



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“Evaluación del Glucopiranosil lípido A (GLA-SE) y
E6020-SE como adyuvantes para una vacuna terapéutica
(TSA-1r) contra *Trypanosoma cruzi* en ratones BALB/c.”**

Tesis presentada por:

I.B.Q VICTOR MANUEL DZUL HUCHIM.

En opción al grado:

Maestro en Investigación en Salud.

Director de Tesis

DR. MIGUEL ENRIQUE ROSADO VALLADO

Mérida, Yucatán, enero de 2017.



UADY
FACULTAD DE
MEDICINA

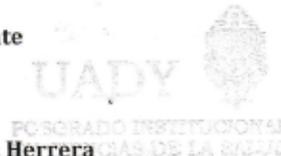
Oficio: PICSA/005/17.
Enero 9 de 2017.

AUTORIZACIÓN PARA IMPRESIÓN DE TESIS

La tesis, "Evaluación del Glucopiranosil lípido A (GLA-SE) y E6020-SE como adyuvantes para una vacuna terapéutica (TSA-1r) contra *Trypanosoma cruzi* en ratones BALB/c.", presentada por el IBQ. Víctor Manuel Dzul Huchim, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestro en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de lo establecido en el Plan de Estudios vigente del Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud, por lo que se le autoriza la impresión de los ejemplares correspondientes de acuerdo a formato establecido.

Atentamente

Dra. Norma Elena Pérez Herrera
Coordinadora del Programa Institucional
en Ciencias de la Salud



Ccp. Archivo

Av. Itzáes entre 59 y 59-A Apdo. Postal 1225-A C.P. 97000, Mérida, Yuc., Méx.
Tels.: 923-32-60, 923-32-97, 928-59-85 y 928-53-29, Fax: (999) 924-05-54

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Durante la realización de este trabajo, he conocido gente maravillosa, la cual me ha ayudado para alcanzar esta meta. No podría mencionarlos a todos, sin embargo, mencionare a algunas personas.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Miguel Rosado Vallado y Eric Dumonteil por darme la oportunidad de crecer y desarrollarme en el laboratorio de Parasitología, agradezco por tantas horas de revisión y por los grandes consejos que no solo me ayudaron en la elaboración de la tesis, sino que también a tomar muchas decisiones en la vida.

De igual manera agradezco mucho a mis revisores de tesis: Dra. Elsy Canche Pool, Dr. Javier Escobedo Ortégón, Dr. Julio Torres Romero y Dra. Reyna Colli Dula por todas sus sugerencias, correcciones, tiempo invaluable dedicado a este proyecto y la amabilidad de formar parte de mi Comité de Revisión, sin duda los aprecio mucho.

A mis amigos de laboratorio quienes se tomaron el tiempo de enseñarme ya sea una técnica experimental o el uso de algún software: Q.F.B. Christian Teh Pot, M.I.S. Juan José de la Cruz López, Dra. Fabiola Villa de la Torre, Dra. Nora Hernández, Dra. Liliana Villanueva, Dr. Vladimir Chan Cruz y Q.F.B. Chuly Ramirez. Un agradecimiento muy especial a Leticia Chin Hau, Miguel Castellanos Chacón y Carolina Arias Arguez, a los cuales les tengo mucho afecto y cariño. Gracias por apoyarme de una forma u otra en la realización de mi trabajo experimental y por pasar momentos muy agradables.

Y por último quiero agradecer a mis padres: Victor Dzul Zum y Geny Huchim Carrillo por tantos sacrificios que han hecho para que yo este terminando la maestría. No tengo palabras para expresar lo mucho que estoy agradecido con ellos.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Parasitología perteneciente al Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán, como parte del proyecto “Optimización de vacunas contra *Trypanosoma cruzi*” financiado por CONACYT, clave CB-2010-01 #156513 y No. de registro SYSTPROY CIRB-2012-000.

ÍNDICE

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	3
III	ANTECEDENTES.....	5
III.1.	Espectro clínico de la enfermedad.....	5
III.2.	Vías de transmisión de la enfermedad.....	6
III.2.1.	Transmisión por transfusión sanguínea	7
III.2.2.	Transmisión transplacentaria	7
III.2.3.	Transmisión accidental.....	7
III.2.4.	Transmisión oral.....	8
III.2.5.	Transmisión por trasplante de órganos.....	8
III.3.	Triatomíneos y su distribución.....	8
III.4.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	9
III.5.	Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
III.5.1.	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> en el triatómimo.....	10
III.5.2.	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> en el huésped vertebrado.....	11
III.6.	Tratamientos	12
III.6.1.	Uso de medicamentos E1224 y Fenixidazol como tratamientos contra <i>T. cruzi</i>	13
III.7.	Tipos de respuesta inmune contra <i>T. cruzi</i>	15
III.8.	Vacunas terapéuticas contra la enfermedad de Chagas	19
III.9.	Vacunas de proteína recombinante contra la enfermedad de Chagas.....	21
III.10.	Principales antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
III.10.1	Antígeno TSA-1.....	25
III.11.	Adyuvantes	26
III.11.1.	Adyuvantes compuestos de aluminio.....	28
III.11.2.	Oligodeoxinucleótidos de citocina-fosfato-guanina (CpG-ODN).....	28
III.11.3.	E6020	29

III.11.4. Glucopiranosil lípido A (GLA).....	31
IV HIPÓTESIS.....	34
V OBJETIVO GENERAL	35
V.1. Objetivos específicos.....	35
VI MATERIALES Y MÉTODOS	36
VI.1. Tipo y diseño de estudio.....	36
VI.2. Universo y muestra.....	36
VI.3. Definición de las variables y escala de medición	36
VI.4. Criterios de aceptación, eliminación y exclusión.	37
VI.5. Fuentes y recolección de la información	37
VI.6. Diagrama de flujo.....	38
VI.7. Obtención de la proteína TSA-1r	39
VI.8. Formulación de los candidatos a vacuna.....	40
VI.9. Modelo animal.....	40
VI.9.1. Manipulación y cuidado de los animales	41
VI.10. Modelo de eficiencia y respuesta inmune.....	41
VI.11. Infección e inmunización.....	42
VI.12. Cuantificación de los parásitos en sangre periférica	42
VI.13. Sacrificio y obtención de suero, bazo y corazón.....	43
VI.14. Aislamiento de esplenocitos del ratón	43
VI.15. Estimulación ex vivo de esplenocitos con rTSA1	44
VI.16. Congelación y almacenamiento de esplenocitos.....	44
VI.17. Marcaje de células con anticuerpos anti CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , IL-4 e IFN- γ	45
VI.18. Cuantificación de linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺ productores de INF- γ e IL-4.	46
VI.19. Medición de inmunoglobulinas IgG total, IgG1 e IgG2a	48
VI.20. Análisis de lesión cardíaca.....	50

VI.21. Cuantificación de carga parasitaria cardiaca de tejido cardiaco por reaccion en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	50
VI.22. Análisis estadístico	51
VI.23. Consideraciones éticas.....	52
VII RESULTADOS	53
VII.1. Evaluación de la integridad de la proteína recombinante.....	53
VII.2. Evaluación de la eficiencia conferida por la inmunización	53
VII.3. Efecto de la vacuna más los adyuvantes sobre la producción de anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2a	58
VII.4. Efecto de los candidatos a vacuna sobre el porcentaje de linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺ productores de IFN- γ e IL-4	61
VIII DISCUSIONES	65
IX CONCLUSIONES	71
X PERSPECTIVAS	72
XI REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS	73

I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública que afecta a más de 10 millones de personas en el mundo, los fármacos aprobados son poco eficaces y frecuentemente causan efectos secundarios no deseados. Una opción para el tratamiento de la enfermedad es el desarrollo de vacunas terapéuticas. Las vacunas generadas a partir de proteínas recombinantes orientan respuestas tipo TH2, las cuales no son apropiadas para el control de la infección. El uso de algunos tipos de adyuvantes puede incrementar la inmunogenicidad de las vacunas recombinantes, orientándola hacia una vía TH1 y de esta manera combatir eficientemente al parásito intracelular. En el presente estudio se determinó la eficacia del uso de los adyuvantes GLA-SE y E6020-SE en conjunto con la vacuna terapéutica TSA-1r ante una infección experimental con *T. cruzi* en un modelo murino. Ratones BALB/c fueron infectados con 500 tripomastigotes de la cepa H1 de *T. cruzi*. Al día 7 y 14 post-infección fueron inmunizados con el antígeno TSA-1r en combinación con cada uno de los adyuvantes. Al día 50, los animales fueron sacrificados para determinar la eficacia de las formulaciones de vacuna mediante los parámetros de: parasitemia, sobrevivencia, así como carga parasitaria y células inflamatorias en tejido cardíaco. Se evaluó la respuesta inmune humoral por medio de la determinación de niveles de anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2a y respuesta inmune celular mediante la determinación de porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4. En este estudio se observó que TSA-1r tiende a aumentar los niveles de parasitemia, carga parasitaria cardíaca y densidad de células inflamatorias, a su vez que reduce la tasa de sobrevivencia. Los resultados obtenidos demostraron que la adición de GLA-SE o E6020-SE en combinación con TSA-1r mejora la eficacia al compararla usando solo TSA-1r, a la vez que induce altos niveles de anticuerpos IgG totales e IgG2a. El uso terapéutico de TSA-1r solo, genera efectos negativos en el control del proceso infeccioso. Los resultados indican que la adición de los adyuvantes a la proteína recombinante anula el efecto negativo provocado por

este antígeno, favoreciendo la activación de la respuesta inmune y la supervivencia de ratones infectados.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, descrito por primera vez en 1909 por el Dr. Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil. Este parásito es transmitido por varias especies de insectos hematófagos (*Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus* etc.) pertenecientes a la subfamilia Triatominae.¹ Los insectos infectan a personas expuestas a su picadura al depositar sus heces contaminadas en heridas de la piel o sobre mucosas, aunque también existen maneras no vectoriales de transmisión de la enfermedad (oral, transfusiones sanguíneas, accidentes de laboratorio).¹ Esta infección afecta la salud de un gran número de seres humanos, además de ser una causa de mortalidad y morbilidad; en América Latina se estima que 6-7 millones de personas se encuentran infectadas y el 25% de la población de América Central y Sudamérica están en riesgo de adquirir la enfermedad.²

La enfermedad de Chagas está asociada a la pobreza y se encuentra ampliamente difundida, principalmente en las áreas rurales donde el insecto vector suele encontrarse.³ Presenta dos fases: la fase aguda, la cual se caracteriza por presentar síntomas como fiebre, anorexia, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia leve y miocarditis, luego la enfermedad pasa a una fase crónica, la cual al inicio es asintomática. Pasando el periodo asintomático aparecen alteraciones que dan como resultado problemas como desórdenes neurológicos (como por ejemplo la demencia), mega vísceras, daño en el músculo cardíaco y la alteración más común: la cardiopatía chagásica.⁴

Actualmente no existe un tratamiento específico contra *T. cruzi*. Solamente dos fármacos están disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: Benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche) y Nifurtimox (Lampit® Bayer), los cuales han sido aceptados por la OMS (Organización Mundial de la Salud), como la quimioterapia específica contra *T. cruzi*; sin embargo, no son del

todo efectivas en la fase crónica de la enfermedad.⁵ El Nifurtimox y el Benznidazol poseen una actividad importante y bien documentada en la fase aguda (aproximadamente el 80% de cura parasitológica en pacientes tratados). Aunado a ello, se ha observado efectos secundarios como la hepatotoxicidad, anorexia, vómito, polineuropatía periférica y dermatopatía alérgica, los cuales son más graves en individuos adultos.⁶

Una alternativa para combatir la enfermedad es el desarrollo de vacunas. Las vacunas terapéuticas basadas en proteínas recombinantes han demostrado ser seguras y su costo de producción es bajo, sin embargo poseen una inmunogenicidad reducida y la respuesta que provocan es básicamente humoral vía TH2.⁷ Debido a que el parásito es intracelular, para que una vacuna sea capaz de controlarlo debe activar una respuesta inmune celular hacia una vía TH1. Se ha demostrado que el uso de adyuvantes incrementa la eficacia de las vacunas recombinantes, y algunos de ellos son incluso capaces de reorientar la respuesta inmune hacia TH1, por lo tanto ayudan a producir una respuesta más efectiva contra el parásito intracelular.⁸

En la actualidad una amplia gama de adyuvantes han sido probados en vacunas contra parásitos protozoarios usando modelos animales con resultados prometedores. Los adyuvantes Glucopiranosil Lípido A y E6020 no han sido probados en vacunas recombinantes contra *T. cruzi*, sin embargo han demostrado ser capaces de incrementar la rapidez, magnitud y duración de la respuesta inmune contra otros patógenos. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la capacidad de adyuvantes Glucopiranosil Lípido A y E6020 en una vacuna de proteína recombinante contra la enfermedad de Chagas en un modelo murino.^{9,10}

III. ANTECEDENTES

III.1. Espectro clínico de la enfermedad de Chagas

Se reconocen dos fases clínicas de la enfermedad de Chagas (Cuadro 1): la fase aguda, y la fase crónica. La fase aguda comienza cuando el parásito *T. cruzi*, entra en el hospedero. La reacción local, en el portal de entrada es seguida por un malestar general. El índice de diagnóstico en la fase aguda es solamente de 1% a 2% en todos los pacientes, los síntomas duran aproximadamente de 4 a 8 semanas, los cuales son muy leves y atípicos, razón por la cual pasan desapercibidos en la mayoría de los casos.¹ En esta fase la principal característica es la presencia de parásitos en el torrente sanguíneo, razón por la cual se emplean métodos directos para detectar la presencia de *T. cruzi*. En individuos no tratados, los niveles de parasitemia decrecen, esto debido a un equilibrio que se alcanza entre el parásito y la respuesta inmune del hospedero; este equilibrio puede ser un “receso” en la vida de los pacientes en los cuales pueden ser detectados anticuerpos IgG contra *T. cruzi*.¹¹ Entre los síntomas se incluyen: fatiga, fiebre y malestar general presentándose en ocasiones salpullido, pérdida del apetito, diarrea, vómitos, y en algunos casos incluso se ha observado linfangitis, hepatomegalia y esplenomegalia.² En un 90% de los casos, cuando el sitio de la infección es el ojo, se desarrolla un edema doloroso en el párpado y tejidos perioculares, conocido como “signo de Romaña”, sin embargo tener el signo de Romaña no necesariamente implica ser portador del parásito infeccioso.

El final de la fase aguda marca el inicio de la siguiente fase de la enfermedad de Chagas, conocida como la fase crónica. La fase crónica se subdivide en fase crónica indeterminada (o asintomática) y fase crónica cardíaca. La fase crónica indeterminada se caracteriza por la ausencia de síntomas y una baja parasitemia. Los sujetos muestran una completa capacidad física y los electrocardiogramas practicados se encuentran entre los parámetros normales. En esta etapa, únicamente es posible detectar la presencia del parásito entre 20% a

60% de los casos por métodos indirectos o serológicos tales como detección de anticuerpos. Se ha documentado que entre el 50% a 70% de los individuos infectados pueden continuar en esta fase por el resto de su vida.¹²

La fase crónica cardiaca, se caracteriza por una parasitemia indetectable, así como una ausencia de síntomas generales dando lugar a síntomas como megavísceras (principalmente megaesófago y megacolon) y a la denominada cardiopatía chagásica; la consecuencia clínica más importante de la infección (caracterizada por arritmias cardiacas y tromboembolismo). Se ha documentado que aproximadamente el 30% de los individuos infectados desarrollan esta fase. Debido a las graves complicaciones que conlleva esta fase de la enfermedad, la mayoría de los pacientes mueren.¹¹

Cuadro 1. Fases y síntomas de la enfermedad de Chagas.²

Fase	Características.	Síntomas	Duración.
Aguda	Se puede observar parásitos en sangre periférica.	Malestar general. Fiebre. Diarrea. Vómito. Dolor de cabeza. Pérdida de apetito, Signo de Romaña.	De 1-2 meses.
Crónica (asintomática)	No se observan parásitos en sangre periférica.	No hay síntomas.	Indeterminada, puede durar de 5-20 años aproximadamente.
Crónica (sintomática)	Parásitos en tejido cardiaco.	Cardiopatía chagásica. Megavísceras.	

III.2. Vías de transmisión de la enfermedad

El principal mecanismo de transmisión del parásito a los mamíferos, incluyendo al hombre, es por insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*.

En las heces del insecto se encuentran los tripomastigotes metacíclicos (forma infectante del parásito), que penetran por rascado o frotamiento del mismo hospedero, ya sea en el sitio de la picadura, o lesiones de continuidad. La enfermedad de Chagas puede ser transmitida por mecanismos que no involucren la picadura del insecto vector, entre ellas la transfusión sanguínea y la transmisión vertical de madre a hijo, accidentales de laboratorio e incluso vía oral.¹³

III.2.1. Transmisión por transfusión sanguínea

En el humano, es la segunda forma de transmisión más importante, representa entre un 5- 20%. Un grupo de alto riesgo para adquirir la infección son los pacientes hemofílicos, ya que requieren de transfusiones frecuentes.¹⁴

III.2.2. Transmisión transplacentaria

El riesgo de transmisión transplacentaria oscila entre 0 y 9%, donde la mediana está cerca del 1%. Es decir, el 1% de las gestantes chagásicas corren el riesgo de transmitir la infección al producto. En humanos, la transmisión parece ocurrir entre el tercer y quinto mes de embarazo, dependiendo de la localización y daño de la placenta por parte del parásito, desde donde es capaz de infectar al feto. Los niños recién nacidos de madres infectadas presentan la forma típica de enfermedad aguda asociada con prematuridad, hepatoesplenomegalia, parasitemia alta y la presencia de anticuerpos IgM específicos.¹⁵

III.2.3. Transmisión accidental

Esta puede ocurrir en laboratorios o en hospitales, por el manejo inadecuado de material biológico contaminado por parte de los mismos investigadores, o del personal colaborador que no acata las medidas de seguridad en el laboratorio. Por ejemplo: manejo de triatominos, cultivos de *T. cruzi*, manejo de sangre de pacientes infectados.⁶

III.2.4. Transmisión oral

Este modo de transmisión no tiene importancia epidemiológica, es posible a través de la ingesta de triatomíneos o mamíferos infectados y por la alimentación con leche materna al bebé de las mujeres infectadas.⁶

III.2.5. Transmisión por trasplante de órganos

El trasplante de órganos de donadores infectados es un modo de transmisión de *T. cruzi* que ha recibido poca atención, dada la poca documentación de tales casos. Los pacientes que han recibido trasplante de órganos de donadores con la enfermedad crónica desarrollan episodios agudos de la enfermedad y el parásito se puede aislar de sangre periférica. Algunos casos fatales se han reportado, en los cuales los parásitos se han identificado y aislado de diferentes órganos. Como los individuos receptores están bajo terapia inmunosupresora, su susceptibilidad aumenta considerablemente.⁶

III.3. Triatomíneos y su distribución

Los insectos vectores causantes de la enfermedad de Chagas pertenecen al Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae y Género *Triatoma*, comúnmente conocidos como “chinchas besuconas” en el sur de Latinoamérica y “pic” en la península de Yucatán. Son insectos que se caracterizan por poseer aparato bucal succionador, la mayoría son fitófagos, algunos predadores y unos pocos hematófagos. Su distribución abarca América y Asia, pero la mayoría de las especies se localizan en América central. Estos hemípteros son de tamaño pequeño o mediano, el cual varía considerablemente entre los diferentes grupos del género. Su apariencia es generalmente sencilla, no obstante existen especies con colores vistosos, y como la mayoría de los insectos son fotosensibles.¹⁶

Al momento o después de alimentarse, el triatomíneo hace una deyección líquida que tiene dos aspectos: uno de color amarillento que se seca

rápidamente al contacto con el aire y otro que se seca lentamente y es de color negro. Este comportamiento de picar y defecar se debe a la necesidad del triatomino de succionar más sangre y almacenarla desocupando su intestino. Las chinches besuconas nacen libres de infección, se infectan al alimentarse del hombre y de los animales domésticos silvestres que se encuentran infectados por el parásito hemoflagelado: a diferencia de los mamíferos, los insectos triatominos almacenan al parásito infectivo dentro de sus intestinos. El ciclo de vida de los triatominos oscila entre 4 y 16 meses.¹⁶

III.4. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protista de la clase Zoomastigophora, familia Trypanosomatidae cuyo ciclo de vida involucra vertebrados e invertebrados (una en el hombre u hospederos reservorios y otra en los insectos transmisores). (Figura-1).¹⁷ Se caracteriza por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria. El genoma mitocondrial se encuentra ordenado en una compleja y compacta región (cerca de la base del flagelo), denominada cinetoplasto.

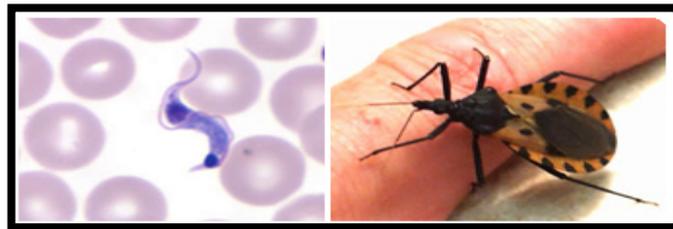


Figura 1. *Trypanosoma cruzi* y *Triatoma dimidiata*. Fuente: Adaptado del CDC.

En el hospedero mamífero se encuentra en la sangre adaptando una forma típica llamada tripomastogote (forma infectiva) y en las células del sistema retículo endotelial y en otros tejidos adopta la forma de amastigote (forma reproductiva en mamíferos). En el intestino del insecto transmisor, *T. cruzi* presenta la morfología de epimastigote (forma reproductiva en insectos), y adopta la forma tripomastigote metacíclico en las heces del insecto. El parásito se presenta en una gran variedad de cepas e infecta 150 especies de 24 familias de

animales domésticos y silvestres (como perros, gatos, zarigüeyas, ratones etc).
17,18

III.5. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida del parásito *T. cruzi* comprende 3 formas principales: epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes, siendo esta última la forma infectiva (Figura-2).¹⁸

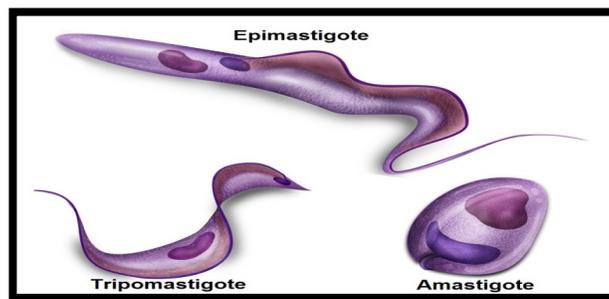


Figura 2. Diferentes formas de *T. cruzi*, las cuales varían según el hospedero que los aloje.
Fuente: Adaptado del CDC.

III.5.1. Ciclo biológico de *T. cruzi* en el triatomino

El ciclo biológico de *T. cruzi* en el hospedero invertebrado puede realizarse en larva, ninfa o en el insecto adulto y siempre se efectúa en el intestino del triatomino. Las formas tripomastigotes ingeridas por el insecto se transforman en epimastigotes cortos (forma replicativa del *T. cruzi* en el vector), algunas veces las formas epimastigotes se agregan dando la impresión de masas multinucleadas, los cuales se multiplican y producen las formas epimastigotes largas que se encuentran en la parte posterior del intestino medio. Una etapa importante de la interacción de *T. cruzi* con el huésped invertebrado es la adhesión de las formas epimastigotes a la superficie del epitelio del intestino medio y posterior, así como a la capa cuticular del epitelio de la glándula rectal y del saco rectal, lo que puede observarse 8 días después de la infección. Al cabo de 8 a 10 días aparecen en el recto pequeños tripomastigotes que se han

originado de los epimastigotes. Estos tripomastigotes metacíclicos son expulsados en las heces y son la forma infectante para mamíferos vertebrados (Figura-3).¹⁹

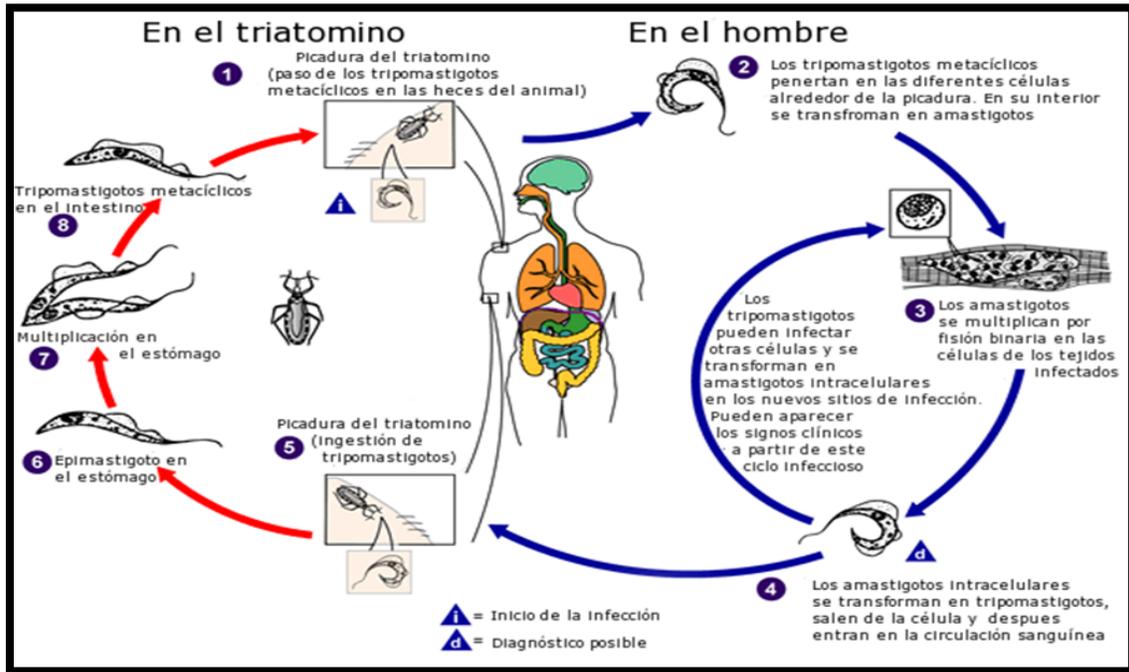


Figura 3. Ciclo biológico del *T. cruzi* en vertebrados e invertebrados. Fuente: Adaptado del CDC.

III.5.2. Ciclo biológico de *T. cruzi* en el hospedero-vertebrado

El parásito transmitido al hospedero vertebrado (mamíferos incluyendo al humano) por las heces del triatomino es llamado en esta etapa “tripomastigote metacíclico”. Los tripomastigotes pueden invadir inmediatamente las células o pueden ser transportados en la sangre a otros sitios antes de invadir las células del huésped.²⁰ La principal vía de entrada de tripomastigotes a la célula hospedera es la vía fagocitosis/macropinocitosis también llamada “vía dependiente de actina”. En la vacuola parasitófora los tripomastigotes liberan transialidasa/neuraminidasa la cual elimina residuos de ácido siálico de la membrana de la vacuola parasitófora y la vuelven sensible a la acción de la molécula Tc-Tox (péptido homólogo al factor 9 del complemento humano) que origina la formación de poros y fragmentación de la membrana de la vacuola. Dentro de estas células se diferencian en formas amastigotes que se multiplican rápidamente. Los amastigotes son redondeados con un flagelo externo muy corto o inexistente. El desarrollo de amastigotes a tripomastigotes se inicia después de cumplirse un número pre-programado de

divisiones intracelulares, al cabo de las cuales la célula huésped se destruye y los tripomastigotes entran en el torrente sanguíneo. Los tripomastigotes en sangre circulante tienen flagelo libre, un cinetoplasto voluminoso, terminal o subterminal que contiene el 30% del DNA del parásito y un núcleo oval. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma amastigote intracelular.^{21,22}

III.6. Tratamientos

El principal objetivo de un tratamiento es erradicar al parásito y disminuir los signos y síntomas de la enfermedad. De acuerdo a la OMS (Organización Mundial de la Salud) un fármaco ideal para el tratamiento de enfermedades parasitarias debería cubrir los siguientes requerimientos:

- 1.- Proporcionar la cura parasitológica en todas las fases de la enfermedad.
- 2.- Ser efectivo en una dosis única o en pocas dosis.
- 3.- Poseer un bajo costo con la finalidad de ser accesible a todos los pacientes.
- 4.- No debe poseer efectos colaterales o teratogénicos.
- 5.- Su uso no debe requerir hospitalización.
- 6.- No inducir resistencia por parte del parásito.

Dos fármacos han sido aprobados como agentes antiparasitarios en esta infección: el Nifurtimox y el Benznidazol. Ambos fármacos se encuentran lejos de ser ideales para tratar esta parasitosis debido a que poseen una eficacia limitada contra las diferentes cepas de *T. cruzi*, además es necesaria su administración a largo plazo, y poseen elevadas tasas de efectos adversos en adultos como alteraciones digestivas (náuseas, vómitos, pérdida de peso), hematológicas (trombocitopenia, leucopenia, agranulocitosis), dermatológicas (eritema, dermatitis atópica) y neurológicas (polineuropatías). El Benznidazol posee una tasa más baja de efectos adversos en comparación con el Nifurtimox,

por lo que es utilizado como tratamiento de primera línea, mientras que el Nifurtimox ha sido discontinuado.²³

El tratamiento tripanocida es recomendado para todos los casos de la enfermedad en fase aguda, en la transmisión congénita, en infección en niños y personas mayores de 18 años que cursen con la fase crónica de la enfermedad. El tratamiento farmacológico generalmente es ofrecido a adultos entre 19 y 50 años sin evidencia de cardiopatía chagásica. En contraste, es contraindicado durante el embarazo y en pacientes con insuficiencia renal o hepática, y no debería ser ofrecido a pacientes con cardiopatía chagásica severa o megaesófago con deterioro de la deglución.¹

Después de la introducción del Nifurtimox y el Benznidazol, pocos fármacos como el alopurinol y otros inhibidores de los esteroides se han trasladado a ensayos clínicos. Sin embargo, los avances en la proteómica, bioquímica y en la comprensión de los aspectos biológicos de la infección por *T. cruzi*, han permitido el desarrollo de nuevos enfoques en los fármacos (tales como el E1224 y el Fenixidazol) para la identificación de objetivos parásito-específicos y, por lo tanto, el diseño de nuevos fármacos potenciales.

Otro problema en el tratamiento terapéutico de la enfermedad de Chagas es la resistencia de este parásito ante el Benznidazol, para lo cual se evalúan alternativas de tratamiento, entre ellas el uso de derivados de nitroimidazoles como el Fexinidazol, el cual ha sido evaluado en modelos murinos resistentes a *T. cruzi* y ha demostrado ser efectivo cuando se administra de manera oral durante la fase aguda a crónica de la enfermedad.

III.6.1. Uso de medicamentos E1224 y Fenixidazol como tratamientos contra *T. cruzi*.

El E1224 es un compuesto antifúngico descubierto y fabricado por la empresa farmacéutica japonesa Eisai que ha sido desarrollado como tratamiento

para la enfermedad de Chagas con el apoyo y financiamiento de Wellcome Trust. Es un profármaco del ravuconazol, cuya vía de administración es por vía oral. Ha demostrado una potente actividad contra *T. cruzi* debido a su buena tolerancia y absorción, además permitió la posibilidad de administrarse una sola vez a la semana, aunado a su precio asequible la convirtieron en un candidato prometedor para el tratamiento de la enfermedad.

Según resultados del primer ensayo clínico Fase 2 (con pacientes humanos) en Bolivia, realizado por la iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi, por sus siglas en inglés), el candidato a medicamento E1224 demostró una buena seguridad y resultó ser efectivo en la eliminación del parásito *T. cruzi*, menores lesiones en el corazón y disminución de efectos secundarios indeseables, sin embargo tuvo poca o ninguna eficacia un año después del tratamiento cuando fue usado como única medicación. Por otra parte, el tratamiento estándar contra la enfermedad de Chagas, el Benznidazol, demostró ser efectivo a largo plazo, pero siguió demostrando efectos adversos (dolores hepáticos, náuseas y dolor de cabeza principalmente). Sin embargo, algunos de los pacientes que recibieron la dosis más elevada del medicamento tuvieron que interrumpirlo debido a efectos adversos (nauseas, dolor de cuerpo), pero siendo menores a los efectos del Benznidazol. Sin embargo, 12 meses después del tratamiento, menos de un tercio de los pacientes tratados con E1224 tuvieron una eliminación sostenida del parásito en comparación con el 80% de los pacientes tratados con Benznidazol, lo que demuestra índices de eliminación relativamente bajos con E1224. Los resultados presentados en la Reunión Anual de la Sociedad Americana de Medicina Tropical e Higiene (ASTMH, por sus siglas en inglés), destacan la necesidad de investigar regímenes alternativos de dosificación y posibles combinaciones terapéuticas para mejorar la atención a millones de pacientes.¹¹

Si bien E1224 no resultó efectivo como agente de tratamiento único (monoterapia), los resultados sugirieron emplearlo en combinación con

medicamentos existentes, ya que demostró una actividad positiva firme durante el tratamiento, con una respuesta sostenida al tratamiento en un tercio de los pacientes que recibieron la dosis más elevada. El E1224 ya no será analizado como monoterapia para la enfermedad de Chagas, pero DNDi y Eisai están considerando la posibilidad de analizar E1224 en un tratamiento combinado con Benznidazol.

Por otra parte, la iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas anunció en el Congreso Internacional de Parasitología (ICOPA, por sus siglas en inglés) el lanzamiento de un estudio farmacológico de fase II para probar el fexinidazol, una droga que había caído en desuso en la década de 1980 y que fue recuperado por DNDi hace casi una década para los pacientes con enfermedad de Chagas. En estudios de fase I, el Fexinidazol demostró tener eficacia superior, en comparación con el actual estándar de atención (Benznidazol y Nifurtimox), en un modelo murino de infección aguda de la enfermedad de Chagas.²⁴ Estudios han confirmado que fexinidazol es eficaz para curar infecciones de *T. cruzi* experimentales en modelos de fase aguda y crónica de la enfermedad. A dosis más altas, se demostró que el tratamiento con fexinidazol podía lograr mejores tasas de curación y prevención de la inflamación cardíaca en comparación a Benznidazol. El fexinidazol también se está probando en África para otras dos enfermedades causadas por parásitos: la enfermedad del sueño y la leishmaniasis visceral.²⁵

III.7. Tipos de respuesta inmune contra *T. cruzi*

Se ha reportado que *T. cruzi* infecta una gran variedad de células incluyendo macrófagos, fibroblastos y células del sistema muscular. Durante la fase aguda en humanos y la infección experimental murina se produce una represión de la respuesta de linfoproliferación hacia los antígenos y mitógenos de *T. cruzi*.^{1,26}

En los primeros 7 a 10 días después de la infección, antes de iniciar la activación y participación de la inmunidad adquirida, la respuesta inmune innata desempeña un papel crucial en el control de la parasitemia por medio de la acción de mediadores microbicidas como los intermediarios reactivos de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), y los intermediarios reactivos de nitrógeno, como por ejemplo el óxido nítrico (NO) cuya producción se ve aumentada por la acción de citocinas proinflamatorias.²⁰ En esta etapa actúan mecanismos microbicidas de células de la inmunidad innata como los macrófagos y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés).

El reconocimiento inicial de los patógenos se encuentra mediado por “receptores de reconocimiento de patrones” (PRR, por sus siglas en inglés), principalmente por los “receptores tipo Toll” (TLR, por sus siglas en inglés). Los TLR reconocen diferentes estructuras moleculares presentes en los patógenos y desencadenan la activación del “factor nuclear potenciador de cadenas kappa (NF-κB, por sus siglas en inglés), dirigiendo la producción de citocinas proinflamatorias, moléculas coestimuladoras y otros mediadores, los cuales limitan el crecimiento de los patógenos y promueven el desarrollo de la inmunidad adaptativa.^{27,28}

Seguidamente se lleva a cabo la activación y expansión clonal de las subpoblaciones de linfocitos que conduce a la inducción de una inmunidad adquirida contra el parásito mediada por células T CD4⁺ (linfocitos T CD4⁺), T CD8⁺ (linfocitos T CD8⁺) y células B.²⁹ En la inmunidad adquirida humoral se desarrolla la activación policlonal de linfocitos B. La activación policlonal de los linfocitos B conduce a la hipergamaglobulinemia, generando altos niveles de anticuerpos en el suero del hospedero, lo cual retrasa la respuesta inmune humoral específica. Diferentes isotipos de IgG han sido implicados en la activación policlonal de los linfocitos B y en la respuesta de anticuerpos específica contra *T. cruzi*.

Durante la fase efectora de la respuesta inmune celular, los linfocitos T CD4⁺ reconocen antígenos extracelulares asociados a moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II, por sus siglas en inglés) presentes en las “células presentadoras de antígeno profesionales” (CPA) como son las células dendríticas (CD) y los macrófagos. Los linfocitos T CD4⁺ dependiendo del perfil de citocinas que liberan, pueden dividirse en dos subpoblaciones denominadas TH1 o TH2. La subpoblación TH1 está asociada a una respuesta protectora contra la infección por *T. cruzi* y se caracteriza por la producción de citocinas pro-inflamatorias como Interferon gama (INF- γ), (Interleucina) IL-12 y Factor de necrosis tumoral (TNF- α). La IL-12 desencadena la producción de IFN- γ por linfocitos NK. El IFN- γ producido induce a las células plasmáticas a producir inmunoglobulinas IgG2a y a la producción de otras citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β y Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), esta última estimula la proliferación y estimulación de macrófagos a partir de monocitos en la médula ósea; todos estos factores influyen para combatir eficientemente al parásito intracelular. La subpoblación TH2 produce citocinas como IL-4 e IL-10 que en conjunto inhiben las funciones protectoras de la subpoblación TH1 y por lo tanto están asociadas a la susceptibilidad al parásito. Sin embargo, los linfocitos T CD4⁺ tipo TH2 colaboran en la activación de células B induciendo su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos antígeno específico.³⁰

Por otra parte, los parásitos de *T. cruzi* han desarrollado mecanismos que pueden inhibir la presentación de antígenos y/o la maduración de las células dendríticas. Se ha observado que en las células dendríticas humanas infectadas, los parásitos son capaces de inhibir la producción de IL-12 e IFN- α impidiendo de este modo una efectiva respuesta celular.²⁵ Por lo tanto, la respuesta tipo TH1 es crucial en el control de la parasitemia y la sobrevivencia, mientras que la respuesta tipo TH2 esta correlaciona con la persistencia del parásito. Una respuesta inmune adaptativa ineficaz o inadecuada resulta en una incontrolable carga parasitaria que ocasiona la muerte del hospedero. Sin embargo, a pesar del control de la carga

parasitaria por diferentes respuestas efectoras, el control de la infección no se logra, lo que lleva a la cronicidad de la infección.²⁰

Cuadro 2. Tipos de respuesta y mecanismo de acción contra el parásito intracelular *T. cruzi*,³¹

Tipo de respuesta.	Mecanismo de acción contra <i>T. cruzi</i>.
Respuesta innata.	<ul style="list-style-type: none"> -Mecanismos microbicidas de células de la inmunidad innata como los macrófagos y células asesinas naturales (NK). -Acción de mediadores microbicidas como los intermediarios reactivos de oxígeno (ROS), y el óxido nítrico (NO), cuya producción se ve aumentada por la acción de citocinas proinflamatorias.
Respuesta adaptativa humoral.	<ul style="list-style-type: none"> -Activación policlonal de los linfocitos colaboradores para la producción de anticuerpos específicos contra <i>T. cruzi</i>. -Linfocitos T CD4⁺ colaboran en la activación de células B induciendo su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos de antígeno. -Los LT CD4⁺ dependiendo del ambiente de citocinas estimularán la producción de anticuerpos IgG1 (si el ambiente es favorecido por citocinas anti-inflamatorias) o IgG2a (si el ambiente es favorecido por citocinas pro-inflamatorias) en las células plasmáticas.
Respuesta adaptativa celular.	<ul style="list-style-type: none"> -Linfocitos T CD8⁺ citotóxicos liberan proteínas granulares denominadas perforinas y granzimas que eliminan células infectadas.

Por otra parte, en la inmunidad adquirida celular los linfocitos T CD8⁺ se encargan del reconocimiento de antígenos que son procesados intracelularmente por vía del proteosoma y asociados a moléculas del MHC de clase I (MHC-I). La activación de los linfocitos T CD8⁺ induce su diferenciación hacia células T citotóxicas (CTL, por sus siglas en inglés). El mecanismo principal de citólisis mediada por CTL, es la liberación de proteínas granulares denominadas perforinas y granzimas que eliminan células infectadas, este tipo de respuesta es la más eficaz contra el parásito intracelular *T. cruzi* (Cuadro 2 y Figura-4).^{32,33}

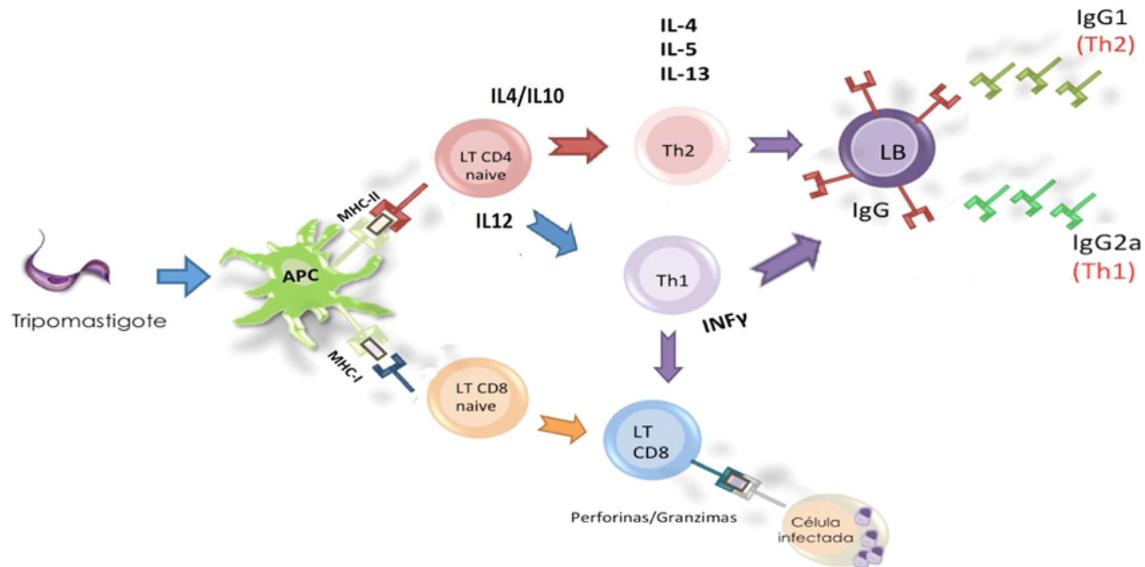


Figura 4. Respuesta inmune contra el parásito *Trypanosoma cruzi*. El parásito es reconocido por las células presentadoras de antígeno vía MHC II, en donde dependiendo del ambiente de citocinas la respuesta se orientará hacia una vía Th1 (respuesta efectiva medida por citocinas proinflamatorias) o TH2 (respuesta poco efectiva medida por citocinas antiinflamatorias). De igual manera, el parásito también puede ser presentado por cross-priming vía MHC I, por medio de esta vía se activan linfocitos T CD8⁺ citotóxicos para la eliminación de células infectadas por el parásito.³¹

III.8. Vacunas terapéuticas contra la enfermedad de Chagas

La vacunación es una de las estrategias más usadas en la actualidad para la prevención de enfermedades, consiste en la administración de un microorganismo, una parte de él, o un producto derivado del mismo, con el objeto de producir una respuesta inmune protectora (células de memoria), de forma similar a la inducida por la infección natural, pero sin peligro de producir la enfermedad.³⁴

Las vacunas terapéuticas están basadas en antígenos específicos de gérmenes infecciosos que el sistema inmune puede reconocer para generar una respuesta inmune después de que el individuo entre en contacto con el agente infeccioso, es decir que la infección ya está establecida. En el caso de estudios

preclínicos, las vacunas de uso terapéutico inician con la infección de los animales a evaluar y posteriormente estos son tratados con las dosis de la vacuna en cuestión. En general, el esquema de vacunación comprende de una inmunización y un refuerzo, esto con el fin de generar la reestimulación del sistema inmune.³⁵⁻³⁷ El principal objetivo de la vacunación terapéutica es la inducción de una respuesta inmune específica contra un microorganismo patógeno causante de una infección logrando así su total eliminación. Este tipo de vacunas resultan particularmente útiles para aquellas patologías que por su prevalencia o severidad no son consideradas por los gobiernos como “prioritarias” para ser integradas dentro de los esquemas nacionales de vacunación, pero que sin embargo representan una valiosa alternativa para la población que la padece.³⁵⁻³⁷

En el 2004, Dumonteil y colaboradores realizaron un estudio para evaluar la inmunoterapia en ratones BALB/c infectados con 500 tripomastigotes, el modelo experimental fue sometido a 2 dosis de la vacuna de ADN formulado con el antígeno TSA-1 y Tc24, los cuales demostraron su efectividad. Ambos antígenos redujeron la parasitemia y proporcionaron respuesta inmune celular aumentando la proliferación de linfocitos T CD8⁺; sin embargo Tc24 mostro mejor efectividad ya que hubo un 100% de sobrevivencia de modelos infectados a comparación de TSA-1 (70% de sobrevivencia).³⁸

En el 2006, Zapata y colaboradores evaluaron el efecto terapéutico y protector del candidato a vacuna de ADN a partir del antígeno Tc-24 en ratones ICR infectados con 500 tripomastigotes durante el periodo agudo y crónico, los resultados muestran un incremento de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ y disminución en la parasitemia comparada a los grupos controles.³⁹

En estudios más recientes, se evaluó el efecto profiláctico y terapéutico de los antígenos TSA-1 y Tc24 combinados y administrados como vacunas de ADN en tres cepas de ratones infectados con *T. cruzi*. Los ratones BALB/c y C57BL6 presentaron una significativa reducción en la parasitemia y en la

densidad de células inflamatorias de corazón, comparadas con el grupo control. Similarmente, la administración inmunoterapéutica de estos plásmidos combinados fue capaz de reducir significativamente inflamatoria en tejido cardiaco en ratones ICR con infección crónica.⁴⁰

III.9. Vacunas de proteína recombinante contra la enfermedad de Chagas

Durante el último siglo se han desarrollado diversos tipos de vacunas con base en las características biológicas y bioquímicas del agente causal, al tipo de respuesta inmune que se requiere inducir y a los avances biotecnológicos disponibles hasta la actualidad. Los principales tipos de vacunas pueden clasificarse en: vacunas atenuadas, vacunas recombinantes y vacunas de ADN (Cuadro 3).

Cuadro 3. Principales tipos de vacunas utilizadas actualmente.⁷

	Vacunas atenuadas	Vacunas recombinantes	Vacunas de ADN
Respuesta inmune que induce	Humoral y celular	Humoral	Celular
Inmunogenicidad	Altas	Moderadas	Moderadas
Costos de producción	Altos	Moderados	Bajos
Seguridad	De riesgo (reversión a formas infectantes)	Muy seguras	Seguras (¿Integración?)

Con el advenimiento de la ingeniería genética fue posible el desarrollo de las llamadas vacunas de segunda generación. Presentan la misma eficacia de vacunas vivas convencionales y la seguridad de vacunas inactivadas convencionales. Se emplea tecnología genética para transferir genes de diferentes patógenos (que codifican para antígenos y por lo tanto producen respuesta inmune) en organismos de fácil crecimiento como bacterias. De ello deriva el nombre de recombinantes, por la combinación de genes de dos organismos diferentes.⁴¹

El gen es insertado en un plásmido que es utilizado posteriormente para transformar bacterias o transfectar líneas celulares eucariontes. Dichas células son cultivadas en laboratorio con el fin de que produzcan la proteína deseada (antígeno). Las proteínas así obtenidas son aisladas y purificadas para su uso como vacunas. Este tipo de vacunas son muy seguras y eficaces para inducir una respuesta tipo TH2 favoreciendo la respuesta inmune humoral, lo cual se debe a que dichas vacunas promueven la captura y el procesamiento del antígeno por parte del sistema endosomal al momento de ser fagocitado por la célula presentadora de antígeno. De este modo el antígeno es degradado hasta péptido que se asocian a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II. Este complejo péptido/MHC clase II, presente en las membranas de las células presentadoras de antígeno, estimula linfocitos T CD4⁺ pero no es capaz de estimular linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, existen algunos adyuvantes que han demostrado ser capaces de favorecer el procesamiento antigénico vía MHC clase I, lo que favorece la activación de linfocitos T CD8⁺ que inducen una respuesta de tipo TH1.⁴¹

En el año 2007, Duthie y colaboradores evaluaron la respuesta inmune de ratones C57BL/6 luego de ser infectados, los ratones fueron inmunizados con 40 µg del antígeno recombinante SA85-1.1 adicionada con el adyuvante incompleto de Freud, los resultados indican un incremento en los niveles de anticuerpos y linfocitos T CD4⁺, sin embargo, no se observó una reducción en la parasitemia ni en tejido cardíaco.⁴²

En un estudio realizado por Martínez Campos y colaboradores en el Centro de Investigaciones Regionales en la ciudad de Mérida durante el año 2013 se evaluó el uso terapéutico del antígeno recombinante Tc24. Ratones BALB/c fueron infectados con 500 tripomastigotes y posteriormente inmunizados con 50 µg del antígeno recombinante combinado con el adyuvante Monofosforil Lípido A (MLA), esta combinación produjo un aumento de anticuerpos IgG2a y la

orientación hacia una respuesta TH1, estos resultados indican la seguridad del antígeno y el adyuvante.⁴³

III.10. Principales antígenos de *Trypanosoma cruzi*

Independientemente de que se trate de una vacuna con antígeno purificado, recombinante o de ADN, el punto crítico para la generación de una vacuna efectiva es la adecuada selección del mismo. El antígeno seleccionado debe de ser capaz de activar clonas de linfocitos T y B específicos, de producir una respuesta inmune que permite la eliminación del patógeno y la generación de células de memoria.⁴⁴

Los primeros antígenos de *T. cruzi* en ser descritos a nivel molecular fueron aquellos reconocidos por anticuerpos del suero de pacientes o animales infectados (Cuadro 4). Estos incluyen miembros de la familia de proteínas de superficie como proteínas de superficie o las trans-sialidasas (TS) expresadas principalmente en los tripomastigotes infectivos y en las formas amastigotas del parásito. Estas proteínas han sido involucradas en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune y son particularmente importantes en la fase crónica de la enfermedad. El segundo grupo de antígenos descritos pertenece a la familia de cisteína-proteasas, como la cruzipaína, expresadas en todas las formas del parásito. Otros antígenos incluyen proteínas flagelares fijadoras de calcio, antígeno LYT-1, Tc24 y Tc52, entre otros.³⁰

En el año 2007, Sánchez-Burgos y colaboradores, realizaron un estudio cuyo objetivo fue identificar los antígenos más eficaces para controlar la infección por *T. cruzi*. Se incluyeron antígenos ASP-2, TS, TSA-1, Tc52 y Tc24, todos estos antígenos son presentados por el parásito tanto en su etapa tripomastigote como amastigote. Se demostró que TSA-1, Tc24 y Tc52 fueron los antígenos que mejor controlan la infección al reducir significativamente la parasitemia, la carga parasitaria en el corazón, la mortalidad y las lesiones en el

miocardio de los ratones previamente infectados con 500 parásitos vía intraperitoneal.⁴⁵

La evaluación de la protección contra *T. cruzi*, en modelos murinos de infección, tratados con una vacuna basada en el antígeno recombinante de TSA-1, desarrollaron una fuerte respuesta inmune y una sobrevivencia del 70% en comparación con el grupo control según estudios realizados por Wrightsman y colaboradores.⁴⁶ Por otra parte Tc24 es una proteína de secreción que se encuentra presente en todas las cepas de *T. cruzi*. Esta proteína ha sido evaluada como proteína recombinante, demostrando que posee la capacidad de inducir niveles significativos de protección en ratones contra una dosis letal de parásitos. Por lo tanto ambas proteínas (TSA-1 y Tc24) han sido evaluadas como candidatos a vacunas de DNA, demostrando la capacidad de reducir significativamente la parasitemia, la mortalidad, la miocarditis y la carga parasitaria cardiaca, además de inducir la activación de linfocitos T CD8⁺.^{40,45}

Cuadro 4. Vacunas terapéuticas y profilácticas contra *T. cruzi*.

Modelo	Respuesta inmune	Sobrevivencia (%)	Antígeno recombinante	Referencia
C57BL/6	TH1	30-60	ASP-1, ASP-2 y TSA-1	Garg y Tarleton ⁴⁷
BALB/c	TH1	----	p154/ 13 plásmido + Propionibacterium	Mussalem <i>et al.</i> ⁴⁸
C57BL/6	TH1	----	Tres dosis de DNA plásmido codificando TcG1, TcG2 y TcG4	Bathia y Garg. ⁴⁹
BALB/c	TH1/TH2	92	TcSP TcSP4 genes de proteínas recombinantes.	Rosales-Encina. ⁵⁰
BALB/c	TH1	----	Cruzipaina	Schanpp <i>et al.</i> ⁵¹
C57BL/6J	TH1	80	FCaBP Tcβ3 LYT1	Fralish y Tarleton. ⁵²
BALB/c	----	70	Tc13	García <i>et al.</i> ⁵³
BALB/c	----	70% con TSA-1 100% con Tc24.	TSA-1 Tc24	Dumonteil <i>et al.</i> ³⁸
ICR	TH1	----	TSA-1, TS, ASP-2, Tc52 y Tc24.	Sánchez-Burgos <i>et al.</i> ⁴⁵
BALB/c.	TH1	60-70	TSA-1 y Tc24	Quijano, Castro <i>et al.</i> ³⁷
BALB/c.	TH1	70-80	TSA-1 y Tc24	Limon, Cervera <i>et al.</i> ⁴⁰

III.10.1. Antígeno TSA-1

Las trans-sialidasas son de particular interés porque representan la familia de proteínas más extensas del parásito con más de 1400 genes que codifican; así mismo son las proteínas más extensas de la superficie del parásito y juegan un papel clave en la biología de este. La transialidasa de superficie del parásito *T. cruzi* mejor conocido como TSA-1 se ha evaluado en pruebas preclínicas y como antígenos de vacunas terapéuticas y profilácticas contra la enfermedad de Chagas.^{37,38,40,45}

El antígeno TSA-1 se clasifica dentro de una superfamilia llamada Superfamilia de Antígenos de Superficie de Tripomastigotes o también Superfamilia de las Trans-sialidasas (las cuales catalizan la transferencia de ácido siálico de los glicoconjugados del huésped a la superficie del parásito; de esta manera son menos susceptibles a ser eliminados por el sistema inmune).²⁹ La proteína TSA-1 se encuentra en la superficie de la membrana plasmática de tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos y en amastigotes. El antígeno TSA-1 fue el primer miembro de la familia en ser identificado y caracterizado, codifica para una proteína de 85 kDa, la familia de genes TSA-1 se distingue de otros miembros de la superfamilia por la presencia de repeticiones en tándem no peptídicas cerca de la región carboxi-terminal. En un estudio realizado por Whrightman y colaboradores en 1993 se evaluó la respuesta inmune conferida a ratones BALB/c infectados por *T. cruzi*, en este estudio se descubrió que las respuestas inmunitarias provocadas por la región carboxi-terminal de TSA-1 no propician protección contra el parásito. En contraste, la vacunación con la región amino-proximal de TSA-1 aumenta la protección y la respuesta inmune contra el parásito. Estos resultados sugieren que las respuestas del epítipo inmunodominante(s) dentro de la porción carboxilo-terminal de TSA-1 enmascaran epítipos dentro de la porción amino-proximal de la proteína, los cuales son capaces de estimular las respuestas inmunes del huésped. Por lo tanto, se sugirió desde entonces eliminar la región C-terminal de la proteína dejando así una

proteína de 65kDa aproximadamente, la cual posee efectos inmunogenicos mucho más efectivos que la proteína original.⁴⁶

En este estudio se usó una proteína recombinante expresada a partir de un plásmido que contiene el gen que codifica la proteína de la familia de las trans-sialidasas, la cual es altamente inmunogénica, de acuerdo a estudios donde se ha usado como antígeno recombinante para diagnóstico y como vacuna. La vacuna de proteína recombinante que se usó está basada en el vector plasmidico pET41a, la expresión del antígeno TSA-1 de *T. cruzi* se obtuvo a partir de cultivos de *Escherichia coli* de la cepa BL21 transformadas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Características del antígeno TSA-1

Sistema de expresión	<i>E. coli</i> /BL21
Vector de expresión	pET41a
Promotor	Promotor T7, con inducción de IPTG
Aminoácidos	596
Peso molecular	65.7kDa
Punto isoeléctrico	5.51

III.11. Adyuvantes

Debido a que las vacunas basadas en antígenos purificados, sintéticos o recombinantes son más específicos pero menos inmunogénicos, se opta por la administración en compañía de componentes denominados adyuvantes, que incrementan la potencia, la calidad y la duración (memoria) de la respuesta inmune. Los adyuvantes también contribuyen a lograr una respuesta inmune efectiva en edades muy tempranas, cuando el sistema inmune aún no está suficientemente maduro y es necesario vacunar contra enfermedades que afectan a niños, así como también pueden mejorar el efecto protector de las vacunas en personas inmunodeprimidas y en edades avanzadas.⁵⁴

Estos compuestos normalmente se utilizan con varios propósitos:

a) Como componente esencial de vacunas humanas o veterinarias profilácticas o terapéuticas.⁵⁵

- b) Para la producción de anticuerpos poli y monoclonales.
- c) Como herramientas para estudiar la respuesta inflamatoria en biomodelos experimentales.⁵⁶
- d) En ensayos toxicológicos para evaluar respuestas de hipersensibilidad.

Características de un adyuvante:⁵⁷⁻⁵⁹

1. Seguro, que no produzca eventos adversos inmediatos o a largo plazo
2. Bien definido desde el punto de vista químico
3. Bien definido en su mecanismo de acción
4. Biodegradable tras su administración
5. Químicamente estable en su envase por largo tiempo (al menos 2 años) y con pocas probabilidades de variaciones entre lotes
6. Capaz de desarrollar respuestas inmunes efectivas (alto porcentaje de protección) utilizando bajas concentraciones de antígenos, con pocas dosis y por diferentes vías de administración, incluyendo las mucosas
7. Elevada eficacia contra cualquier antígeno
8. De fácil preparación
9. De bajo costo

Los adyuvantes poseen diferentes efectos sobre el sistema inmune, la mayor parte actúa como sistemas de depósito o estimulando a las células presentadoras de antígenos, sin embargo la naturaleza e identidad del antígeno contribuye a la función que pueda observarse al aplicar una vacuna (Cuadro 6).⁵⁸

Cuadro 6: Principales tipos de adyuvantes usados en vacunas.

Adyuvantes	Ejemplos	Efectos	Aprobados para su uso en humanos
Compuestos de aluminio	Al(OH) ₃ AlOHPO ₄ SO ₄ Al ₄ (OHPO ₄) ₃	Efecto depósito. Inducción de respuestas tipo TH2.	Si
Nanoacarreadores	Micelos, polímeros, liposomas.	Facilitan el transporte y liberación del antígeno.	No

Saponinas		Aumentan el transporte de los antígenos.	No
Agonistas de los receptores tipo Toll	MLA, GLA, CpG-ODN, Imiquimod	Activación de TLR. Producción de citocinas proinflamatorias Inducción de respuestas tipo TH1	Si / Ensayos clínicos de fase II y III

Entre los adyuvantes más usados en el desarrollo de vacunas contra la enfermedad de Chagas se encuentran: adyuvantes compuestos de aluminio, oligodeoxinucleótidos de citocina-fosfato-guanina (CpG-ODN), E6020 y Glucopiranosil lípido A (GLA) entre otros. En este trabajo nos enfocamos a evaluar los adyuvantes E6020 y GLA.

III.11.1. Adyuvantes compuestos de aluminio

Los 3 compuestos empleados son el hidróxido ($\text{Al}(\text{OH})_3$), el fosfato ($\text{Al}_4(\text{OHPO}_4)_3$) y el sulfato fosfato ($\text{Al}(\text{OHPO}_4)\text{SO}_4$) de aluminio, que pueden formularse con el antígeno durante el proceso de formación del gel o por adsorción del antígeno con el gel preformado.⁵⁹ El mecanismo de acción de los compuestos de aluminio dependen fundamentalmente del efecto de depósito y de un efecto citolítico en el sitio de inoculación, con liberación de moléculas endógenas como ácido úrico y ADN que estimulan el inflammasoma Nalp3 como una vía importante en su acción adyuvante.⁶⁰ A pesar de considerarse poco tóxico, este adyuvante produce inflamación local que puede llevar a la formación de granulomas. Otros efectos que se han atribuido al hidróxido de aluminio son la miofascitis macrofágica y otros trastornos autoinmunes.⁶¹ En la actualidad, la polarización que induce hacia TH2 lo hace poco efectivo para muchas vacunas de nueva generación, lo cual ha estimulado la búsqueda de nuevos adyuvantes.

III.11.2. Oligodeoxinucleótidos de citocina-fosfato-guanina

Los oligonucleótidos de citocina-fosfato-guanina (CpG-ODN, por sus siglas en inglés) son una clase de adyuvantes formados por secuencias de

dinucléotidos no metilados similares a las que comúnmente se encuentran en el ADN bacteriano. Estos adyuvantes son agonistas del TLR9, que desencadena específicamente su señalización, y se encuentra en los endosomas de las células presentadoras de antígeno.⁶²

Los oligodeoxinucléotidos sintéticos contienen secuencias no metiladas CpG que mimetizan la actividad inmunoestimuladora del ADN bacteriano. Estos motivos interactúan con el TLR9 para iniciar una cascada de señalización, la producción de citocinas proinflamatorias, la diferenciación y proliferación de múltiples tipos celulares, incluyendo linfocitos, células dendríticas, linfocitos NK, monocitos y macrófagos.⁶² Los CpG-ODN son captados por las células por endocitosis adsorptiva y se unen a los TLR9 presentes en los endosomas de los compartimentos intracelulares. En humanos, el TLR9 es principalmente expresado por linfocitos B y células dendríticas plasmocitoides (pDC, por sus siglas en inglés). Actuando directamente sobre éstas células, promueven la producción de citocinas TH1 y desencadenan la maduración/activación de células presentadoras de antígeno profesional. Los CpG-ODN están siendo ampliamente evaluados como adyuvantes, y han demostrado incrementar la rapidez, magnitud y duración de las respuestas inmunes específicas.⁶²⁻⁶⁴

El uso de CpG-ODN mejora la persistencia de la inmunidad protectora por dos mecanismos:⁶⁴

- 1.- Mantenimiento de títulos de anticuerpos por un largo período.
- 2.- Generación de una población de linfocitos B de alta afinidad que responden rápidamente al desafío a pesar de que el título de anticuerpos haya declinado.

III.11.3. E6020

Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, que estimulan la liberación de mediadores pro-

inflamatorios.⁶⁵ Estructuralmente, los LPS se compone de cuatro dominios distintos: el hidrófobo o lípido A membrana de dominio intercalado, un oligosacárido núcleo interno (que contiene heptosa y octulosonate 3-desoxi-D-mano-), un oligosacárido núcleo externo y el dominio de polisacárido-O antigénico, debido a la conformación de estas estructuras permiten ejercer una fuerte respuesta inmunológica.^{66,67}

El adyuvante E6020 es un dímero fosfolipídico sintético, el cual posee la cualidad de imitar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de muchos de los lípidos naturales como por ejemplo los derivados de las bacterias Gram negativas, fue descubierto y desarrollado por los laboratorios de Eisai; este compuesto es un agonista del receptor TLR-4, por lo tanto, provoca una respuesta immunoestimulante que es propicio para su uso como adyuvante de vacunas.¹⁰

TLR4, es el blanco de LPS y moléculas relacionadas como por ejemplo el monofosforil lípido A (MPL, por sus siglas en ingles) y dímeros fosfolipidicos como E6020. Este receptor induce dos vías de señalización distintas controlados por (i) MyD88/MAL que resulta de la activación del factor nuclear NF- κ B para la inducción de citocinas inflamatorias, y (ii) TRIF, que induce la producción de interferones de tipo I (IFN).⁶⁸ TLR4 también juega un papel importante en la maduración de células dendríticas, las cuales son clave en la inmunogenicidad de las vacunas, ya que las células dendríticas juegan un papel significativo en la diferenciación de células T vírgenes y el inicio de respuestas inmunes.⁶⁹ Estudios han demostrado que tanto la proteína MyD88 como TRIF sinérgicamente participan para la activación de células dendríticas. Esta activación se produce rápidamente después de que los LPS interaccionan con la “proteína de unión a LPS” (LBP, por sus siglas en ingles) y CD14, una proteína de superficie celular o soluble glicosilfosfatidilinositol ligada a las respuestas eficientes de LPS. El complejo de señalización conlleva a una unión hidrofóbica de MD2, que a su vez interactúa con TLR4, esta cascada de señalizaciones culminan en producción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ y activación de NF- κ B⁷⁰

En un estudio realizado por Ishizaka y colaboradores, se diseñaron y sintetizaron dímeros de fosfolípidos que carecen de un núcleo de disacárido; con la porción hidrófoba compuesta por un total de seis cadenas de acilo, tres cadenas de acilo por monómero, enlazado a una parte hidrófila que contiene dos fosfatos monovalentes. El diseño de estos dímeros era tal que se podía manipular fácilmente la distancia entre los dos monómeros de fosfolípidos, la estequiometría de la unión de lípidos, la longitud y la funcionalidad de estos para proporcionar diversas formas fisicoquímicas y para investigar el impacto en la actividad biológica de estas diversas estructuras. Se realizaron estudios para evaluar las propiedades fisicoquímicas, moleculares y reactividad *in vitro* de este adyuvante en comparación a otros semejantes. Varios de los análogos de E6020 confirmaron que los cambios en la estereoquímica o la distancia entre las unidades monoméricas de fosfolípidos no sólo alteran las propiedades fisicoquímicas de la molécula, sino también a su actividad biológica y por ende su actividad inmunológica. Gracias a esas pruebas se permitió seleccionar al adyuvante E6020 como el más prometedor para el desarrollo de adyuvante de vacuna.¹⁰

El E6020 ha sido probado preclínicamente como un adyuvante mezclado con una serie de antígenos de proteína. Es importante destacar que, el agonista sintético mejora los niveles de anticuerpos IgG2a en ratones, propiciando una activación de respuesta tipo TH1, por otra parte, reduce los títulos de IgE e IL-5. En cuanto a la vía de administración, se demostró que el E6020 es eficaz tanto por vía subcutánea y por vía intranasal en ratones. Los estudios de seguridad sobre E6020 muestran un amplio margen de seguridad, sin problemas de seguridad más allá de la respuesta de citoquinas inherente a su mecanismo de acción.⁷¹

III.11.4. Glucopiranosil lípido A (GLA)

Es bien sabido que los LPS, contenidos en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas son un potente estimulador del sistema inmune, sin embargo, estos son de carácter tóxico y por ende no son aptos para su uso en

vacunas. Debido a esta problemática se opta por el desarrollo de derivados no tóxicos de LPS. Uno de estos es el monofosforil lípido A (MLA), el cual es producido a partir de *Salmonella minnesota* R595 por hidrólisis ácida. Eliminando los núcleos de hidratos de carbono, el fosfato de la glucosamina del extremo reductor, y la cadena de acilo de la posición 39 del eje central del disacárido se reduce drásticamente la toxicidad del lipopolisacárido.⁷² El producto resultante demuestra solamente 0.1% de la toxicidad inflamatoria de su molécula original.⁷³ Además, promueve la diferenciación de IFN- γ por parte de GM-CSF estimulador por linfocitos T CD4⁺ cooperadores, mejorando así la respuesta inmune celular al ser administrado conjuntamente con antígenos.

Una variante del MLA, es el Glucopiranosil lípido A (GLA), el cual es un derivado de lípido A sintético compuesto por un esqueleto de disacárido, un único grupo fosfato y seis cadenas acilo C14. En un estudio realizado por Coler y colaboradores se compararon los efectos del monofosforil lípido A (MLA) y Glucopiranosil lípido A (GLA).⁷⁴ La estimulación con los adyuvantes MLA y GLA a través del receptor TLR-4 aumenta sustancialmente la magnitud y funcionalidad de las respuestas por mecanismos dependientes de MyD88 y TRIF.⁷⁵ Generalmente la superposición de los eventos de señalización de MyD88 y TRIF puede causar efectos inflamatorios nocivos, así como producir una potente respuesta inmune adaptativa.⁷⁶ Sin embargo, mientras los LPS desencadenan una inflamación excesiva, el GLA genera una respuesta segura, efectiva y no tóxica.⁵⁵

Según los resultados del estudio se reportó que el GLA fue en general más potente en comparación al MLA cuando se probó en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humanas y células dendríticas. GLA promueve la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T CD4⁺ dirigiendo las respuestas hacia un perfil tipo TH1, requerido para la protección efectiva contra patógenos intracelulares. La adición de GLA como adyuvante incrementa la producción de IL-6, citocina esencial para la diferenciación de linfocitos T citotóxicos. La IL-6 estimula la producción de

granzima B y reduce la expresión de la molécula inhibidora PD1 (Program-Death 1, por sus siglas en ingles) en la superficie de los linfocitos T CD8⁺. Asimismo, el GLA mejora la inmunogenicidad al ser coadministrado en antígenos recombinantes, produciendo una fuerte respuesta TH1.⁷⁴

IV. HIPÓTESIS

La adición de adyuvantes GLA-SE y E6020-SE potencia la respuesta inmune inducida por la vacuna terapéutica de proteína recombinante TSA-1 y es capaz de controlar la infección experimental con *T. cruzi* en ratones BALB/c.

V. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la eficiencia del uso de los adyuvantes GLA-SE y E6020-SE en conjunto con la vacuna terapéutica TSA-1r ante una infección experimental con *T. cruzi* en ratones BALB/c.

VII.1. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los adyuvantes GLA-SE y E6020-SE sobre la eficiencia conferida por la administración de la proteína TSA-1r a través de la cuantificación de la parasitemia, supervivencia, carga parasitaria cardiaca y análisis histopatológico.
- Evaluar el efecto de los adyuvantes GLA-SE y E6020-SE sobre la respuesta inmune humoral inducida por la administración de la proteína TSA-1r a través de la determinación de niveles de anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2.
- Evaluar el efecto de los adyuvantes GLA-SE y E6020-SE sobre la respuesta inmune celular inducida por la administración de la proteína TSA-1r a través de la determinación de los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS:

VI.1. Tipo y diseño de estudio

De acuerdo al periodo en que se capta información → Prospectivo.

De acuerdo a la evolución del fenómeno estudiado → Longitudinal.

De acuerdo a la interferencia del investigador → Experimental.

VI.2. Universo y muestra

El universo se compone por ratones BALB/c, la muestra experimental corresponde a cuarenta y dos ratones BALB/c adquiridos de la empresa Harlan Inc. Cada grupo experimental está conformado por siete ratones.

VI.3. Definición de las variables y escala de medición

Cuadro 7. Definición de variables a medir.

Variable.	Definición operacional.	Tipo.	Escala de medición.	Fuente.
Sobrevivencia.	Ratones sobrevivientes durante el tratamiento.	Ordinal.	Cuantitativa.	% de ratones sobrevivientes.
Parasitemia.	Parásitos presentes en torrente sanguíneo.	Ordinal.	Cuantitativa.	Parásitos/ml. (Cámara de Neubauer)
Carga parasitaria cardíaca. (Cuantificación de ADN).	Parásitos que se encuentran presentes en el tejido del corazón.	Ordinal.	Cuantitativa.	Número de copias de ADN de <i>T. cruzi</i> por 50 ng de ADN. (Programa EcoSoftware)
IgG total.	Anticuerpos totales presentes en el suero de los ratones.	Ordinal.	Cuantitativa.	Densidad óptica (ELISA).

IgG1 e IgG2a.	Isotipos de anticuerpos presentes en el suero de los ratones.	Ordinal.	Cuantitativa.	Densidad óptica (ELISA).
Linfocitos T CD4 ⁺ productores de IFN-γ / IL-4.	Linfocitos T CD4 ⁺ presentes en bazo	Ordinal.	Cuantitativa.	Porcentaje de células positivas. (Citometría de flujo)
Linfocitos T CD8 ⁺ productores de IFN-γ / IL-4.	Linfocitos T CD8 ⁺ presentes en bazo.	Ordinal.	Cuantitativa.	Porcentaje de células positivas. (Citometría de flujo)

VI.4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Cuadro 8. Definición de criterios de inclusión, exclusión y eliminación en los grupos experimentales.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.
Ratones BALB/c hembras.	Ratones enfermos.	Ratones que no desarrollaron la infección experimental.
6 a 8 semanas de edad.	Ratones que presenten alguna anomalía no propia de su especie o cepa.	Ratones no infectados.
Peso de 19 a 25 g.		

VI.5. Fuentes y recolección de la información

-Fuentes primarias: Artículos científicos, estudios previos del grupo de investigación.

-Fuentes secundarias: Revisiones científicas, libros.

VI.6. Diagrama de flujo

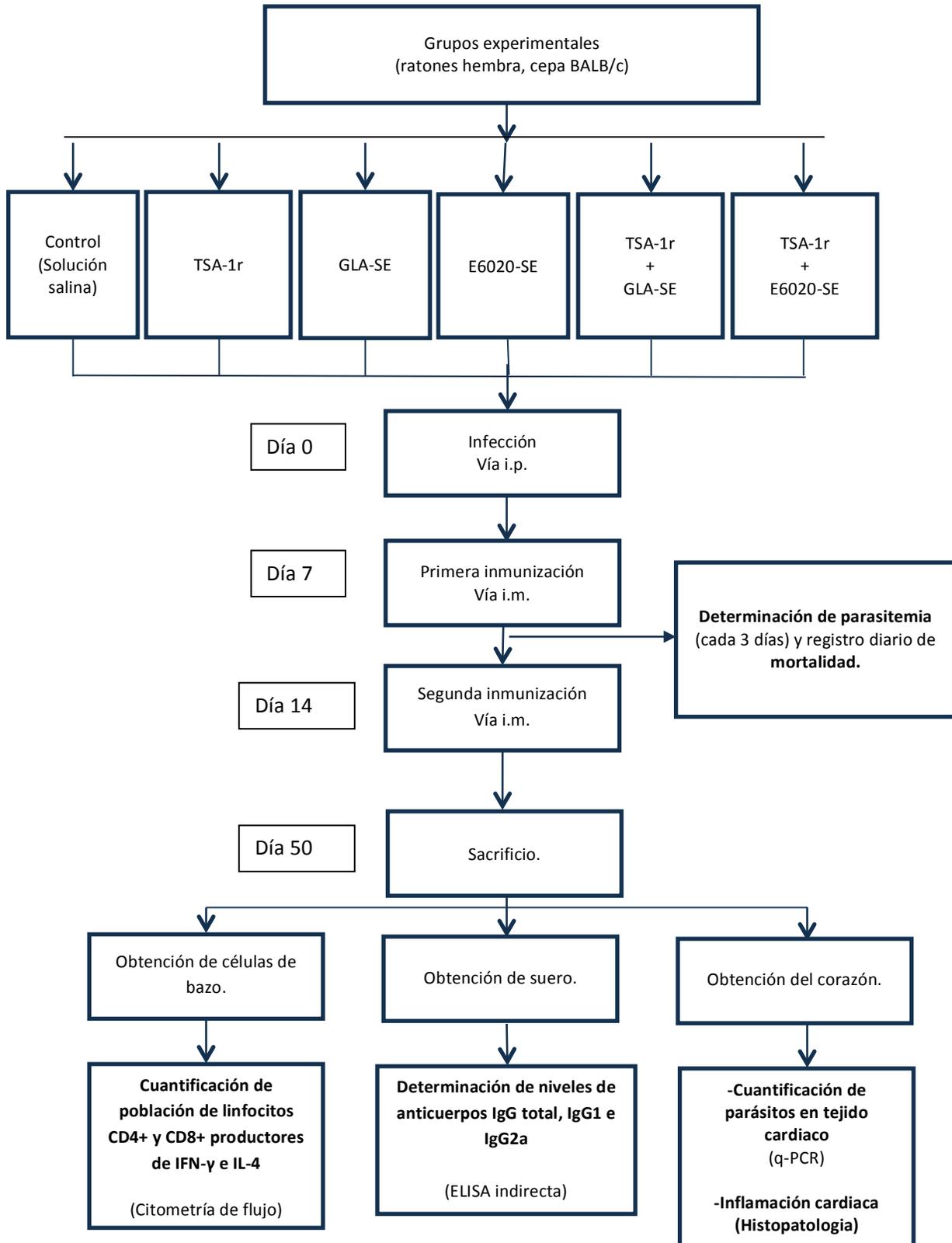


Figura 5. Diagrama del diseño experimental y la metodología utilizada en el presente estudio.

VI.7. Obtención de la proteína TSA-1r

La proteína TSA-1r fue proporcionada por el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México y fue obtenida por medio de un sistema de expresión utilizando la cepa BL21 de la bacteria *Escherichia coli*, el vector de expresión pET41a y un promotor inducible (IPTG), posteriormente la proteína fue purificada por medio de la técnica de cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés); TSA-1r está constituida por 596 aminoácidos y un peso molecular de 65.7 kDa.

Con el fin de evitar la degradación durante su transporte la proteína fue resuspendida en una solución de glicerol y azida de sodio, por lo tanto para el uso en ensayos fue necesario realizar una diálisis de la proteína para eliminar éstas sustancias y así purificarla. Para la diálisis se colocó 3.75mg de la proteína recombinante TSA-1 dentro de una membrana de celulosa (cuyo tamaño de poro fue de 8 kDa) en medio acuoso conformado por amortiguador regulador (Tris-HCl pH 8.0 20 mM, NaCl 20 mM) a 4°C; se realizaron cambios de solución de buffer cada 4 horas durante 12 horas. Posteriormente se centrifugó la muestra a 400 x g por 12 minutos y se recuperó el sobrenadante para almacenarlo en alícuotas de 50 µL a -20°C.

Con la finalidad de evaluar la integridad de la proteína recombinante ya dializada, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y teñido con azul de Coomassie. Se usó como control positivo una muestra de proteína recombinante TSA-1 de un experimento anterior y como control negativo una muestra de agua desionizada. Posteriormente, se evaluó la concentración de la proteína mediante el método de Bradford, comparando la concentración de la

proteína con una curva estándar de albúmina sérica bovina, la cual contenía valores de 2 a 0 mg de proteína / mL de solución.

VI.8. Formulación de los candidatos a vacuna

Para la formulación de las vacunas fueron utilizados los adyuvantes E6020-SE (ESAI, Japón) y Glucopiranosil lípido A (GLA-SE, IDRI, Seattle, WA), en combinación con la proteína recombinante TSA-1 de *T. cruzi*. La formulación de las vacunas se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Formulación de los candidatos a vacuna.

Grupos experimentales	Antígeno TSA-1r	GLA-SE	E6020-SE	Blank SE	Solución salina
Control (solución salina)	-----	-----	-----	-----	50 µL
TSA-1r*	20 µg	-----	-----	-----	cbp 50 µL
GLA-SE**	-----	5 µg	-----	-----	cbp 50 µL
E6020-SE**	-----	-----	5 µg	20 µg	cbp 50 µL
TSA-1r + GLA-SE	20 µg	5 µg	-----	-----	cbp 50 µL
TSA-1r + E6020-SE	20 µg	-----	5 µg	20 µg	cbp 50 µL

cbp: cuanto baste para. *La dosis de la proteína recombinante utilizada fue la propuesta por Taibi y cols.⁷⁷ **La dosis de los adyuvantes corresponde a la utilizada por Hovav y cols.⁷⁸

SE: Solución en escualeno, es un hidrocarburo poli-insaturado, extraído a partir de aceite de hígado de tiburón. Las emulsiones de escualeno mejoran la respuesta inmunitaria, ya que ayudan a promover la interacción de los antígenos hacia las CPA.⁷⁹

VI.9. Modelo animal

Se usaron ratones (*Mus musculus*) hembra de la cepa BALB/c, de 6-8 semanas de edad, y de 19-25 g provenientes del “Centro UNAM-Harlan de Producción de Animales de Laboratorio”. Estos ratones se caracterizan por ser una cepa consanguínea y ser susceptibles a la infección por el parásito *T. cruzi*.⁸⁰

VI.9.1 Manipulación y cuidado de los animales

Una vez que los animales fueron recibidos en el Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimentales y marcados por la técnica de muescas en las orejas para su individualización. Se mantuvieron en un periodo de aclimatación durante 4 semanas con el fin de adaptarse al ambiente del bioterio. Los animales fueron mantenidos en jaulas de 15 x 50cm de largo y 35cm de ancho a temperatura 24 +/- 2°C evitando ruidos mayores a 85 decibeles. Diariamente se les proporcionó agua y alimento de ratón (LabDiet®) previamente esterilizado por U.V, así mismo cada quinto día se realizó cambio de viruta estéril y periódicamente se les asignaba enriquecimiento ambiental (tubos de cartón y papel sin olor previamente esterilizado vía U.V.) con el fin de reducir su estrés ocasionado por la manipulación durante el experimento.

VI.10. Modelo de eficacia y respuesta inmune

La eficacia conferida por el candidato a vacuna se evaluó a través de la cuantificación de la parasitemia, sobrevivencia, carga parasitaria cardiaca y análisis histopatológico.

Para evaluar la respuesta inmune se determinaron los niveles de anticuerpos IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a y determinación de porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4.

VI.11. Infección e inmunización

La infección fue realizada vía intraperitoneal (i.p.), cada animal fue infectado con 500 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* de la cepa H1, obtenida de un paciente infectado del estado de Yucatán y mantenida en el cepario del Laboratorio de Parasitología. Una semana después los ratones fueron inmunizados en el cuadríceps vía intramuscular (i.m.) con la dosis de cada una de las formulaciones del candidato a vacuna (Cuadro 9). Se aplicó un refuerzo de la vacuna (segunda inmunización) 14 días posterior a la infección (p.i).³⁸

VI.12. Cuantificación de los parásitos en sangre periférica

A partir del décimo segundo día posterior a la infección, cada tercer día se evaluó el desarrollo de la infección por medio de la determinación de carga parasitaria en sangre periférica (parasitemia). Para esto, en tubos de 1.5 mL se colocaron 490 μ L de solución salina EDTA al 0.05% (solución anticoagulante) y se añadió 10 μ L de sangre de la parte distal de la cola de los ratones (dilución 1:50).

Para contar el número de parásitos presentes se colocó un cubreobjetos en la cámara de Neubauer ("Bright Line") y en ella se aplicó un volumen de 10 μ L de la solución de sangre-EDTA; se colocó la cámara en el microscopio (40x) y se contó únicamente los cuadrantes de las esquinas de la retícula completa (Figura-6).³⁸

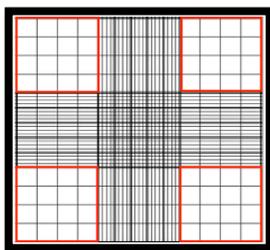


Figura 6. Área de la cámara de Neubauer utilizada en los conteos El conteo se realizó en los cuadrantes remarcados de color rojo.

El número de parásitos fue calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{Número de parásitos/mL} = \frac{\text{parásitos en la cámara}}{4} * \text{factor de dilución} * \text{profundidad de la cámara.}$$

VI.13. Sacrificio y obtención de suero, bazo y corazón

A 50 días de la infección los ratones fueron anestesiados por medio de inyección de pentobarbital sódico (40mg/kg) vía i.m con el fin de sedarlos y así obtener sangre por medio de punción cardiaca, la cual fue centrifugada a 3000rpm, durante 10 minutos a 37°C para poder obtener suero y alicuotarlo en porciones de 20 µL en tubos de 0.5 mL, estos tubos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.^{39,81} Posteriormente los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para extraer el bazo y corazón por métodos quirúrgicos en condiciones asépticas y colocados en recipientes limpios y estériles.³⁸

VI.14. Aislamiento de esplenocitos del ratón

Cada bazo fue colocado en un tubo Falcón de 15 mL provisto con una malla de 125µm², el bazo fue macerado con el embolo de jeringa de 3 mL mientras se drenaban continuamente con medio RPMI simple 1640 (piruvato de sodio 20 µM, 2-mercaptoetanol 5 mM y glutamina 10 mM). Al terminar el macerado se adiciono medio RPMI simple (previamente calentado a 37°C) a cada uno de los tubos hasta obtener un volumen total de 5 mL. Los tubos fueron centrifugados a 200 x g, durante 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió y se adiciono 1 mL de solución TAC (Tris 0.17 M y NH₄Cl 0.16 M) esto con el fin de realizar una lisis de eritrocitos presentes en el filtrado, se incubaron las células a 37°C durante 5 minutos. Se realizaron 3 lavados por medio de centrifugaciones a las mismas condiciones antes mencionadas; al finalizar cada periodo de centrifugación, se decantaba el medio y se volvía a resuspender las células en medio RPMI simple. Al final se resuspendieron las células en 1 mL de medio RPMI suplementado (RPMI 1640 al 10% de suero fetal bovino adicionado con 100 U de penicilina/100mg/mL de estreptomycin). Posteriormente se cuantificaron células viables con

ayuda de una cámara de Neubauer por medio de una dilución 1:1000 con el reactivo de azul de tripano al 0.04%.^{38,81}

VI.15. Estimulación *ex-vivo* de esplenocitos con TSA-1r

En microplacas de cultivo de 96 pozos se realizó la estimulación de esplenocitos con la proteína TSA-1r con el fin de activar a las células antígeno específico. Para esto se adicionó 100 μ L de medio RPMI 1640 suplementado a una concentración de 2×10^5 esplenocitos. Las células fueron estimuladas con 100 μ L (50 μ g/mL) de la proteína recombinante TSA-1, 100 μ L del mitógeno Concanavalina A (Con A) (20 μ g/mL) como control positivo y sin estimulación (100 μ L de RPMI) como control negativo durante 20 horas a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%. A cada uno de los pozos se agregaron 2 μ L de Brefeldina A (BD Golgi Plug No. Cat. 51-2301KZ), 4 horas antes de concluido el tiempo de cultivo con el fin de inhibir el trafico de proteínas. Todos los análisis de estimulación se realizaron por triplicado.⁸²

VI.16. Congelación y almacenamiento de esplenocitos

Los esplenocitos fueron procesados de acuerdo al protocolo de BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit “Alternativa para la fijación y permeabilización” página 8. El cual se siguió de la siguiente manera:

Pasando las 22 horas de incubación se recuperaron las células por pipeteo, estas fueron lavadas dos veces con amortiguador PBS (NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄, NaCl 0.9 %) centrifugando a 400 x g por 5 minutos y eliminando el sobrenadante, de esta manera se obtuvo un pellet el cual contenía los esplenocitos. Se fijaron con 100 μ L de paraformaldehido 4% y se almacenaron a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados con amortiguador PBS a las mismas condiciones señaladas anteriormente y se

resuspendieron en 0.5mL de solución 90% Suero fetal bovino (SFB) /10% DMSO, para finalmente almacenarlas a -80°C.

VI.17. Marcaje de células con anticuerpos anti CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, IL-4 e IFN-γ

1.- Tinción de superficie (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺).

Se descongelaron las células y se recolectaron por pipeteo para colocarlas en tubos de citometría de flujo, posteriormente se realizaron dos lavados con 2 mL de amortiguador PBS. Se centrifugaron los tubos a 400 x g, durante 5 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante.

Se colocaron los anticuerpos marcados con fluorocromos. Las concentraciones para los anticuerpos anti-CD3 (BD biosciences No. Cat. 557869), CD4 (BD biosciences No. Cat. 552775) y CD8 (BD biosciences No. Cat. 551162) fueron sugeridas por el fabricante.

Cuadro 10: Concentraciones de marcadores usados para cada una de las muestras para adquirir en el citómetro de flujo ^{83,84}.

Marcador	Concentración añadida para cada una de las muestras.
CD3-Alexa 647	5 µg/ml
CD4-PE-Cy 7	5 µg/ml
CD8-PerCP-Cy 5.5	5 µg/ml
c.b.p. 100 µl de Amortiguador FACS	

Se incubaron las muestras por 20 minutos a 4°C en oscuridad, posteriormente se hizo un lavado con 1 mL de PBS a 400 x g, 4°C durante 5 minutos. Al final se agregó 100 µL de paraformaldehído al 4% y se dejó en incubación 20 minutos. ^{39,81}

2.-Tinción intracelular (IL-4 e IFN- γ)

Se añadió 100 μ L de saponina 0.1% por 30 minutos a 4°C con el fin de permeabilizar la membrana celular y facilitar el marcaje intracelular. Posteriormente se lavaron las células 2 veces con 1mL de PBS, se centrifugó a 400 x g, 4°C durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet. Luego se prepararon diluciones de anticuerpos anti-IL-4 (BD biosciences No. Cat. 554435) y anti-IFN- γ (BD biosciences No. Cat. 557724) para 150 condiciones de la siguiente manera:

Cuadro 11. Concentraciones de marcadores usados para cada una de las muestras para adquirir en el citómetro de flujo ⁸⁵.

Marcador	Concentración añadida para cada una de las muestras.
IL-4 PE	5 μ g/ml
IFN-γ Alexa 488	5 μ g/ml
c.b.p. 100 μl de Amortiguador FACS	

Nuevamente se dejó en incubación por 20 minutos a 4°C en oscuridad, se realizaron dos lavados con 3 mL de PBS y se centrifugo a las mismas condiciones. Posteriormente se añadió 100 μ L de paraformaldehído al 4%. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 200 μ L de buffer FACS para ser adquiridas y analizadas en el citómetro de flujo BD *FACSVerse* utilizando el software *FACSuiteTM* v1.0.5. ^{39,81}

VI.18. Cuantificación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de INF- γ e IL-4

Con el fin de identificar poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de INF- γ e IL-4 se utilizó el software *FlowJo* versión 8.7. Se analizaron 10,000 células por cada medición y se reportó el porcentaje de linfocitos de cada uno de los fenotipos analizados.

A continuación, se presenta la estrategia que se implementó para la selección de poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4. (Figura-7): Para cada una de las muestras se realizó una gráfica tipo “dot-plot” con el fin de separar todas las poblaciones (incluyendo linfocitos, macrófagos etc.) de acuerdo a su tamaño y granularidad (FSC-A vs SSC-A), posteriormente se seleccionó la población de linfocitos (aquella población que se encuentra entre FSC-A= 100-150^{x 1000} y SSC-A= 50-150^{x 1000} (Figura-7A). Una vez ya identificada la población de linfocitos, con el fin de identificar aquellos linfocitos que son positivos al marcador CD3 se realizó una gráfica tipo “histograma de fluorescencia”, seleccionando la población CD3⁺ (población de la derecha), para separarla de aquellas poblaciones que no tienen el marcador CD3, es decir que son CD3⁻ (población de la izquierda) (Figura 7-B). Posteriormente con ayuda de una gráfica tipo Dot-plot graficando SSC-H vs. SSC-A se eliminaron las células que fueron catalogadas por el FlowJo como “dobletes”, es decir células anómalas que se encontraban unidas al momento de ser adquiridas en el citómetro (Figura-7C). Posteriormente se realizaron por separado dos histogramas de fluorescencia con el fin de seleccionar aquellas poblaciones de linfocitos que son positivos para el marcador CD4 y aquellos linfocitos positivos para el marcador CD8 (Figura-7D y 7E). Una vez ya seleccionadas las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, se realizó una gráfica tipo dot-plot para cada uno de los casos con el fin de identificar el porcentaje de poblaciones de linfocitos productores de citocinas INF- γ e IL-4 (Figura-7F y 7G).

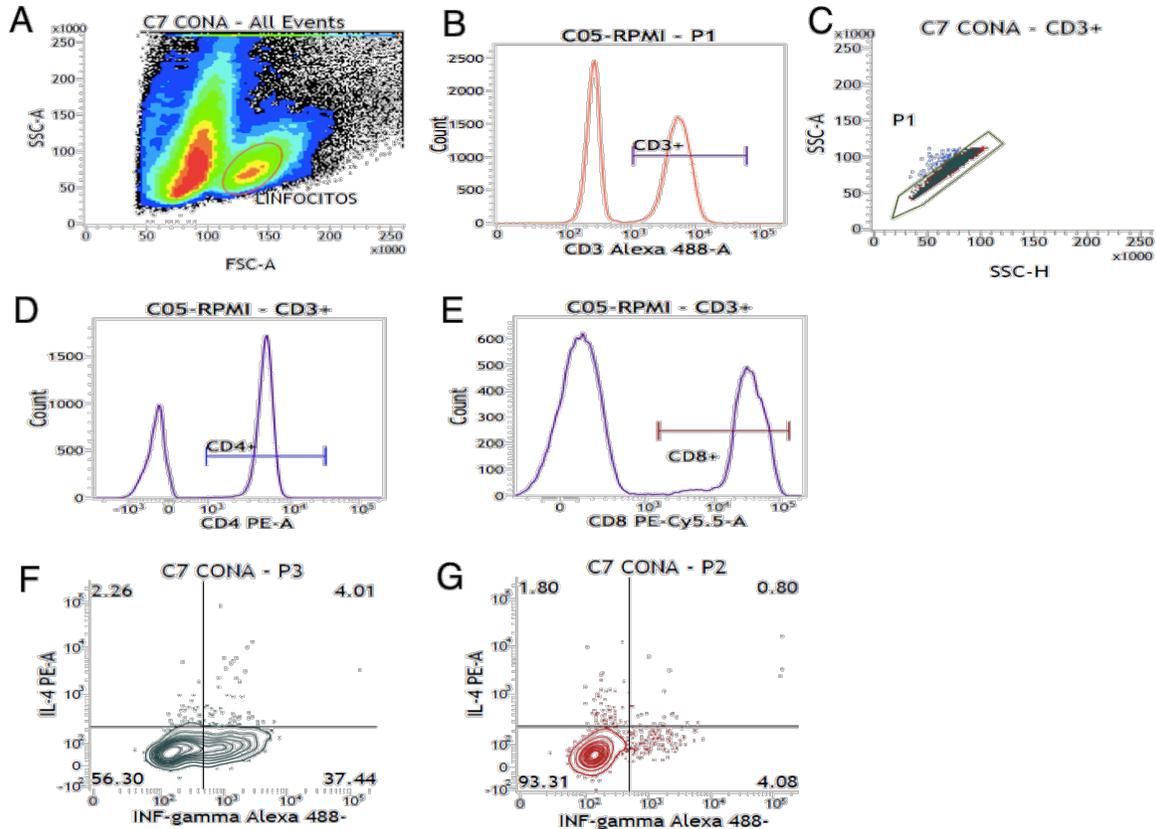


Figura 7 a) Gráfica Dot-plot que muestra la población de linfocitos seleccionada (población marcada) de acuerdo a su tamaño y granularidad, b) Histograma de fluorescencia para la población de linfocitos T CD3⁻ (izquierda) y T CD3⁺ (derecha). c) Selección de la población libre de dobletes (células con anomalías) con el fin de reducir error. d) Histograma de fluorescencia para la población de linfocitos T CD4⁻ y T CD4⁺. e) Histograma de fluorescencia para la población de linfocitos T CD8⁻ y T CD8⁺. f) Gráfica Dot-plot para el análisis de producción de citocinas INF- γ e IL-4 por parte de los linfocitos T CD4⁺. 7g) Gráfica Dot-plot para el análisis de producción de citocinas INF- γ e IL-4 por parte de los linfocitos T CD8⁺.

VI.19. Medición de inmunoglobulinas IgG e isotipos IgG1 e IgG2a

La determinación de niveles de anticuerpos en el suero de los ratones se realizó por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Para la detección de IgG e isotipos IgG1 e IgG2a se utilizaron anticuerpos anti-IgG totales (Sigma Aldrich, No. Catálogo A5153) e isotipos IgG1 e IgG2a (Sigma Aldrich, No. Catálogo SAB3701172, No. Catálogo SAB3701179) de ratón marcados con fosfatasa alcalina. La lectura se realizó a 415 nm en un lector de placas de ELISA

Microplatereader Modelo 680 (BioRad). El ensayo inmunoenzimático tiene 5 etapas (sensibilización, bloqueo, adición de la muestra, adición del conjugado marcado y revelado), las cuales se realizaron de la siguiente manera:⁸¹

1.- Sensibilización.

Se sensibilizó la placa de 96 pozos con 100 µl del antígeno TSA-1r (1.25 µg/mL) en amortiguador de carbonatos (Na₂CO₃ 0.01M, NaHCO₃ 0.02M, NaN₃ 3mM) pH 9.6. Se dejó en incubación toda la noche a 4°C.

2.- Bloqueo.

Se vació la placa en papel absorbente para eliminar el exceso de buffer y se lavó la placa con 200 µL de amortiguador de bloqueo (PBST + 1% BSA). Se dejó incubar por 1 hora a 37 °C. Al terminar se lavó la placa agregando 300 µl de amortiguador de lavado (PBST, el cual contiene PBS 1.5 M con Tween 20 0.1%). Este lavado se repitió 5 veces. Incubar a 37 °C durante 15 minutos.

3.-Adición de la muestra.

Se añadió 100 µl de suero diluido (1:200 para IgG Total y 1:50 para IgG1 e IgG2a) en amortiguador de dilución de muestras (PBST 0.5% + 0.3% de BSA) por triplicado. Posteriormente se incubó durante una hora a 37 °C. Se realizaron 5 lavados con 300 µL de amortiguador de lavado.

4.-Adición del conjugado.

Se añadió en cada pozo 100 µl del conjugado anti-IgG Totales (Sigma Aldrich, No. Catálogo A5153) o subtipos (IgG1o IgG2a) Sigma Aldrich, No. Catálogo SAB3701172, No. Catálogo SAB3701179) marcados con fosfatasa diluido 1:1000 en PBS, posteriormente se incubó por 30 minutos a 37 °C. Se hicieron 5 lavados con 300 µl de amortiguador de lavados. Al final se lavó una vez con PBS 10X.

5.-Revelado.

Se disolvió 4 tabletas de 20mg de p-nitrofenilfosfato (pNPP) (Sigma Aldrich, No. Catálogo S0942-200TAB) (1mg/ml) en 20 ml de Buffer de dietanolamina (pH=9.8) y se añadió a cada pozo 200 µl de esta solución. Posteriormente se incubó la placa en ausencia de luz por 30 minutos a temperatura ambiente. Para detener la

reacción se adiciono en cada pozo 50 μ l de 3N NaOH y se leyeron las muestras a 415 nm en un lector de placas ELISA Microplatereader Modelo 680 (BioRad).^{39,81}

VI.20. Análisis de lesión cardiaca

Al momento del sacrificio se extrajo de manera quirúrgica el corazón de los ratones. Estos fueron divididos en dos partes, una de ellas se conservó en congelación a -20°C y la otra se conservó en formaldehido al 10% para ser fijados en parafina, teñidos con hematoxilina-eosina y analizados al microscopio.

Para la determinación de células infiltradas en tejido cardiaco se utilizó el objetivo de 40x, y se tomarán 5 fotografías por cada corte histológico, posteriormente se calculó la cantidad de infiltrados celulares por mm^2 de tejido. La inflamación se cuantificó por análisis de imagen de cuatro a 10 micrografías digitales por animal utilizando Multispec 3.5 (versidad Purdue versidad, IN 47907). Los pixeles correspondientes a los núcleos de células inflamatorias se cuantificaron para estimar el número de células inflamatorias por área de fibra muscular.³⁹

VI.21. Cuantificación de carga parasitaria de tejido cardiaco por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR).

Se realizó la cuantificación de parásitos en tejido cardiaco en ratones infectados por medio de la técnica de qPCR. Para esto fue necesario realizar la extracción de ADN a partir de 25 mg de tejido de corazon mediante el estuche comercial Wizard de PROMEGA®. El ADN obtenido fue cuantificado y ajustado a una concentración de 50 ng/ μ l usando un nanodrop. Para la detección de la carga parasitaria se uso la técnica de qPCR, el ADN amplificado fue detectado en un termociclador ECO-Illumina.

La PCR en tiempo real fue realizada utilizando la técnica descrita por Cummings y Tarleton.⁸⁶ Los primers que se emplearon fueron TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3' y TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', los cuales son específicos para *T. cruzi* y amplifican un fragmento de 182 pb de la región mini satélite del parásito. Se mezclaron 10 µL de EXPRESS SYBR® GreenERTM (Invitrogen), 50 ng de ADN total de cada muestra, 0.5 µM de primer TCZ-F, 0.5 µM de primer TCZ-R y agua estéril grado-PCR (PROMEGA) en un volumen total de 20 µL. Las muestras se depositaron en el termociclador ECO-Illumina. El programa de amplificación se encuentra basado en cuatro fases, las cuales se describen en la Figura-8.

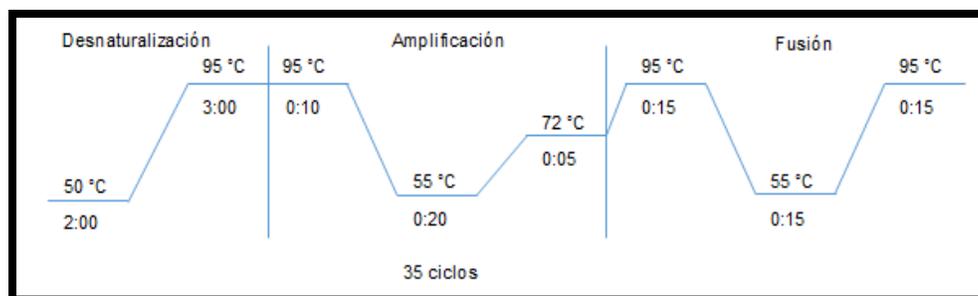


Figura 8. Condiciones de amplificación para la PCR cuantitativa en tiempo real.

Al final de los 5 segundos a 72°C de la fase de amplificación, la intensidad de fluorescencia fue medida. Cada muestra se evaluó por triplicado y en cada ciclo de amplificación fueron incluidos tres controles negativos. Los resultados se basaron en una curva estándar construida por 5 diluciones seriadas de ADN de *T. cruzi*, a partir de 10,000 a 1 parásitos. Y posteriormente se analizaron en el programa EcoSoftware.^{86,87}

VI.22. Análisis estadístico

Todas las gráficas y los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad PRISMA® 6.0.c. Datos paramétricos se compararon usando ANOVA y la prueba *a posteriori* de Tukey, se presentan con su media y error estándar. Datos no paramétricos se compararon usando *Kruskal Wallis* y la prueba

a posteriori de *Dunn*, se presentan con su mediana. Para comparaciones entre 2 grupos se usó la prueba de *t-student* (datos paramétricos) o por *Mann-Whitney* (datos no paramétricos).

VI.23. Consideraciones éticas

El manejo de los animales se realizará de acuerdo a la normatividad establecida en el manual de procedimientos del Comité de Bioética de la Institución basado en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) “Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado Y Uso De Los Animales De Laboratorio”.

VII. RESULTADOS.

VII.1 Evaluación de la integridad de la proteína recombinante.

Antes de iniciar con los ensayos fue necesario comprobar que la proteína TSA-1r se encontraba en condiciones óptimas. Para lo cual la proteína recombinante se dializó de acuerdo a la metodología mencionada anteriormente y para corroborar que la proteína recombinante no se encontraba degradada se realizó una prueba de electroforesis SDS-PAGE, de igual manera se pudo comprobar el peso molecular (65.7 kDa, el cual corresponde al peso molecular documentado, Figura-9). Por medio de la técnica de Bradford se concluyó que la concentración de la proteína fue de 1.5mg/mL.

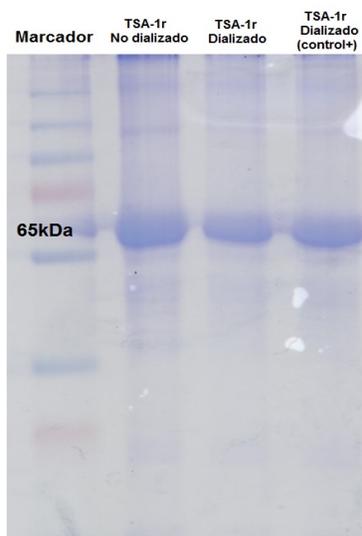


Figura 9. Peso molecular de la proteína TSA-1r antes y después de la diálisis. SDS-PAGE poliacrilamida 10%. Tinción con azul de Coomassie.

VII.2 Evaluación de la eficiencia conferida por la inmunización.

Para evaluar el efecto de los adyuvantes sobre la eficiencia inducida por la vacuna se evaluaron cuatro parámetros: la parasitemia, la sobrevivencia, la carga parasitaria cardíaca y la inflamación del tejido cardíaco. El estudio fue

realizado a ciego. Para esto, a cada grupo experimental se le fue asignada una letra de la A a la F, y se conservó a resguardo el registro de identidad de los grupos experimentales.

A partir del día 12 *p.i* y hasta el día 50, cada tercer día se realizó el conteo de parasitemia según la metodología descrita anteriormente. Al finalizar el periodo experimental, se observó que 4 ratones no presentaron parásitos de *T. cruzi*, por lo que no fueron considerados en la evaluación de los resultados experimentales. Es importante mencionar que 3 de estos ratones pertenecen a un mismo grupo experimental (Control TSA-1r).

Al analizar los resultados de la parasitemia, se observó que el grupo inmunizado con la proteína recombinante (TSA-1r) presentó la mayor cantidad de parásitos, incluso más que el grupo tratado con solución salina. En los grupos experimentales que incluyen al adyuvante GLA-SE (con y sin antígeno) se observa una reducción de la parasitemia (Figura-10a). Al analizar los valores de área bajo la curva mediante ANOVA no se encontró diferencia significativa entre los grupos experimentales. Sin embargo, se realizaron comparaciones entre grupos experimentales mediante pruebas *t-student* y se encontró diferencia significativa entre “TSA-1r vs GLA-SE” (Figura-10b, *t-student* $P=0.0136$) y “TSA-1r vs TSA-1r+GLA-SE” (Figura-10b, *t-student* $P=0.0155$).

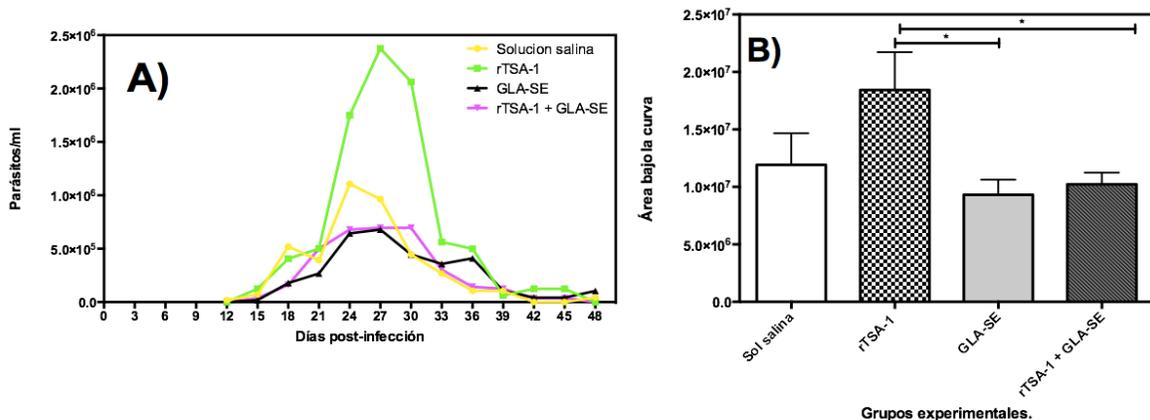


Figura 10. Efecto de la vacunación terapéutica en ratones inmunizados con TSA-1r, GLA-SE o ambos sobre: (A) cinética de la parasitemia. (B) Área bajo la curva de la parasitemia, datos presentados como medias \pm SEM *Diferencia significativa (*t-student*, $P < 0.05$).

Respecto a la evaluación de la sobrevivencia, el grupo tratado con la proteína recombinante presento solo el 25% de sobrevivencia. Por otra parte, el grupo inmunizado con solución salina no demostró niveles de mortalidad tan altos como se esperaba, similarmente presento el mismo porcentaje de sobrevivencia (85%) que el grupo formulado con el adyuvante GLA-SE. El grupo inmunizado con “TSA-1r+GLA-SE” tuvo un porcentaje de sobrevivencia del 100%. Estos grupos experimentales demostraron tener diferencia significativa mediante una prueba de *Mantel-Cox* (Figura-11).

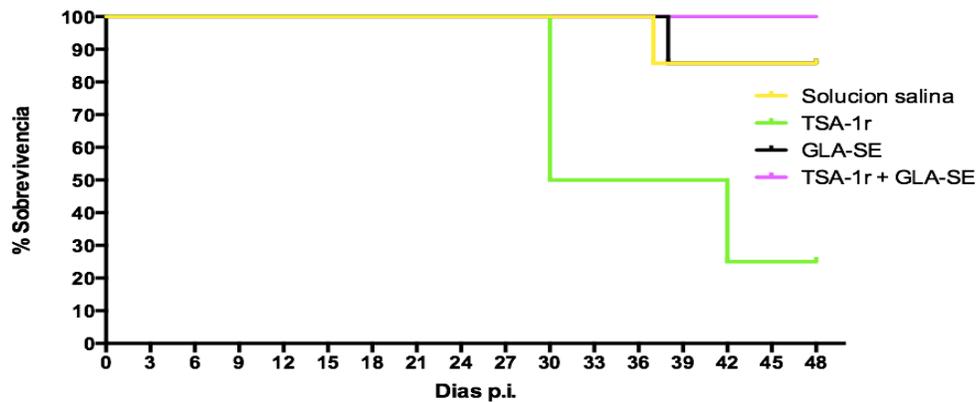


Figura 11. Efecto de la vacunación terapéutica en ratones inmunizados con TSA-1r, GLA-SE o ambos sobre la sobrevivencia. Incremento en la sobrevivencia ($n=4-7$) (*Mantel-Cox* log rank test, $P=0.0076$).

Un efecto similar al de la parasitemia con los grupos inmunizados con GLA-SE se pudo observar en los grupos formulados con E6020-SE (con y sin antígeno), en los cuales se observa que este adyuvante tiende a reducir la parasitemia en los ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* (Figura-12a). Al analizar los valores de área bajo la curva mediante *ANOVA* se encontró diferencia significativa entre los grupos “TSA-1r vs TSA-1r+E6020-SE” y “TSA-1r vs E6020-SE” (Figura-12b, *ANOVA* $P=0.0265$, *Tukey* $P < 0.05$).

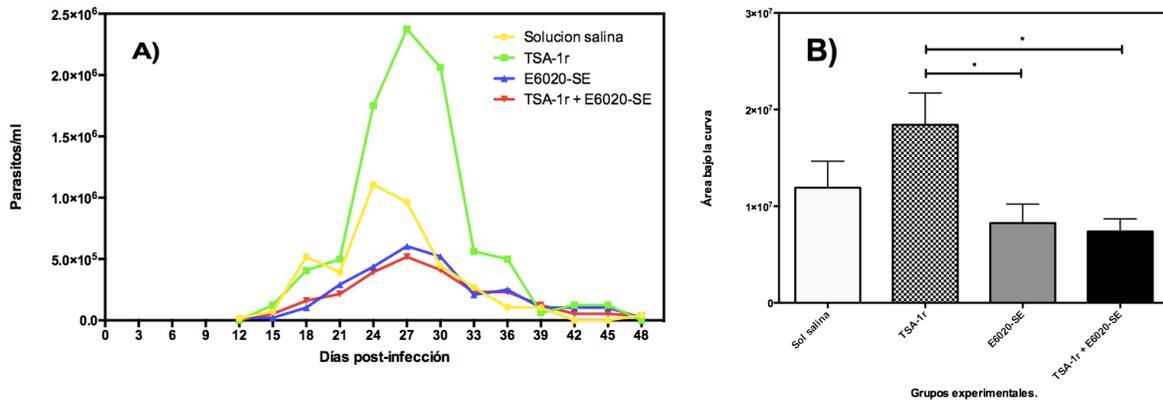


Figura 12. Efecto de la vacunación terapéutica en ratones inmunizados con TSA-1r, E6020-SE o ambos sobre: (A) Cinética de la parasitemia. (B) Área bajo la curva de la parasitemia, datos presentados como medias \pm SEM *Diferencia significativa (ANOVA $P=0.0265$, Tukey $P<0.05$).

Por otro lado, en la evaluación de la sobrevivencia, los ratones pertenecientes a los grupos tratados con “E6020-SE” y “TSA-1r+E6020-SE” demostraron un porcentaje de sobrevivencia del 100%. Mediante un análisis de *Mantel-Cox* se encontró diferencia significativa en estos grupos experimentales (Figura-13).

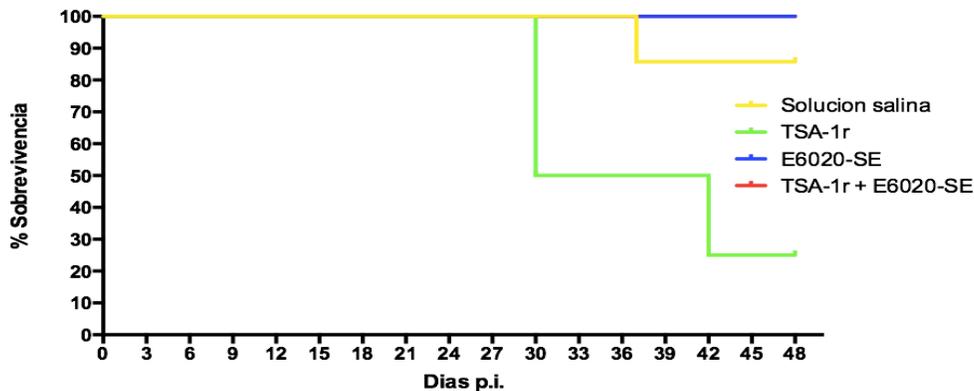


Figura 13. Efecto de la vacunación terapéutica en ratones inmunizados con TSA-1r, E6020-SE o ambos sobre la sobrevivencia. Incremento en la sobrevivencia (n=4-7) (*Mantel-Cox* log rank test, $P=0.0021$)

Se compararon los niveles de densidad de células inflamatorias de cada uno de los adyuvantes con sus respectivos controles. En la Figura-14a se observan los niveles de densidad de células inflamatorias en los grupos tratados con GLA-SE y sus respectivos controles. Al analizar estadísticamente estos

grupos experimentales no se encontró diferencia significativa mediante ANOVA, sin embargo, es evidente la tendencia en cuanto a disminución de células inflamatorias en los grupos tratados con el adyuvante en comparación al control solución salina. El grupo tratado con la proteína recombinante tiende a presentar mayores niveles de densidad de células inflamatorias en comparación al grupo inmunizado con solución salina. En cuanto a la evaluación de carga parasitaria en tejido cardiaco tampoco se encontró diferencia significativa al realizar comparaciones entre grupos mediante *Kruskal-Wallis*, el grupo tratado con solución salina posee menor carga parasitaria en comparación al grupo control TSA-1r. Los grupos formulados con adyuvante GLA-SE (con y sin antígeno) poseen niveles muy bajos de carga parasitaria en tejido cardiaco. Al realizar comparaciones mediante pruebas de *Mann-Whitney* se encontraron diferencias significativas en tratamientos “TSA-1r vs GLA-SE” (Figura-14b, *Mann-Whitney* $P=0.0238$).y TSA-1r vs TSA-1+GLA-SE” (Figura-14b, *Mann-Whitney* $P=0.0167$).

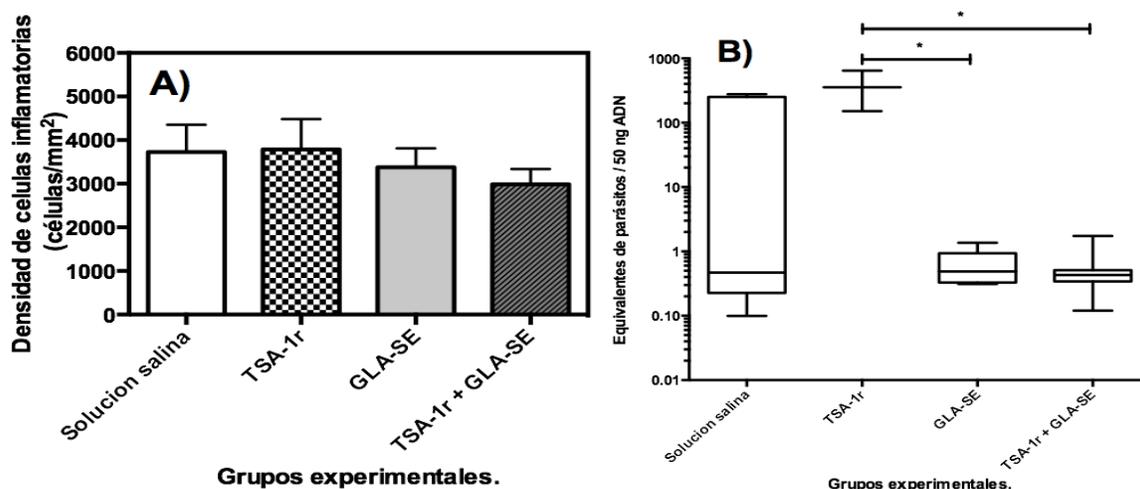


Figura 14. Efecto de la vacunación terapéutica en ratones inmunizados con TSA-1r, GLA-SE o ambos sobre: (A) Inflamación en tejido cardiaco, datos presentados como media \pm error estándar. (B) Carga parasitaria cardiaca por cada 50ng de ADN, datos presentados como medianas. *Diferencia significativa (*Mann-Whitney*, $P<0.05$).

Por otra parte, al comparar los niveles de densidad de células inflamatorias en tejido cardiaco en grupos tratados con el adyuvante E6020-SE (con y sin antígeno), no se encontró diferencia significativa mediante ANOVA

(Figura-15a), sin embargo se evidencia el hecho de que los grupos formulados con E6020-SE tienden a disminuir la densidad de células inflamatorias en tejido cardiaco en comparación a solución salina o TSA-1r, siendo el grupo “TSA-1r+E5020-SE” el que posee los menores niveles de densidad de células inflamatorias. En cuanto al análisis de carga parasitaria cardiaca tampoco se encontró diferencia significativa mediante el análisis de *Kruskal-Wallis*. Los grupos tratados con E6020-SE (con y sin antígeno) tienden a presentar bajos niveles carga parasitaria en tejido cardiaco. Al realizar comparaciones entre 2 grupos mediante pruebas de *Mann-Whitney* se encontró diferencia significativa entre “TSA-1r vs E6020-SE” (Figura-15b, *Mann-Whitney* $P=0.0238$) y “TSA-1r vs TSA-1r+E6020-SE” (Figura-15b, *Mann-Whitney* $P=0.0167$).

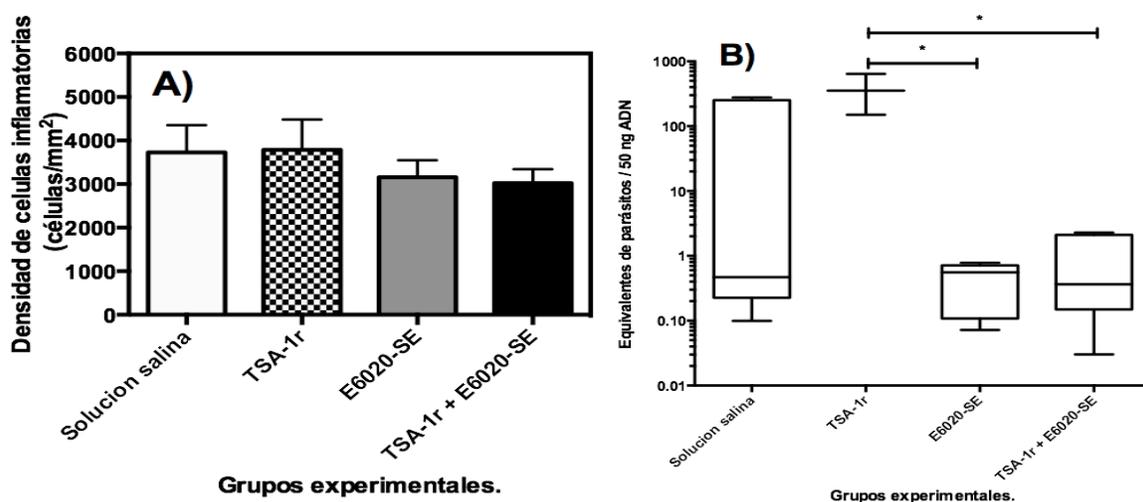


Figura 15. Efecto de la vacunación terapéutica en ratones inmunizados con TSA-1r, E6020-SE o ambos sobre: (A) Inflamación en tejido cardiaco, datos presentados como media \pm error estándar. (B) Carga parasitaria cardiaca por cada 50ng de ADN, datos presentados como medianas. *Diferencia significativa (*Mann-Whitney*, $P<0.05$).

VII.3 Efecto de la vacuna más los adyuvantes sobre la producción de anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2a.

Para evaluar la influencia de los adyuvantes sobre la vacuna experimental en la respuesta inmune humoral se determinaron los niveles de

anticuerpos IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a antígeno específico mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA indirecta) en los sueros de los ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

En la Figura-16a se presentan los niveles de anticuerpos IgG totales antígeno específico de los grupos experimentales adicionados con GLA-SE (con y sin antígeno). De acuerdo a la imagen se puede observar que el grupo control inmunizado con la proteína recombinante no presenta barra de error estándar, esto es debido al tamaño de la muestra ($n=1$), sin embargo este grupo fue graficado para fines de visualización. Al analizar los resultados mediante *Kruskal-Wallis* se observa diferencia significativa entre el grupo de “solución salina vs TSA-1r+GLA-SE”, de igual manera se observa diferencia significativa entre los grupos “GLA-SE vs TSA-1r+GLA-SE” (*Kruskal-Wallis* $P=0.0008$, *Dunn*: $P<0.05$). Al analizar la razón de isotipos IgG2a/IgG1 en los grupos experimentales formulados con GLA-SE y sus respectivos controles, se puede observar que no existe diferencia significativa en ninguno de estos grupos (Figura-16b), aunque la administración del adyuvante GLA-SE tiende a aumentar la razón de isotipos IgG2a/IgG1.

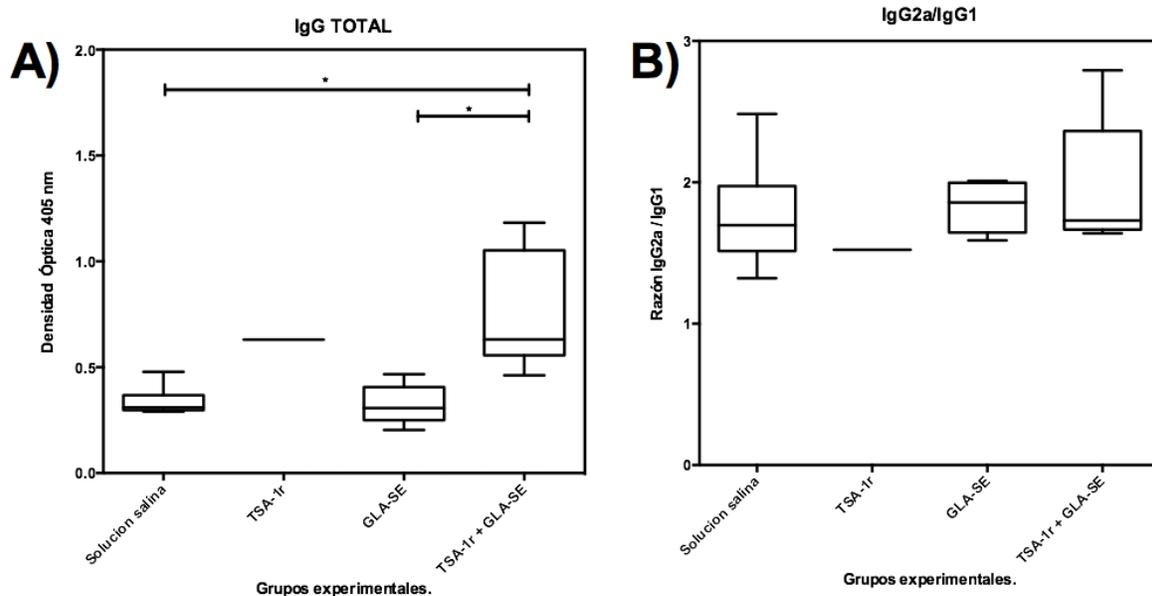


Figura 16. Efecto de la vacunación terapéutica sobre la respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con TSA-1r, GLA-SE o ambos en: (A) Niveles de anticuerpos IgG Totales antígeno

específico, datos presentados como medianas. *Diferencia significativa (*Kruskal Wallis*, $P=0.0008$, prueba posteriori de *Dunn*, $P<0.05$). (B) Razón entre niveles IgG2a/IgG1, datos presentados como medianas.

Al analizar los niveles de anticuerpos IgG totales antígeno específico en los grupos formulados con E6020-SE (con y sin antígeno) mediante *Kruskal-Wallis* se observa diferencia significativa entre el grupo control “solución salina vs TSA-1r+E6020-SE” (Figura-17a *Kruskal-Wallis* $P<0.0001$, *Dunn*: $P<0.05$). El grupo tratado con “TSA-1r+E6020-SE” demostró ser capaz de generar una mayor cantidad de anticuerpos IgG totales antígeno específico en comparación a los otros grupos experimentales. Al analizar mediante *ANOVA* la razón de isotipos IgG2a/IgG1 se observó diferencia significativa entre el grupo inmunizado con “TSA-1r+E6020-SE” respecto al control de solución salina. (Figura-17b, *ANOVA* $P=0.0069$, *Tukey*: $P<0.05$). Ratones inmunizados con la proteína recombinante o con el adyuvante E6020-SE no presentan diferencias al ser comparados con el control de solución salina.

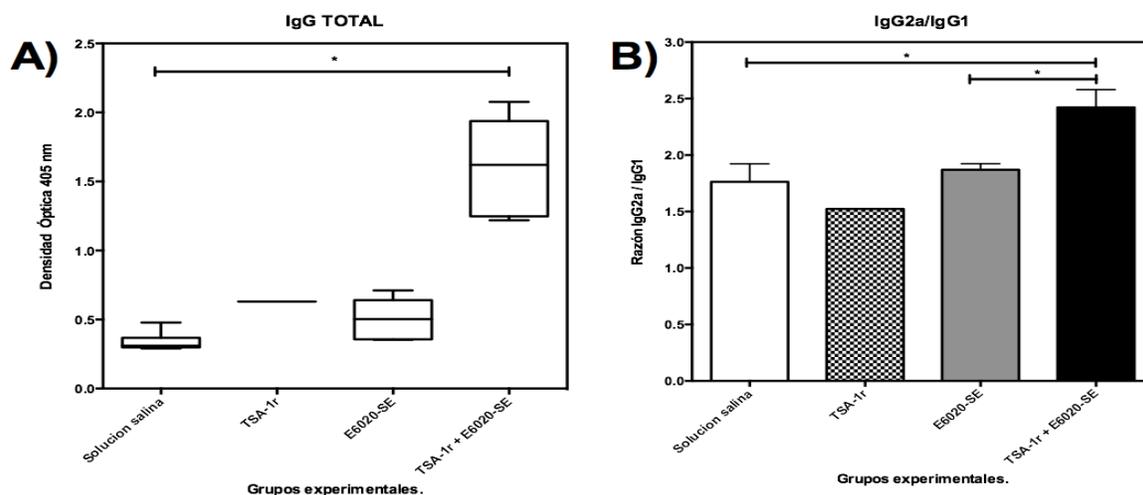


Figura 17. Efecto de la vacunación terapéutica sobre la respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con TSA-1r, E6020-SE o ambos en: (A) Niveles de anticuerpos IgG Totales antígeno específico, datos presentados como medianas (*Kruskal Wallis*, $P<0.0001$, prueba posteriori de *Dunn*, $P<0.05$). (B) Razón entre niveles IgG2a/IgG1, datos presentados como media \pm error estándar *Diferencia significativa (*ANOVA*, $P<0.0069$, prueba a posteriori *Tukey* $P<0.05$).

VII.4 Efecto de los candidatos a vacuna sobre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IL-4 e IFN- γ .

Para evaluar la influencia de los adyuvantes sobre la vacuna experimental en la respuesta inmune celular se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4 a partir de esplenocitos de los ratones de los diversos grupos experimentales. Se siguió la metodología descrita anteriormente para la re-estimulación con la proteína recombinante a diferentes condiciones (estimulo con RPMI, con la proteína recombinante, con el mitógeno Concanavalina-A y combinación de la proteína recombinante mas el adyuvante, Figura-18).

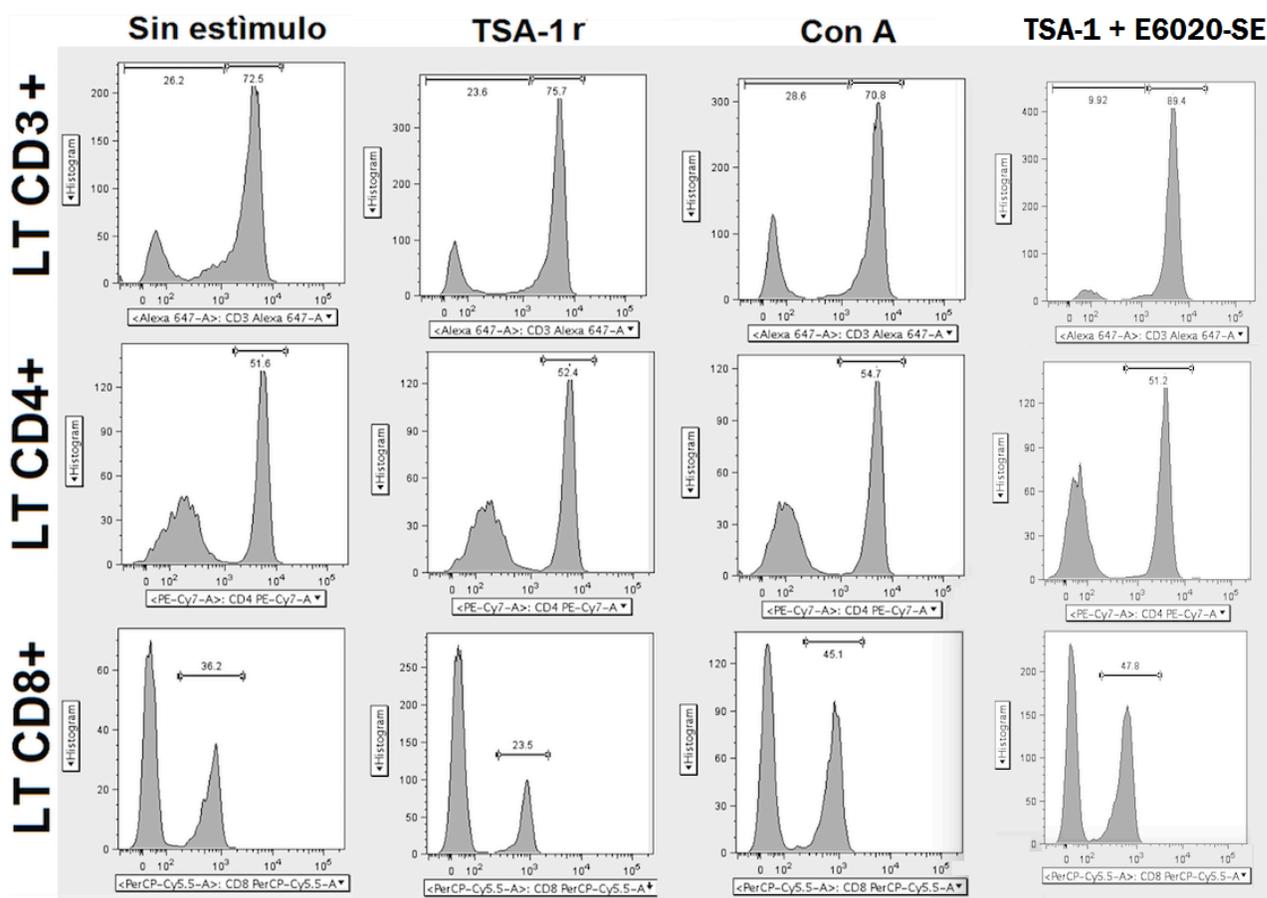


Figura 18 a). Representación gráfica tipo histograma para cada una de las 3 condiciones de estímulo. Cada columna corresponde a una condición de estímulo (control negativo, proteína recombinante TSA-1r, Concanavalina A y formulación proteína recombinante mas adyuvante). En

la fila superior se hizo la selección positiva de poblaciones de linfocitos T CD3⁺. En la fila central e inferior se seleccionaron a las poblaciones positivas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

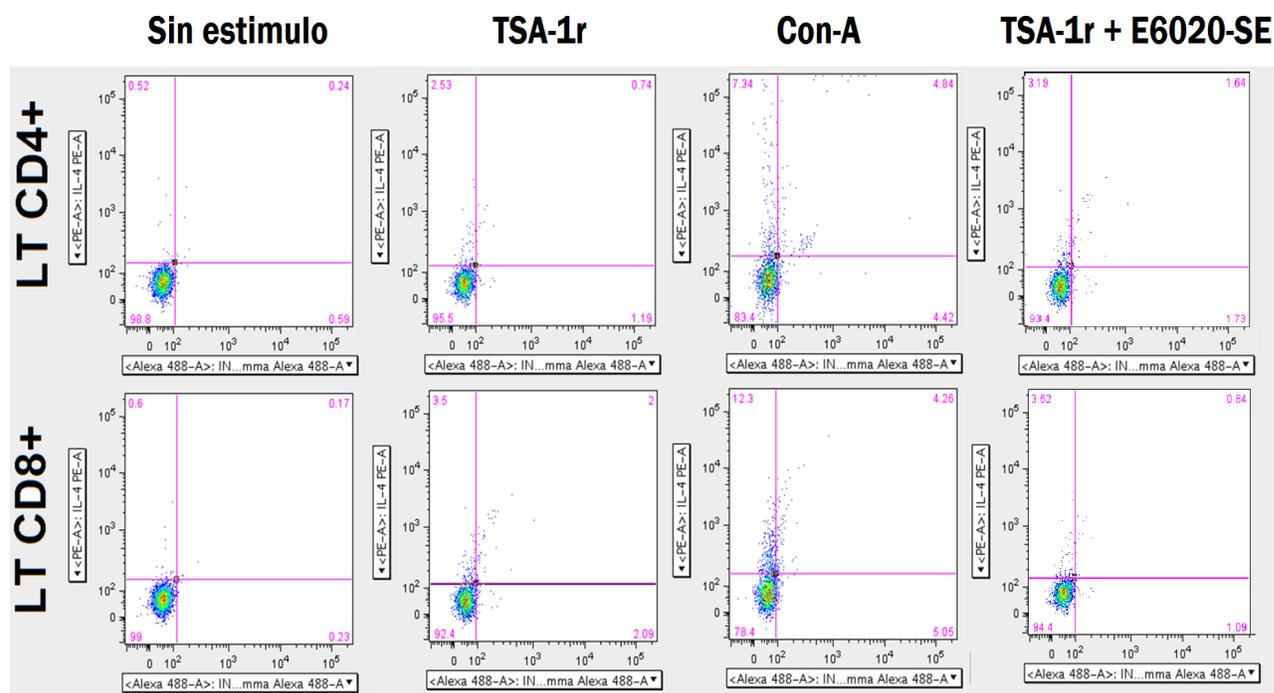


Figura 18 b). Representación de graficas tipo dot-plot para cada una de las 3 condiciones de estímulo. Cada columna corresponde a una condición de estímulo (control negativo, proteína recombinante TSA-1r, Concanavalina A y formulacion proteina recombinante mas adyuvante). En la fila superior se representa la población de linfocitos T CD4⁺, en la cual se compara el porcentaje de IFN- γ vs IL-4. De la misma manera, la fila inferior representa la población de linfocitos T CD8⁺, en la cual se compara el porcentaje de IFN-γ vs IL-4.

En la Figura-19 se observa el efecto de la respuesta inmune celular en grupos tratados con el adyuvante GLA-SE y sus respectivos controles. Al evaluar los grupos experimentales mediante *Kruskal-Wallis* no se encontró diferencia significativa, sin embargo se notan tendencias. El grupo tratado con la proteína recombinante indujo bajos porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN-γ y linfocitos T CD8⁺ productores de IFN-γ e IL-4. El grupo inmunizado con “TSA-1r+GLASE” indujo altos porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IL-4 e IFN-γ. El grupo tratado con GLA-SE indujo porcentajes similares de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN-γ y linfocitos T CD8⁺ productores de IL-4 en

comparación a "TSA-1r+GLASE", asimismo fue el grupo con menor producción de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-4.

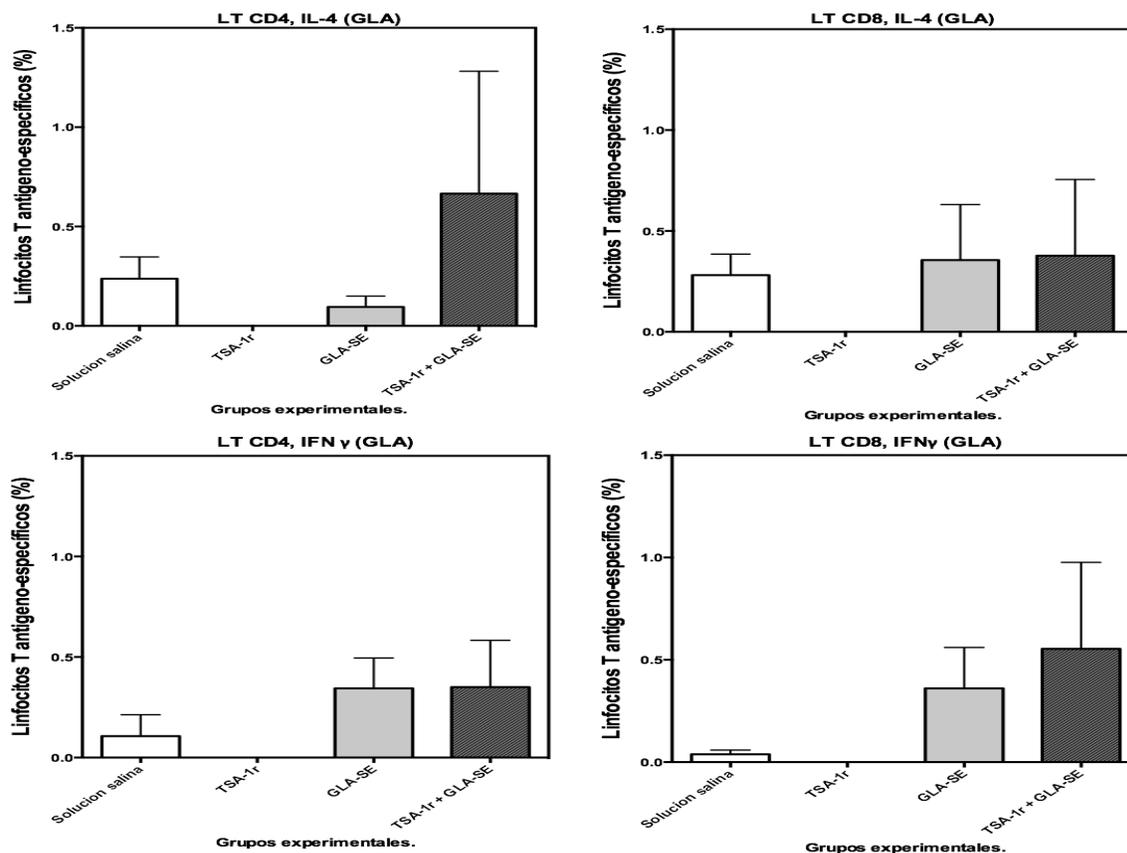


Figura 19. Efecto de la vacunación terapéutica sobre la respuesta inmune celular. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ antígeno específico productores de citocinas IFN- γ e IL-4 en ratones inmunizados con TSA-1r, GLA-SE o ambos. Datos presentados como medianas.

Por otra parte, al evaluar el efecto del adyuvante E6020-SE y sus respectivos controles en la respuesta inmune celular tampoco se observaron diferencias significativas al ser comparados mediante *Kruskal-Wallis*, sin embargo se observan tendencias (Figura-20). Se puede observar que el grupo solución salina y TSA-1r indujeron los menores porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4. El grupo formulado con "TSA-1+E6020-SE" presenta altos porcentajes de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-4 y linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ e IL-4. Grupo tratado con E6020-SE presenta los más altos porcentajes de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ y linfocitos T CD8⁺ productores de IL-4.

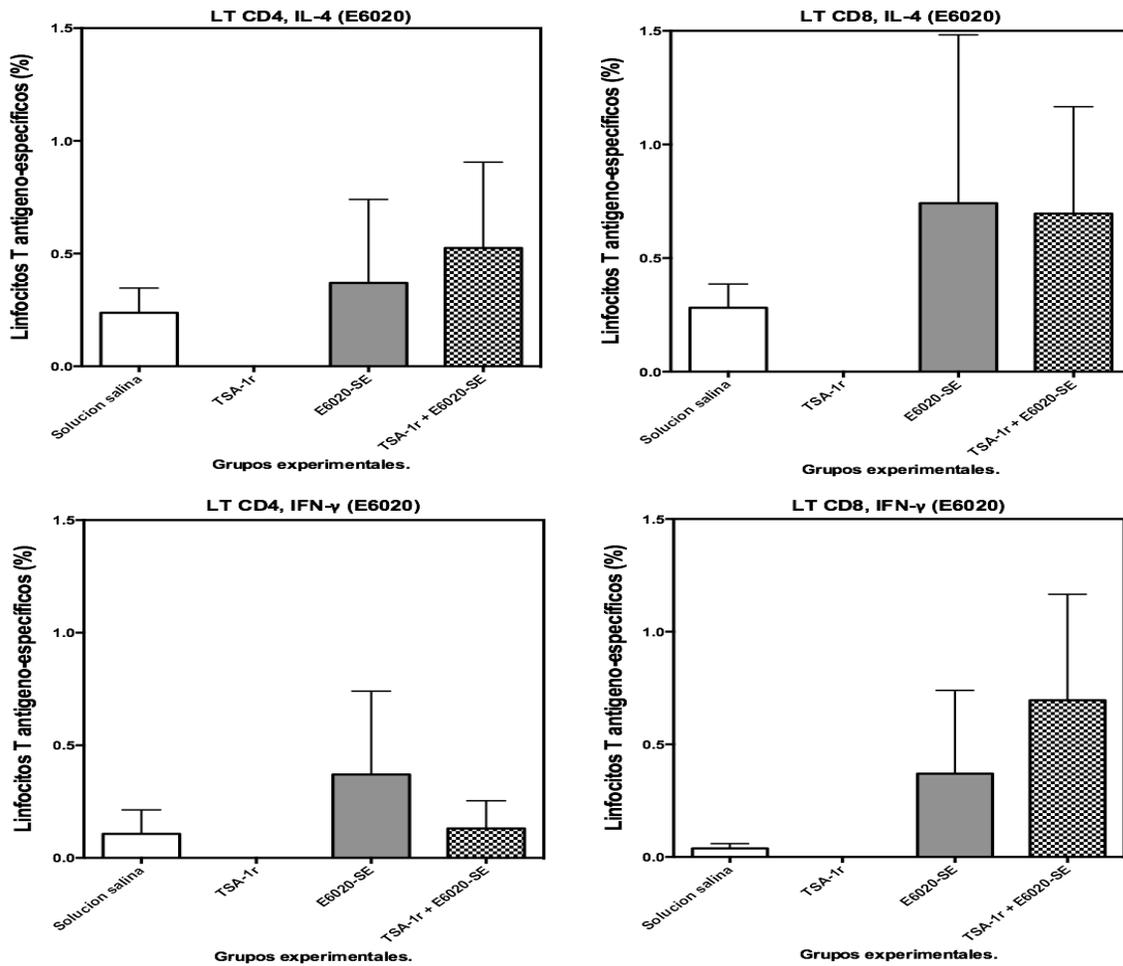


Figura 20. Efecto de la vacunación terapéutica sobre la respuesta inmune celular. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ T CD8⁺ antígeno específico productores de citocinas IFN-γ e IL-4 en ratones inmunizados con TSA-1r, E6020-SE o ambos. Datos presentados como medianas.

VIII. DISCUSION

Estudios previos han demostrado que la inmunoterapia con vacunas de ADN a partir del antígeno TSA-1 reduce el daño en tejido cardiaco, aumenta la tasa de sobrevivencia y el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en ratones BALB/c cuando estos fueron desafiados con *Trypanosoma cruzi* durante periodos agudos o crónicos.^{36-40,45} A pesar de estos avances tan prometedores, las vacunas de ADN aún no están autorizadas para su uso en seres humanos. Actualmente se opta por el desarrollo de vacunas a partir de proteína recombinante, las cuales inducen principalmente respuestas de tipo TH2, sin embargo, este tipo de respuesta no es la apropiada para el control de infecciones intracelulares.⁷ El uso de adyuvantes agonistas de TLR-4 es una estrategia para potenciar la respuesta inmune hacia una vía eficaz TH1.⁸ GLA, un lípido sintético a partir de *Salmonella Minessota* y E6020 un fosfolípido sintético, ambos agonistas de TLR-4 inducen alta producción de citocinas proinflamatorias y disminución de citocinas antiinflamatorias, orientando la respuesta inmune hacia una vía TH1.^{9,10,88,89} El presente estudio evaluó la eficiencia terapéutica de los adyuvantes GLA-SE y E6020-SE (candidatos a vacuna) en conjunto con el antígeno TSA-1r, en ratones BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Al evaluar la eficacia de los candidatos a vacuna se observó que la inmunización únicamente con la proteína recombinante indujo efectos negativos en los ratones infectados, tales como una tendencia a aumentar los niveles de parasitemia, carga parasitaria cardiaca y densidad de células inflamatorias, a su vez que redujo drásticamente el porcentaje de sobrevivencia, incluso en comparación al grupo tratado con solución salina.

Esto puede atribuirse a que los antígenos a partir de proteínas recombinantes favorecen respuestas de tipo TH2. Al momento de ser fagocitados por las células presentadoras de antígeno, son capturados y procesados por el sistema endosomal. El antígeno es degradado a péptido y este se asocia a

moléculas del MHC clase II. Este complejo péptido/MHC II, es capaz de estimular linfocitos T CD4⁺ promoviendo su proliferación pero no promueven la activación de linfocitos T CD8⁺ favoreciendo así la orientación de la respuesta inmune inducida por la infección hacia una vía TH2. Al analizar al único ratón sobreviviente del grupo experimental inmunizado con el antígeno recombinante se observaron altos porcentajes de linfocitos T CD4⁺ antígeno específicos productores de IL-4 (TH2) en comparación a los otros grupos experimentales, lo que sugiere que la respuesta TH2 producida previamente por la infección fue exacerbada al adicionar el antígeno recombinante. Los resultados del presente trabajo coinciden con lo reportado por Martínez-Campos y colaboradores en cuanto al efecto provocado por la proteína recombinante en la parasitemia y sobrevivencia.⁴³ En este estudio ratones BALB/c fueron inmunizados con 20 µg de Tc24r y posteriormente infectados con *Trypanosoma cruzi*, los resultados demuestran que la administración de la proteína recombinante no confiere protección debido a que se reportaron altos niveles de parasitemia y bajo porcentaje de sobrevivencia en el modelo murino.

Este efecto de favorecimiento de la respuesta TH2 por parte de la proteína recombinante es inhibido al adicionar los adyuvantes GLA-SE o E6020-SE. Estos adyuvantes, promueven la activación de moléculas co-estimuladoras en las APC y favorecen la orientación de la respuesta inmune hacia una vía TH1 por medio de la producción de citocinas proinflamatorias.^{58,90} Esto se puede observar en los grupos tratados con adyuvantes en donde se presenta un patrón de disminución en la parasitemia, carga parasitaria y densidad de células inflamatorias en tejido cardíaco y aumento en el porcentaje de sobrevivencia. Estos efectos tienden a mejorarse al usar los adyuvantes en combinación con la proteína recombinante. Estos resultados sugieren que la adición simultánea de la proteína recombinante y el adyuvante favorecen la activación selectiva de las clonas de reconocimiento de este antígeno, pudiendo así orientar hacia una respuesta inmune específica.

Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Salgado-Jiménez y colaboradores⁹¹, quienes utilizando la proteína recombinante TcSP y el adyuvante incompleto de Freund lograron reducir los niveles de parasitemia en ratones BALB/c, sin embargo obtuvieron altos porcentajes de mortalidad. Cabe mencionar que el adyuvante de Freund promueve una respuesta inmune mixta. A diferencia de los utilizados en este estudio que promueven preferentemente respuestas de tipo TH1. Esto sugiere que el tipo de adyuvante es fundamental para incrementar la eficiencia terapéutica de las vacunas basadas en antígenos recombinantes.⁴¹

Al evaluar la respuesta inmune humoral se observó que la adición de los adyuvantes GLA-SE o E6020-SE de manera individual no promueven la producción de anticuerpos IgG totales antígeno específico en los animales infectados. Este efecto se debe a que los grupos experimentales al no ser inmunizados con un antígeno específico no existe una respuesta clonal específica, lo que conlleva a una disminución en la respuesta inmune humoral.

Por otra parte, se pudo observar que la administración de la proteína recombinante, en conjunto con los adyuvantes, incrementa la producción de anticuerpos IgG totales antígeno específico en ratones infectados. Estudios han demostrado que al administrar adyuvantes agonistas de TLR-4 en conjunto con antígenos promueven la activación de una respuesta inmune específica contra infecciones parasitarias; la cual al inicio es principalmente de tipo humoral.^{70,90,92} Sin embargo, la activación en una respuesta inmune humoral, no es suficiente para controlar el desarrollo de la infección, esto debido a que los anticuerpos no pueden combatir eficientemente a los parásitos intracelulares.

Al analizar los niveles de isotipos, se observa que, tanto el adyuvante GLA-SE como E6020-SE tienden a aumentar la proporción de los anticuerpos IgG2a cuando son administrados solos o en combinación con TSA-1r, sin embargo, este incremento no alcanza a ser significativo al comparar “TSA-1r+GLA-SE” vs

solución salina. Estudios previos reportados por Salgado-Jiménez y colaboradores demostraron que el uso de algunos tipos de proteínas recombinantes potencia la respuesta inmune humoral por medio de altos niveles de anticuerpos antígeno específico.⁹¹ Sin embargo, este tipo de respuesta observada fue mixta (TH1-TH2), ya que también se indujeron altos niveles de isotipos IgG1 e IgG2a; estos resultados coinciden con lo reportado en el presente trabajo en cuanto a la similitud al expresar niveles de anticuerpos IgG totales antígeno específico y a la inducción de la respuesta inmune mixta TH1-TH2 mediada por isotipos IgG1 e IgG2a al evaluar el adyuvante GLA-SE. Por otra parte, el grupo formulado con “TSA-1r+E6020-SE” tiene un efecto significativamente mayor en la inducción de anticuerpos IgG2a al compararse con solución salina. Estos resultados demuestran que la adición del adyuvante E6020-SE a la proteína recombinante promueve un incremento en la respuesta inmune orientándola hacia una vía TH1. Los resultados del presente trabajo coinciden con lo reportado por Martínez-Campos y colaboradores⁴³ en donde la formulación de Tc24r y el adyuvante MLA elevan títulos de anticuerpos IgG2a antígeno específico en comparación a los grupos controles, orientando la respuesta hacia una vía TH1.

Al evaluar la respuesta inmune celular se pudo observar que la administración solamente de la proteína recombinante no parece inducir la proliferación de poblaciones celulares linfocitos T CD4⁺ o T CD8⁺ antígeno específico. Estos resultados, conjuntamente con los bajos niveles de anticuerpos antígeno específico obtenidos en el grupo de TSA-1r justifican el porqué del bajo porcentaje de sobrevivencia en este grupo experimental. Por otra parte, la combinación del antígeno recombinante con los adyuvantes no favoreció un incremento significativo de poblaciones de linfocitos T CD4⁺ o T CD8⁺ productoras de IL-4 e IFN- γ . Sin embargo, se observaron tendencias en el grupo tratado con “TSA-1r+GLA-SE”, el cual induce altos niveles de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-4, así como de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ ; por otra parte, el grupo tratado con “TSA-1+E6020-SE” tiende a inducir altos niveles de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-4 y T CD8⁺ productores de IL-4 e IFN- γ .

La producción de IL-4 por parte de los linfocitos T favorece la activación de células B induciendo su diferenciación a células plasmáticas, las cuales producen anticuerpos específicos de antígeno. Sin embargo esta citocina se relaciona con la respuesta evasiva por parte del parásito protozoario, por lo que en mayores concentraciones puede obstaculizar la respuesta inmune.²⁹ Este incremento de IL-4 reduce el desarrollo de una respuesta celular y eficiencia de los candidatos a vacuna, tal como se observa con los grupos experimentales “TSA-1r+GLA-SE” y “TSA-1r+E6020-SE”. Por otra parte, se sabe que la producción de IFN- γ promueve la activación de mecanismos de citotoxicidad por parte de los linfocitos T CD8⁺.^{30,31} Estudios previos han demostrado que el aumento de IFN- γ puede colaborar para la adecuada producción de anticuerpos IgG2a y en la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos.^{18,31} Los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos procesados vía proteosoma asociados a moléculas del MHC de clase I. Esta activación de los linfocitos T CD8⁺ induce su diferenciación hacia células T citotóxicas (CTL), las cuales por medio de liberación de perforinas y granzimas eliminan células infectadas.^{20,33} Grupos tratados con “TSA-1r+GLA-SE” y “TSA-1r+E6020-SE” indujeron los niveles más altos de porcentaje de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ , este hecho pudo favorecer el incremento de anticuerpos IgG totales antígeno específico por parte de estos grupos experimentales, favoreciendo así sobrevivencia de los ratones. La inducción de poblaciones de linfocitos T CD8⁺ ya sea productor de IFN- γ o IL-4 por parte del grupo “TSA-1+E6020-SE” favoreció la respuesta TH1, esto se pudo observar al analizar la alta producción de anticuerpos IgG2a y la sobrevivencia del modelo murino.

Experimentos en modelos murinos han demostrado que la activación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ es necesaria para proteger contra el establecimiento de la infección por *T. cruzi*. Esto ha sido demostrado por la elevada susceptibilidad de ratones deficientes de β 2-microglobulina y MHC clase I y II.^{93,94}

En el presente estudio, los grupos tratados con la proteína recombinante en combinación con los adyuvantes demostraron tendencias en las cuales aumenta la eficacia terapéutica de estos candidatos a vacuna, evidenciado por la disminución de los niveles de parasitemia, carga parasitaria cardiaca, densidad de células inflamatorias y aumento en la sobrevivencia. A pesar de que estos resultados no fueron significativos al ser comparados con solución salina, hubo aumento en la respuesta inmune humoral por medio de altos niveles de anticuerpos IgG totales antígeno específico y una tendencia a aumentar la respuesta inmune celular por medio del incremento de IFN- γ . Lo cual sugiere que la presencia del antígeno más los adyuvantes es indispensable para promover la eficiencia de la vacuna, aumento de la respuesta humoral antígeno-específica y producción de IFN- γ en esplenocitos estimulados con el antígeno.

IX CONCLUSIONES

- El uso de TSA-1r con fines terapéuticos genera efectos negativos en el control del proceso infeccioso.
- La adición de los adyuvantes GLA-SE o E6020-SE al antígeno TSA-1r anula el efecto negativo provocado por este, evitando un incremento en la parasitemia y la carga parasitaria cardiaca. Así como, permitiendo una mayor sobrevivencia de los ratones infectados.
- El uso de TSA1-1r conjuntamente con los adyuvantes favorece la activación de una respuesta inmune antígeno específica.
- La aplicación terapéutica de TSA-1r y E6020-SE a ratones infectados con *T cruzi* provoca que la respuesta inmune inducida se oriente hacia TH1.

X PERSPECTIVAS

Debido a que se observó una tendencia a mejorar el efecto terapéutico en los grupos tratados con los adyuvantes y TSA-1r, es recomendable realizar estudios que permitan determinar si la activación de la respuesta inmune antígeno específica generada favorece el control de la infección en la fase crónica de la enfermedad.

Es importante realizar estudios que permitan evaluar la eficacia de los adyuvantes GLA y E6020 a diferentes dosis y en combinación con otros nuevos antígenos candidatos a vacunas contra la infección provocada por *T. cruzi*.

Los candidatos a vacuna “TSA-1r+GLA-SE” y “TSA-1r+E6020-SE” podrían ser evaluados como componentes de estrategias terapéuticas en las que se administren con algunos de los fármacos antitripanosomales convencionales, como por ejemplo el Benznidazol, de esta manera es factible una reducción de la dosis del fármaco y por lo tanto una disminución de los efectos tóxicos en los pacientes.

XI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto J. Chagas disease. Lancet. 2010; 375: 1388-1402.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Tripanosomiasis americana. 2015. Nota descriptiva No 340. (Consultado el 30 de agosto del 2016). Disponible en URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
3. Dias J, Silveira A, Schofiel C. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro. 2002; 97(5): 603-612.
4. Teixeira A, Nascimento R, Sturm N. Evolution and pathology in Chagas disease. Memorias do Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro. 2006; 101(5): 463-491.
5. Braga M, Lauria-Pires L, Argañaraz E, Nascimento R T. Persistent infections in chronic chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000; 42(3): 157-161.
6. Castro J, Montalto de Mecca M, Bartel L. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Hum Exp Toxicol. 2006; 25(8): 471-479.
7. Rosado M. Vacunas contra la pobreza y su desarrollo en la región. En: Contribución de la Biotecnología al Desarrollo de la Península de Yucatán. 2012. Dumonteil E. CONACYT, México. 433-449.
8. Brunner R, Jansen-Jarolim E, Pali-Scholl I. The ABC of clinical and experimental adjuvants. A brief overview. Immunol Lett. 2010; 128(1): 29-35.
9. Behzed H, Huckriede A, Haynes L, Gentleman B, Coyle K, Wilschut J, et al. GLA-SE, a synthetic Toll-like receptor 4 agonist, enhances T-cell responses to influenza vaccine in older adults. J Infect Dis. 2012; 205: 466-473.
10. Ishizaka S, Hawkins L. E6020: a synthetic Toll-like receptor 4 agonist as a vaccine adjuvant. Expert Rev Vaccines. 2007; 6(5): 773-784.
11. Chatelain E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. J Biomol Screen. 2015; 20(1): 22-35.
12. Carabarin-Lima A, González-Vázquez M, Rodríguez-Morales O, Baylón-Pacheco L, Rosales-encina JL, Reyes-Lopez P, et al. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. Acta Trop. 2013; 127(2):

126-135.

13. Zavala-Velazquez J. La enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán, Mexico. *Rev Biomed*. 2003; 14(1): 35-43.
14. Zaniello B, Kessler D, Vine K, Grima K, Weisenberg S. Seroprevalence of Chagas infection in the donor population. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(7): 5-7.
15. Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Verges M, del Pino M, Fumado V, *et al*. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis*. 2009; 48(12): 1736-1740.
16. Cáceres-Lázaro A. Manual de Procedimientos de Identificación de Triatomíneos Del Perú. Lima; 2005.
17. El-Sayed N, Myler P, Bartholomeu D, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A, Ghedin E *et al*. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005; 309(5733): 409-415.
18. Parodi C, Padilla A BM. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*. 2009; 104: 288-294.
19. Tyler K, Engman D. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001; 31(5-6): 472-481.
20. Rodrigues M, Oliveira A, Bellio M. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *J Parasitol Res*. 2012; 507874: 1-13.
21. de Souza W. Active penetration of *Trypanosoma cruzi* into host cells: Historical considerations and current concepts. *Front Immunol*. 2013; 4: 1-3.
22. Santos-Barrias E, Ullises T, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Front Immunol*. 2013; 4: 1-10.
23. Werner A, Zulantaya I. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Med Chile*. 2011; 139: 247-257.
24. Bathia M, Mayer I, Fontes T, Silva F, de Figueiredo L, Santana I *et al*. Fexinidazole: A potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(11): e1870.
25. Bahia MT, Nascimento AFS, Mazzeti AL. Antitrypanosomal activity of

- fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4362-4370.
26. de Castro S, Batista D, Batista M, Batista W, Souza L, Menna-Barreto R *et al.* Experimental chemotherapy for Chagas Disease: A morphological, biochemical, and proteomic overview of potential *Trypanosoma cruzi* targets of amidines derivatives and Naphthoquinones. *Mol Biol Int.* 2011; 306928: 1-13.
 27. Machado F, Tyler K, Brant F, Esper L, Teixeira M TH. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. *Front Biosci.* 2013; 4: 1743-1758.
 28. Bafica A, Costa-Santiago H, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli R S. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2006; 177: 3515-3519.
 29. DosReis G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Brazilian J.* 2011; 44(2): 84-90.
 30. Rodrigues M, de Alencar B, Claser C, Tzelpis F, Silveira E, Haolla F, *et al.* Swimming against the current: genetic vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro.* 2009; 104: 281-287.
 31. Abbas A, Lichtman A PS. *Cellular and Molecular Immunology.*; 2007.
 32. Rodrigues M, Boscardin S, Vasconcelos J, Hiyane M, Salay G SI. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications. *An Acad Bras Cienc.* 2003; 75(4): 443-468.
 33. Padilla A, Bustamante J, Tarleton R. CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol.* 2010; 21(4): 385-390.
 34. Camargo EP. Perspectives of vaccination in Chagas disease revisited. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(1): 275-280.
 35. Dumonteil E, Ramirez-Sierra M, Escobedo-Ortegon. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine.* 2003; 21: 2161-2168.
 36. Cruz-Chan J, Bolio-Gonzalez M, Colin-Flores R, Ramirez-Sierra M, Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Vet Parasitol.* 2009; 162: 151-155.

37. Quijano-Hernandez I, Bolio-Gonzalez M, Rodriguez-Buenfil J, Ramirez-Sierra M, Dumonteil E. Therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* Infection in Dogs. *Anim Biodivers Emerg Dis*. 2008;1149:343-346. doi:10.1196/annals.1428.098.
38. Dumonteil E, Escobedo-Ortegon J, Reyes-Rodriguez N, Arjona-Torres A, Ramirez-Sierra M. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infect Immun*. 2004; 72(1): 46-53.
39. Zapata-Estrella H, Hummel-Newell C, Sanchez-Burgos G, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra M, Arjona-Torres A, *et al*. Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunol Lett*. 2006; 103: 186-191.
40. Limon-Flores A, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona J, Ek-Macias L, Sanchez-Burgos G, Ramirez-Sierra M, *et al*. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: Role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Vaccine*. 2010; 28(46): 7414-7419.
41. Barnard R. Recombinant vaccines: Strategies for candidate discovery and vaccine delivery. *Expert Rev Vaccines*. 2010; 9(5): 461-463.
42. Duthie M, Kahn M, Zacayan A, White M. Parasite-induced chronic inflammation is not exacerbated by immunotherapy before or during *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14(8): 1005-1012.
43. Martinez-Campos V, Martinez-Vega P, Ramirez-Sierra MJ, Rosado-Vallado M, Seid C, Hudspeth E, *et al*. Expression, purification, immunogenicity, and protective efficacy of a recombinant Tc24 antigen as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*. 2015; 33(36): 4505-4512.
44. Bhatia V, Sinha M, Luxon B, Garg N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. *Infect Immun*. 2004; 72(11): 6245-6254.
45. Sanchez-Burgos G, Mezquita-Vega G, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra M, Arjona-Torres A, Ouaisi A, *et al*. Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 50: 333-341.
46. Wrightsman R, Dawson B, Fouts D, Manning J. Identification of Immunodominant Epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. *J Immunol*. 1994; 153: 3148-3154.

47. Garg N, Tarleton R. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. 2002; 70(10): 5547-5555.
48. Maussalem J, Vasconcelos J, Squaiella C, Ananias R, Braga E, Rodrigues M *et al*. Adjuvant effect of the *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on the immunization with plasmidial DNA containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Microbiol Immunol*. 2006; 50(4): 253-263.
49. Bhatia V, Garg N. Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(8): 1158-1164.
50. Rodríguez-Morales O, Pérez-Leyva MM, Ballinas-Verdugo MA, *et al*. Plasmid DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* genes induces cardiac and clinical protection against Chagas disease in the canine model. *Vet Res*. 2012;43(1):2-11. doi:10.1186/1297-9716-43-79.
51. Schnapp A, Eickhoff C, Sharfstein J HD. Induction of B and T cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2002; 4: 805-813.
52. Fralish B, Tarleton R. Genetic immunization with LYT1 or a pool of transsialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2003; 21(21-22): 3070-3080.
53. Garcia G, Arnaiz M, Laucella S, Esteva M, Ainciart N, Riarte A *et al*. Immunological and pathological responses in BALB/c mice induced by genetic administration of Tc 13 Tul antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2006; 132(6): 855-866.
54. Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin*. 2011; 7(11): 1184-1191.
55. Coffman R, Sher A, Seder R. Vaccine Adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010; 33(4): 492-503.
56. Velsikari T, Knuf M, Wultzer P, Karvonen A, Kieninger-Baum D, Schmitt H, *et al*. Oil-in-water emulsion adjuvant with influenza vaccine in young children. *N Engl J Med*. 2011; 365(15): 1406-1416.
57. Perez O, Batista-Duharte A, Gonzalez E, Zayas C, Balboa J, Cuello M, *et al*. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. *Brazilian J Med Biol Res*. 2012; 45(8): 681-692.

58. McKee A, MacLeod M, Kappler J MP. Immune mechanisms of protection: Can adjuvants rise to the challenge? *BioMed Cent.* 2010; 8(37): 1-10.
59. Lindblad E. Aluminium adjuvants- in retrospect and prospect. *Vaccine.* 2004; 22: 3658-3668.
60. Marrack P, McKee A, Munks M. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol.* 2011; 9(4): 287-293.
61. Tomljenovic L, Shaw C. Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. *Lupus.* 2012; 21: 223-230.
62. Klinman D, Klaschik S, Tomaru K, Shirota H, Tross D IH. Immunostimulatory CpG oligonucleotides: Effect on gene expression and utility as vaccine adjuvants. *Vaccine.* 2011; 28(8): 1919-1923.
63. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman J, Nguyen M, Sato Y, Ronahy A, *et al.* Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med.* 1997; 3(8): 849-854.
64. Tross D, Klinman D. Effect of CpG oligonucleotides on vaccine-induced B cell memory. *J Immunol.* 2008; 181: 5785-5790.
65. Glausser MP, Zanetti G, Cohen J. Septic shock: Pathogenesis. *The Lancet.* 1991; 338: 732-736.
66. Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol.* 1995; 164(6): 383-389.
67. Rietschel E, Kirikae T, Schade U, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationship of structure to activity and function. *FASEB Jour* 1994; 8(2):217-225.
68. Jenkins KA, Mansell A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Cytokine.* 2010; 49(3): 237-244.
69. Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *New York.* 2002; 109(12): 1519-1526.
70. Shen H, Tesar BM, Walker WE, Goldstein DR. Dual signaling of MyD88 and TRIF is critical for maximal TLR4-induced dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2008; 181(3): 1849-1858.
71. López-Antuñano F. Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública Méx.* 1997; 39(5): 463-471.
72. Baldrige JR, Crane RT. Monophosphoryl Lipid A (MPL) Formulations for the

- Next Generation of Vaccines. *Methods*. 1999; 19(1): 103-107.
73. Evans JT, Cluff CW, Johnson D a, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines*. 2003; 2(2): 219-229.
 74. Coler RN, Bertholet S, Moutaftsi M. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PLoS One*. 2011; 6(1): 1-12.
 75. Cekik C, Casella C, Eaves C, Matsuzawa A, Ichijo H MT. Selective activation of the p38 MAPK pathway by synthetic monophosphoryl lipid A. *J Biol Chem*. 2009; 284(46): 31982-31991.
 76. Casella C, Mitchell T. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe effective vaccine adjuvant. *Cell Mol Life*. 2009; 65(20): 3231-3240.
 77. Taibi A, Guevara-Espinoza A, Ouaisi A. *Trypanosoma cruzi*: analysis of cellular and humoral response against a protective recombinant antigen during experimental Chagas' disease. *Immunol Lett*. 1995; 48: 193-200.
 78. Hovav A, Fishman Y, Bercovier H. Gamma interferon and monophosphoryl lipid A-trehalose dicorynomycolate are efficient adjuvants for *Mycobacterium tuberculosis* multivalent acellular vaccine. *Infect Immun*. 2005; 73(1): 250-257.
 79. O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2(9):727-735.
 80. Rowland E, Lozykowski M, McCormick T. Differential cardiac histopathology in inbred mouse strains chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*. 1992;78(6):1059-1066.
 81. Rosado-Vallado M, Mut-Marin M, Garcia-Miss M, Dumonteil E. Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against *Leishmania mexicana*. *Vaccine*. 2005; 23: 5372-5379.
 82. Michailowky V, Luhrs K, Rocha M, Fouts D, Gazzinelli R MR. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infection Immun*. 2003; 71(6): 3165-3171.
 83. Fulcher D, Wong S. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic

- laboratory. *Immunol Cell Biol.* 1999; 77(6): 559-564.
84. Woodberry T, Pinzon-Charry A, Piera K, Panpisutchai Y, Engwerda C, Doolan D *et al.* Human T cell recognition of the blood stage antigen Plasmodium hypoxanthine guanine xanthine phosphoribosyl transferase (HGXPRT) in acute malaria. *Malar J.* 2009; 8: 122.
 85. Lamoreaux L, Roederer M K. Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. *Nat Protoc.* 2006; 1(3): 1507-1516.
 86. Cummings K, Tarleton R. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 129: 53-59.
 87. Moser D, Kirchhoff L, Donelson J. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(7): 1477-1482.
 88. Arias M, Van Roey G, Tregoning J, Moutaftsi M, Coler R, Windish H *et al.* Glucopyranosyl lipid adjuvant (GLA), a synthetic TLR4 agonist, promotes potent systemic and mucosal responses to Intranasal immunization with HIVgp140. *PLoS One.* 2012; 7(7): e41144
 89. Weinberger B, Joos C, Reed SG, Coler R, Grubeck-Loebenstien B. The stimulatory effect of the TLR4-mediated adjuvant glucopyranosyl lipid A is well preserved in old age. *Biogerontology.* 2015; 85.
 90. Anderson RC, Fox CB, Dutill TS. Physicochemical characterization and biological activity of synthetic TLR4 agonist formulations. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010; 75(1):123-132.
 91. Salgado-Jiménez B, Arce-Fonseca M, Baylón-Pacheco L, Talamás-Rohana P, Rosales-Encina JL. 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 Immunol.* 2013; 35(1):32-41.
 92. Rhee E, Phelps R, Agarwal I, Lynch D, La Porte A, Simmons N *et al.* TLR4 ligands augment antigen-specific CD8⁺ T lymphocyte responses elicited by a viral vaccine vector. *J Virol.* 2010; 84(19):10413-10419.
 93. Tarleton RL, Koller BH. Susceptibility of B2-microglobulin deficient mice to

Trypanosoma cruzi infection. Nature. 1992; (356):338-340.

94. Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. Trypanosoma cruzi infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. Int Immunol. 1996; (1):13-22.