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). *Trypanosoma cruzi* genome: Organization, multi-gene families, transcription, and biological implications. In *Genes* (Vol. 11, Issue 10, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes11101196>
- HogenEsch, H., O'Hagan, D. T., & Fox, C. B. (2018). Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. In *npj Vaccines* (Vol. 3, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>
- Instituto Nacional de Salud. (2022). *Protocolo de vigilancia de Chagas*. <https://doi.org/10.33610/infoeventos.58>
- Kayama, H., & Takeda, K. (2010). The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. In *Microbes and Infection* (Vol. 12, Issue 7, pp. 511–517). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.005>

- Kemmerling, U., Osuna, A., Schijman, A. G., & Truyens, C. (2019). Congenital transmission of *trypanosoma cruzi*: A review about the interactions between the parasite, the placenta, the maternal and the fetal/neonatal immune responses. *Frontiers in Microbiology*, *10*(AUG), 1854. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01854/BIBTEX>
- Li, X., Aldayel, A. M., & Cui, Z. (2014). Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *Journal of Controlled Release*, *173*(1), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.032>
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. In *Journal of Physical Oceanography* (Vol. 49, Issue 6). American Meteorological Society. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Lidani, K. C. F., Bavia, L., Ambrosio, A. R., & de Messias-Reason, I. J. (2017). The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>
- Lieke, T., Graefe, S. E. B., Klauenberg, U., Fleischer, B., & Jacobs, T. (2004). NK Cells Contribute to the Control of *Trypanosoma cruzi* Infection by Killing Free Parasites by Perforin-Independent Mechanisms. *Infection and Immunity*, *72*(12), 6817. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6817-6825.2004>
- Maldonado, E., Morales-Pison, S., Urbina, F., & Solari, A. (2022). Vaccine Design against Chagas Disease Focused on the Use of Nucleic Acids. In *Vaccines* (Vol. 10, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines10040587>
- Martín-Escolano, J., Marín, C., Rosales, M. J., Tsaousis, A. D., Medina-Carmona, E., & Martín-Escolano, R. (2022). An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. In *ACS Infectious Diseases* (Vol. 8, Issue 6, pp. 1107–1115). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00123>
- Martínez, T. (2018). *Caracterización biológica, genotipificación e identificación de antígenos de aislados de Trypanosoma cruzi obtenidos en el Estado de Oaxaca*.
- Martins-Melo, F. R., Castro, M. C., & Werneck, G. L. (2021). Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. *Acta Tropica*, *220*. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105948>
- Melo, R. de F. P., Guarneri, A. A., & Silber, A. M. (2020). The Influence of Environmental Cues on the Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae Vector. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00027>

- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2020). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 20:2, 20(2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Mosquillo, M. (2017). *Compuestos metálicos anti-Trypanosoma cruzi: evaluación celular y transcriptómica*.
- Nazarizadeh, A., Staudacher, A. H., Wittwer, N. L., Turnbull, T., Brown, M. P., & Kempson, I. (2022). Aluminium Nanoparticles as Efficient Adjuvants Compared to Their Microparticle Counterparts: Current Progress and Perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23094707>
- Pech-Canul, Á. D. L. C., Monteón, V., & Solís-Oviedo, R. L. (2017a). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from Trypanosoma cruzi. In *Journal of Parasitology Research* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/3751403>
- Pech-Canul, Á. D. L. C., Monteón, V., & Solís-Oviedo, R. L. (2017b). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from Trypanosoma cruzi. In *Journal of Parasitology Research* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/3751403>
- Pegu, H., Tamuly, S., Sharma, R. K., Borah, P., & Nath, R. (2022). Immunopotential of Pasteurella multocida bivalent outer membrane protein-based vaccine entrapped in aluminum hydroxide nanoparticles. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(4), 2299–2307. <https://doi.org/10.1007/S42770-022-00795-1/FIGURES/10>
- Ponce, R. (2017). *Caracterización enzimática de una enolasa recombinante de T. solium y su potencial uso como antígeno inmunodiagnóstico de neurocisticercosis*. Universidad Peruana Cayetano Heredia .
- Ramírez-Toloza, G., Aguilar-Guzmán, L., Valck, C., Menon, S. S., Ferreira, V. P., & Ferreira, A. (2021). Is It Possible to Intervene in the Capacity of Trypanosoma cruzi to Elicit and Evade the Complement System? *Frontiers in Immunology*, 12, 5248. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.789145/BIBTEX>
- Ramírez-Toloza, G., & Ferreira, A. (2017). Trypanosoma cruzi evades the complement system as an efficient strategy to survive in the mammalian host: The specific roles of host/parasite molecules and Trypanosoma cruzi calreticulin. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01667>
- Ramsey, J. M., Townsend Peterson, A., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D. A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., de la Cruz-Félix, K., & Ibarra-Cerdeña, C. N. (2015). Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 339. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140404>

- Rodríguez-Bejarano, O. H., Avendaño, C., & Patarroyo, M. A. (2021). Mechanisms associated with trypanosoma cruzi host target cell adhesion, recognition and internalization. In *Life* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11060534>
- Salgado-Jiménez, B., Arce-Fonseca, M., Baylón-Pacheco, L., Talamás-Rohana, P., & Rosales-Encina, J. L. (2013). Differential immune response in mice immunized with the A, R or C domain from TcSP protein of Trypanosoma cruzi or with the coding DNAs. *Parasite Immunology*, 35(1), 32–41. <https://doi.org/10.1111/pim.12017>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00251.x>
- Secretaria de salud. (2014). *Programa de Acción Específico Prevención y control de la Enfermedad de Chagas 2013-2018*.
- Silva-dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque, J., Guerra, B., Moreira, O. C., Berbert, L. R., Ramos, M. T., Mascarenhas, B. A. S., Britto, C., Morrot, A., Serra Villa-Verde, D. M., Garzoni, L. R., Savino, W., Cotta-de-Almeida, V., & Meis, J. de. (2017). Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to Trypanosoma cruzi infection and target tissues. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005507>
- Somoza, M., Bertelli, A., Pratto, C. A., Verdun, R. E., Campetella, O., & Mucci, J. (2022). Trypanosoma cruzi Induces B Cells That Regulate the CD4+ T Cell Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 789373. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.789373/BIBTEX>
- Sousa-Rocha, D., Thomaz-Tobias, M., Diniz, L. F. A., Souza, P. S. S., Pinge-Filho, P., & Toledo, K. A. (2015). Trypanosoma cruzi and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0139569>
- Valera-Vera, E. A., Sayé, M., Reigada, C., Miranda, M. R., & Pereira, C. A. (2020). In silico repositioning of etidronate as a potential inhibitor of the Trypanosoma cruzi enolase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 95, 107506. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2019.107506>
- Velázquez-Ramírez, D. D., Pérez de León, A. A., & Ochoa-Díaz-López, H. (2022). Review of American Trypanosomiasis in Southern Mexico Highlights Opportunity for Surveillance Research to Advance Control Through the One Health Approach. In *Frontiers in Public Health* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.838949>

Vieira, C. B., Praça, Y. R., Bentes, K. L. da S., Santiago, P. B., Silva, S. M. M., Silva, G. dos S., Motta, F. N., Bastos, I. M. D., de Santana, J. M., & de Araújo, C. N. (2018). Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 405.  
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00405/FULL>

Zapata-Estrella, H., Hummel-Newell, C., Sanchez-Burgos, G., Escobedo-Ortegon, J., Ramirez-Sierra, M. J., Arjona-Torres, A., & Dumonteil, E. (2006). Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunology Letters*, *103*(2), 186–191.  
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.11.015>