

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS REVERSOS DE
Trypanosoma cruzi”**

T E S I S

Que presenta

BIÓL. ALONDRA CRUZ REYES

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

Director de la tesis:

DR. JOSÉ LUIS ROSALES ENCINA

México, D.F.

Agosto, 2014

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, bajo la tutoría del Dr. José Luis Rosales Encina, y bajo la asesoría del DR. Marco Antonio Vega López y del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez.

Durante el desarrollo de esta tesis, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACyT), bajo número de becario: 488035

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. José Luis Rosales Encina por la tutoría de este trabajo.
- Al Dr. Marco Antonio Vega López y del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez por su asesoría durante la realización de este trabajo.
- A la Biól. Lidia Bailón Pacheco, por su valioso apoyo técnico en los experimentos realizados para este trabajo.
- A la M. en C. Patricia Espíritu Gordillo por su asesoría durante la realización de este proyecto.
- A mis compañeros del laboratorio 7 por toda su ayuda y amistad.
- A mis amigos Ariana, Berenice, Javier, Marisol, Diana, Oscar y Angélica por su compañía, consejos y apoyo durante este periodo de nuestras vidas. Un honor conocerlos y compartir cada día con ustedes. Gracias por todo.
- A mis padres Ely y Elcira por su apoyo, confianza y amor incondicional, por ser un ejemplo de vida, porque mi mayor meta en la vida siempre será, que juntos logremos todo, porque no me pudieron tocar mejores padres gracias, por acompañarme y cuidarme siempre aun en la distancia, los amo.
- A mis hermanos Mavi y Francisco por confiar en mí, por toda su ayuda y amor, los amo.

ÍNDICE.....	1
RESÚMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> generalidades.....	6
1.2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.3. Mecanismos de transmisión en el humano.....	7
1.4. Fases clínicas.....	9
1.4.1. Fase aguda.....	9
1.4.2. Fase crónica asintomática (indeterminada).....	10
1.4.3. Fase crónica sintomática (determinada).....	10
1.5. Diagnóstico.....	11
1.6. Tratamiento.....	12
1.7. Epidemiología.....	15
1.7.1. Epidemiología en México.....	15
1.8. Respuesta inmune a la infección por <i>T. cruzi</i>	16
1.8.1. Respuesta inmune innata a la infección por <i>T. cruzi</i>	17
1.8.2. Respuesta inmune adquirida.....	20
1.8.2.1. Respuesta inmune celular.....	20
1.8.2.2. Respuesta inmune humoral.....	21
1.9. Desarrollo de vacunas contra la enfermedad de Chagas.....	22
2. Proteínas membranales.....	31
3. Familia de proteínas cinasas.....	33
3.1. Kinoma de <i>T. cruzi</i>	34
4. Proteínas con secuencias de aminoácidos repetidos en tándem.....	35
4.1. Proteínas con secuencias de aminoácidos repetidoe en tándem en <i>T. cruzi</i>	36
II. ANTECEDENTES.....	38
III. JUSTIFICACIÓN.....	40

IV. OBJETIVOS.....	41
1. Objetivo general.....	41
2. Objetivos específicos.....	41
V. METODOLOGÍA.....	42
1. Análisis bioinformático para selección de antígenos.....	42
2. Material biológico.....	46
3. Amplificación de los fragmentos de DNA que codifican los antígenos reversos.....	47
4. Células competentes <i>E. coli</i> Top 10F´.....	48
5. Purificación de DNA plasmídico.....	48
6. Purificación de proteínas recombinantes.....	49
7. Electroforesis e inmunotransferencias.....	49
8. Inmunización con las proteínas recombinantes e infección.....	50
9. Parasitemia y mortalidad de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes.....	51
10. Expresión estadio específica y localización subcelular de las proteínas nativas TcKF6 y TcRM3.....	51
Vi. RESULTADOS.....	54
1. Análisis bioinformático de la base de datos TriTryp DB 5.0 (junio, 2013).....	54
2. Construcción de proteínas recombinantes.....	57
3. Purificación de proteínas recombinantes.....	59
4. Análisis de la expresión estadio específica de proteínas nativas TcKF6 y TcRM3.....	62
5. Localización subcelular de las proteínas nativas TcKF6 y TcRM3.....	63
6. Parasitemia y mortalidad de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes.....	70
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	72
VIII. CONCLUSIÓN.....	80
IX. PERSPECTIVAS.....	80
X. BIBLIOGRAFÍA.....	81

RESUMEN

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual afecta a casi 10 millones de personas, y más de 80 millones de personas están en riesgo de infección, principalmente en América Latina. La quimioterapia es de uso restringido debido a la alta toxicidad y pobre eficacia de las drogas disponibles. Actualmente no existe una vacuna 100% efectiva ya que una variedad limitada de antígenos de *T. cruzi* han sido evaluados. Por lo tanto, la identificación de nuevos antígenos que tengan un potencial prometedor como candidatos a vacuna es necesaria. Ha sido reportado previamente que las proteínas de superficie son buenos antígenos generando una respuesta inmune considerablemente protectora sugiriendo su utilidad como candidatos a vacunas, es por ello que en este estudio se trabajó con este tipo de proteínas. En este estudio se adoptó el enfoque de vacunología reversa para identificar candidatos a vacuna contra *Trypanosoma cruzi*. El proteoma completo (11109 ORF) fue analizado para la selección de proteínas de membrana mediante la predicción de hélices transmembranales obteniéndose un 24.7% (2752 proteínas) que poseen hélices transmembranales, posterior a esto se seleccionaron proteínas que poseían un dominio cinasa o con repetidos en Tandem (RT) en la secuencia, se obtuvieron 595 con dominio cinasa y 160 con RT, de estas se realizó la búsqueda de EST para determinar la expresión estadio específica de cada una y posteriormente se determinó la localización subcelular mediante los predictores ESLpred, SLPFA, EuLoc, CELLO y ngLOC, se seleccionaron 9 genes con dominio cinasa y 33 con RT de membrana plasmática. Se ha visto que la respuesta inmune protectora a la infección por *T. cruzi* es caracterizada por la producción de anticuerpos líticos y por la activación de células CD8+ T por lo tanto se realizó la identificación de epitopos para linfocitos B y T citotóxicos con los programas LEPS y CTLPred respectivamente y se redujo la lista a 3 proteínas de la familia cinasa y tres con RT que se expresan una en cada estadio del parásito en ambos grupos. De estas 6 proteínas 5 de ellas fueron amplificadas para obtener los genes (TcKM2, TcKW8, TcKF6 de la familia cinasa y tres con RT TcRM3 y TcRL9) que fueron expresadas correctamente en el vector TOPO, dos de ellas (TcKF6 y TcRM3) fueron purificadas y analizadas para determinar su potencial como vacuna en un modelo murino. Se comprobó mediante inmunofluorescencias que estas proteínas TcKF6 y TCRM3 se expresan en membrana plasmática de los diferentes estadios del parásito y que son inmunogénicas ya que promueven la producción de anticuerpos cuando son inmunizadas. Por otro lado la inmunización de la proteína TcKF6 promueve la disminución de la parasitemia y aumenta la sobrevivencia en ratones infectados al comparar con los grupos controles, dichas propiedades son conocidas por correlacionar con el control de la infección por *T. cruzi*. Tomando juntos los resultados de este trabajo validan la aplicabilidad de la bioinformática en la identificación de proteínas de *T. cruzi* asociadas a membrana que son potenciales candidatos a vacuna.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the aetiological agent of Chagas disease, which affects nearly 10 million people, and 80 million more are at risk of infection in Latin America mainly. Chemotherapy is of limited use due to high toxicity and poor efficacy of available drugs. Currently there is no vaccine 100% effective due to a limited range of *T. cruzi* antigens that have been evaluated. Therefore, the identification of new antigens with potential as vaccine candidates is required. It has previously been reported that surface proteins are good antigens that generate a significantly protective immune response, suggesting its utility as vaccine candidates, that is why this kind of proteins were selected in this study, in which the reverse vaccinology approach was adopted to identify vaccine candidates against *T. cruzi*. In this study the reverse vaccinology approach was adopted to identify vaccine candidates against *T. cruzi*. The complete proteome (11109 proteins) was analyzed for the selection of membrane protein -24.7% (2752 proteins), after this, proteins that possessed a kinase domain (595) or tandemly repeated amino acids (160) (TRs) were selected. In these proteins, EST search was performed to determine the parasite stage specific expression, and then subsequently subcellular localization was determined; in this way 9 genes with kinase domain and 33 with TRs were selected. It has been found that the protective immune response to *T. cruzi* infection is characterized by the production of lytic antibodies and activation of CD8 + T cells. Therefore identifying epitopes for B and T cytotoxic lymphocytes was performed in the selected proteins. Finally three proteins from the kinase family and three with TRs, each expressed at different stage of the parasite in both groups, were chosen for further study. Five out of six genes were amplified by PCR assays (TcKM2, TcKW8, TcKF6 from kinase family and TcRM3 and TcRL9 with RT), and then two of these genes were expressed correctly and the recombinant proteins were purified (rTcKF6 y rTcRM3) and analyzed to determine their potential as a vaccine in a murine model. It was verified by indirect immunofluorescence assays that the native proteins (TcRM3 and TcKF6) are expressed in plasma membrane of the different stages of the parasite, and that both of them are immunogenic. Furthermore immunization with rTcKF6 increases survival in infected mice when compared to control groups. The above results validate the applicability of bioinformatics in identifying membrane proteins of *T. cruzi* that are potential vaccine candidates.

I. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario que infecta varios mamíferos incluyendo al hombre, donde es el agente causante de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana (Chagas, 1909). La enfermedad de Chagas es un problema importante de salud pública, ya que afecta a casi 10 millones de personas y más de 80 millones están en riesgo de infección, principalmente en América latina donde es endémica. Sin embargo las migraciones internacionales están haciendo que la enfermedad sea cada vez más frecuente también en países no endémicos. Es una de las enfermedades tropicales más desatendidas y esta frecuentemente asociada a la pobreza y la marginación en las zonas rurales, aunque se está expandiendo a las áreas suburbanas y urbanas en muchos países (Quijano-Hernández y Dumontiel, 2011). En la actualidad se reportan aproximadamente 40 mil casos nuevos por año y el número de muertes anual es de 12, 500, por lo cual es la enfermedad parasitaria más importante en el continente (Coura y Dias, 2009).

Trypanosoma cruzi se transmite al hombre por diversos mecanismos, de los cuales el principal y de mayor importancia epidemiológica es la transmisión a través de las deyecciones de insectos hematófagos infectados (transmisión vectorial) (Zulantay, 2005). Los vectores naturales de *T. cruzi* son triatomíneos pertenecientes a la familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae* (Markell *et al.*, 1990). Las principales especies vectoriales son *Triatoma dimidiata*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma barberi* y *Rodnius prolixus* (McGhee y Cosgrove, 1980; Guzmán-Marín, 1990). Existen rutas secundarias de transmisión que incluyen transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión materno-fetal y más raramente, por la ingestión de sustancias contaminadas o por la infección accidental en el laboratorio. De éstas, la infección por transfusión sanguínea es el segundo mecanismo de transmisión después de la vectorial, debido al incremento de la migración de personas de las zonas rurales endémicas a zonas urbanas donde no existen los triatomíneos e incluso a zonas rurales no endémicas (Ramos-Ligonio *et al.*, 2006).

1.1. *Trypanosoma cruzi* generalidades

Trypanosoma cruzi es un parásito flagelado perteneciente al *Phylum Protozoa*, *subphylum sarcomastigofora*, *superclase Mastigophorastica*, *clase Zoomastigophora*, *orden Kinetoplastida* y *familia Trypanosomatidae* (MacGhee y Cosgrove, 1980). En el transcurso de su ciclo de vida, *T. cruzi* presenta cuatro estadios de desarrollo conocidos como epimastigote, tripomastigote metacíclico, amastigote y tripomastigote sanguíneo, los dos primeros presentes en el vector invertebrado y los otros dos en el hospedero vertebrado. Estos estadios se definen por su forma, posición del kinetoplasto con respecto al núcleo y la región por donde se origina el flagelo (Tay-Zavala *et al.*, 1991).

El epimastigote es fusiforme, con un flagelo que forma una membrana ondulante pequeña, el kinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que se encuentra en posición central. Este estadio es la forma replicativa no infectiva en el vertebrado, solo se localiza en el intestino del vector invertebrado dando lugar a los tripomastigotes metacíclicos. El tripomastigote metacíclico es flagelado, alargado con un gran núcleo central, kinetoplasto de gran tamaño hacia la parte posterior de donde surge un flagelo que contornea una membrana ondulante, que le confiere movimiento, es la forma no replicativa y que penetra e infecta al hospedero. El amastigote es de forma redondeada de 1.5 a 4 μm de diámetro carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el kinetoplasto a manera de disco, proviene de la diferenciación de los tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos, son intracelulares en el huésped vertebrado y tiene capacidad de replicación, por división binaria simple. Por último, los tripomastigotes sanguíneos o promastigotes se producen por la diferenciación de los amastigotes, son flagelados y alargados con una membrana ondulante, el kinetoplasto es grande y está alejado de la parte anterior del núcleo. Este estadio se encuentra en la sangre y no tiene capacidad para dividirse, pero sí la tiene para invadir otras células en el vertebrado o pasar al vector invertebrado (Brenner 1971; Tay *et al.*, 1991).

1.2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico involucra a mamíferos como los hospederos definitivos; el ciclo se inicia cuando un triatomino se alimenta de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes circulantes (esta es la única vía por la cual estos insectos pueden infectarse ya que la transmisión transovárica no se produce), esta forma infectiva llega a la porción anterior del intestino del insecto transformándose en epimastigotes, estos se dividen por fisión binaria longitudinal e invaden la porción distal del intestino en donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos que es la forma infectiva para los mamíferos. El insecto vector puede ingerir varias veces su peso corporal en sangre por lo cual al momento de alimentarse deyecta sobre la piel liberando en las heces estas formas infectivas, lo cual puede resultar en la transmisión al entrar en contacto con las lesiones de la picadura u otras superficies vulnerables como los conjuntivas, mucosas nasales y orales. Una vez que los tripomastigotes metacíclicos entran al hospedero mamífero, estos invaden las células introduciéndose en el citoplasma e inician el ciclo intracelular el cual tiene una duración promedio de 4 a 5 días. Una vez dentro de las células, los tripomastigotes se transforman en amastigotes esta reorganización lleva cerca de tres horas, después los amastigotes permanecen inactivos de 20 a 35 horas e inician replicación por fisión binaria de varias rondas con un tiempo de duplicación de aproximadamente 12 horas, por lo que 500 parásitos se generan a partir cada uno que es internalizado originalmente. Después de completar el periodo replicativo los amastigotes se diferencian en tripomastigotes sanguíneos los cuales rompen la célula hospedera liberándose al torrente sanguíneo, estos pueden entonces infectar células adyacentes, otros tejidos distantes o ser ingeridos por un triatomino completándose así el ciclo de vida (Burleigh y Andrews, 1995; Kirchhoff, 2011).

1.3. Mecanismos de transmisión en el humano

La enfermedad de Chagas se transmite al humano y aproximadamente a 150 especies de animales domésticos (ej. Perros, gatos, cerdos) y animales salvajes (ej. Armadillos, tlacuaches, ardillas), principalmente en forma vectorial por hemípteros hematófagos *Reduviidae*, pertenecientes a la familia *Triatominae* (Rassi *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista de la enfermedad humana, la transmisión vectorial de *T. cruzi* presenta dos categorías polares, el ciclo de transmisión selvática y el ciclo de transmisión doméstico, el cual se lleva a cabo dentro de la vivienda humana y se presentan múltiples interacciones vector-reservorio-hombre que dan lugar a los diferentes mecanismos de transmisión (Pinto, 1992).

Históricamente, la transmisión vectorial de *T. cruzi* ha sido el mecanismo más importante a través del cual los seres humanos se han infectado con el parásito, este tipo de transmisión está asociado principalmente a zonas rurales. Se trata de un mecanismo de contacto de la piel y mucosas del hospedero con heces u orina parasitadas con tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* (Brener, 1972). Se han identificado más de 130 especies de chinches que podrían servir como vectores, de estas *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son las tres especies de vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre (Rassi *et al.*, 2010). Este tipo de transmisión está considerado como el principal reto para el control de la enfermedad y a pesar de los esfuerzos que se han realizado para el control y/o erradicación el número de casos por año está arriba de los 40,000 (OMS, 2005).

La enfermedad de Chagas puede ser transmitida al hombre por mecanismos no vectoriales, tales como la transfusión sanguínea y transmisión vertical de madre a hijo. El riesgo de adquisición de la enfermedad de Chagas después de la transfusión de una unidad de sangre de un donante infectado es inferior al 10 al 20 %, y depende de varios factores , incluyendo la concentración de parásitos en la sangre del donante , el componente de la sangre transfundido y tal vez al tipo de cepa (Bern *et al.*, 2008). El riesgo de transmisión parece ser mayor en las transfusiones de las plaquetas que para los otros componentes de la sangre. La transmisión congénita ocurre cuando los parásitos pasan de la madre al feto y en estos casos puede producirse un aborto espontáneo o enfermedad congénita de Chagas, la transmisión congénita afecta entre el 2-10 % de recién nacidos y este porcentaje podría ser atribuible a la cepa del parásito, el estado inmunológico de las madres infectadas, factores placentarios y las diferentes metodologías utilizadas para la detección de estos casos. Las formas de transmisión por transfusión y congénita son las principales formas de infección de los

seres humanos en zonas urbanas y en los países no endémicos (Rassi *et al.*, 2010). La infección por leche materna es posible según verificación clínica y experimental, sin embargo su frecuencia es excepcional (Segura *et al.*, 1999).

La transmisión también puede ocurrir a través de trasplante de órganos obtenidos a partir de personas infectadas con *T. cruzi* (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, 2006). Presumiblemente, esto ocurre debido a que algunas células en los órganos de donantes contienen las formas intracelulares (amastigotes) que después del trasplante se transforman en tripomastigotes que infectan los tejidos adyacentes y células en sitios distantes después de la rotura de las células del hospedero, estableciendo así una infección sistémica (Kirchhoff, 2011).

En raras ocasiones, la enfermedad de Chagas puede ser contraída por la ingestión de alimentos (carne cruda) o líquidos contaminados con *T. cruzi*, la ingesta oral generalmente se asocia con infestación parasitaria masiva y con una alta mortalidad. La infección también puede ocurrir por accidentes en laboratorios médicos en los que se manipulan triatomíneos y animales infectados, cultivos de *T. cruzi* o material biológico proveniente de enfermos graves o de animales infectados (Kirchhoff, 2011).

1.4. Fases clínicas

1.4.1. Fase aguda

La fase inicial de la enfermedad de Chagas es la fase aguda, tiene una duración de aproximadamente 4-8 semanas, suele ser asintomática y cuando se presentan síntomas estos aparecen 1-2 semanas después de la exposición a los triatomíneos infectados o hasta un par de meses después de la transfusión de sangre infectada. Los síntomas que suelen aparecer incluyen: fiebre prolongada, malestar general, hepatomegalia, esplenomegalia e inflamación de ganglios linfáticos, edema subcutáneo (localizado o generalizada), y en el caso particular de transmisión vectorial la señal de la puerta de entrada de *T. cruzi* por la piel que es el chagoma o si fue a través de la mucosa ocular el “Signo de Romaña” (edema bpalpebral unilateral). Un

electrocardiograma (ECG) puede mostrar taquicardia sinusal, bloqueo atrioventricular de primer grado, bajo voltaje del QRS, o cambios primarios en la onda T, una radiografía de tórax puede mostrar grados variables de cardiomegalia (Rassi *et al.*, 2000). Una repetición de ECG y una radiografía de tórax son fundamentales para la detección de estas anomalías. En la infección congénita los síntomas más frecuentes en los infantes al nacimiento o a las pocas semanas son hipotonicidad, fiebre, hepatoesplenomegalia y anemia; otros hallazgos incluyen nacimiento prematuro y bajo peso al nacer. Las infecciones *in utero* están asociadas con abortos y placentitis. Las manifestaciones graves aunque muy poco comunes incluyen miocarditis, meningoencefalitis, y neumonitis. Las manifestaciones de la enfermedad aguda se resuelven espontáneamente en aproximadamente el 90% de los individuos infectados, incluso si la infección no es tratada (Rassi *et al.*, 2010).

1.4.2. Fase crónica asintomática (indeterminada)

Esta etapa se caracteriza por la ausencia de síntomas, pareciendo incluso que la enfermedad ha desaparecido, sin embargo hay positividad para anticuerpos contra *T. cruzi* en el suero, los ECG y exámenes radiológicos del tórax, esófago y colon son normales. La presencia de parásitos circulantes es intermitente, la mayoría de las personas pueden permanecer en esta fase de 10 a 20 años, después de este periodo del 10-30% desarrollan los síntomas de la fase crónica (Marin-Neto *et al.*, 2010).

1.4.3. Fase crónica sintomática (determinada)

Las manifestaciones clínicas típicas de esta fase están relacionados con las implicaciones patológicas del corazón, el esófago, colon, o una combinación y están agrupados en tres formas principales: cardíacas, digestivas, y cardiodigestivas. Las formas digestivas están caracterizadas por megaesófago que causa disfagia con odinofagia combinada con dolor epigástrico, regurgitación, ptialismo y desnutrición en casos severos. Cuando se presenta el síndrome de megacolon se afecta frecuentemente el segmento sigmoideo, recto o colon descendente o combinados ocasionando estreñimiento prolongado, distensión abdominal y ocasionalmente

obstrucción del vólvulo sigmoideo o del intestino grueso. En la forma cardiaca comúnmente hay anomalías en el sistema de conducción, bradicardia y taquicardia, aneurisma apical, insuficiencia cardiaca, tromboembolismo y muerte súbita (Rassi *et al.*, 2010).

1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas reviste unas características especiales debido a que las técnicas empleadas para determinar la infección varían según la etapa en la que se encuentre el paciente (Murcia *et al.* 2007).

Diagnóstico parasitológico: Durante la fase aguda de la enfermedad hay numerosos parásitos en sangre periférica y es posible detectarlos mediante pruebas parasitológicas directas (OMS, 2002). La observación mediante microscopía directa de sangre periférica en fresco, entre portaobjetos y cubreobjetos, permite distinguir fácilmente la presencia del parásito (Vega y Nákira, 2006).

Las extensiones de sangre periférica y la gota gruesa, adecuadamente teñidas, permiten observar las características morfológicas del parásito. Cuando el nivel de parasitemia es bajo es necesario usar técnicas de concentración, como el método de Strout (Strout, 1962), o el microhematocrito (Freilij *et al.*, 1983) que es el método de elección para identificar la infección congénita debido a su mayor sensibilidad y a que solo requiere una pequeña cantidad de sangre. Con el examen en fresco se logra detectar parásitos en el 85% de los casos en fase aguda y con los métodos de concentración, ese porcentaje se eleva a más del 95%, siempre que no hayan transcurrido más de 30 días desde el inicio de los síntomas (Luquetti y Rossi, 2000).

El xenodiagnóstico y el hemocultivo (disponibles solo en laboratorios especializados) son métodos clásicos, cuya sensibilidad depende del grado de parasitemia del paciente. En la actualidad se dispone de un xenodiagnóstico artificial, que se puede recomendar en lugar del xenodiagnóstico habitual, ya que la sensibilidad es la misma que con el xenodiagnóstico tradicional y se evita la exposición directa del

paciente al triatomino. Ambos métodos, además de su interés diagnóstico, son herramientas de gran utilidad para el aislamiento de cepas de *T. cruzi* y posteriores estudios de genética de poblaciones. Otra opción para la detección de *T. cruzi* es la inoculación en ratones, aunque se emplea fundamentalmente en investigación (Murcia *et al.*, 2013).

Las pruebas serológicas no son útiles en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase aguda, aunque la detección de inmunoglobulina M (IgM) anti-*T. cruzi* podría ser utilizada, sin embargo los ensayos de serología para IgM no están estandarizados y disponibles (Kirchhoff, *et al.*, 2011).

En la fase crónica, debido probablemente a la baja e intermitente parasitemia el diagnóstico se basa en el análisis serológico, el cual se basa en la determinación de IgG anti-*T. cruzi*. Se denomina convencional cuando se emplea como antígeno todo el parásito (inmunofluorescencia indirecta [IFI]) o una mezcla compleja de antígenos de parásito (hemoaglutinación indirecta [HAI], ensayos inmunoenzimáticos [ELISA]). El diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o péptidos sintéticos, entre los diferentes métodos comerciales disponibles, los más empleados son la HAI, la IFI y los ELISA. Actualmente, no hay una prueba que alcance el 100% de sensibilidad y especificidad, por lo que el diagnóstico serológico de certeza se basa en la concordancia de, al menos, 2 técnicas de distinto principio y antígeno (OMS, 2002).

En los últimos años, la detección de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una alternativa; aunque su realización requiere un tiempo superior al empleado en la observación directa, es inferior al necesario para detección de la presencia del parásito mediante xenodiagnóstico y hemocultivo. Existen numerosas dianas moleculares que permiten la detección específica de *T. cruzi*. En diagnóstico, los blancos más utilizados son la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto y la secuencia repetida de 195 pares de bases del ADN satélite. Como ambas se encuentran representadas en un número de copias muy similar (104 copias), las diferencias en el límite de detección dependen de la optimización de cada reacción.

Sin embargo, la sensibilidad también depende del grado de parasitemia del paciente. Un resultado positivo mediante PCR confirma la infección, pero un resultado negativo no la descarta, siendo necesario realizar pruebas serológicas. La PCR cuantitativa en tiempo real todavía no se utiliza mucho en el diagnóstico habitual debido a que la determinación de la carga parasitaria es útil, principalmente, en la etapa aguda y en el seguimiento de infecciones experimentales (Britto *et al.*, 1993; Britto, 2009).

1.6. Tratamiento

Tratamiento antiparasitario: Los fármacos disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son nifurtimox y benznidazol, cuya actividad anti-*T. cruzi* fue descubierta empíricamente hace más de 3 décadas (Jannin y Villa, 2007). El resto de fármacos, cuya utilidad es discutida para tratar la enfermedad de Chagas aguda, como el alopurinol, el fluconazol o el itraconazol, se han estudiado en animales de laboratorio y, en menor medida, en humanos (Muñoz *et al.*, 2011).

En los países de América Latina se considera al benznidazol como el fármaco más indicado, se trata de un medicamento no disponible en farmacia y debe tramitarse su obtención a través de medicación extranjera. La dosis oral recomendada para el benznidazol es de 5 a 7 mg/kg/día en 2 o 3 tomas durante 60 días en adultos. En niños de 1 a 10 años se administran 10 mg/kg de peso y día en 2 dosis durante 60 días. En el tratamiento con nifurtimox, la dosis diaria aconsejada para el adulto es de 8 a 10 mg/kg, para los adolescentes es de 12,5 a 15 mg/kg y para los niños de 1 a 10 años es de 15 a 20 mg/kg. El fármaco se administra por vía oral en 4 tomas diarias durante 90 a 120 días (Abramowicz, 2004). Una de las limitaciones del tratamiento de la enfermedad de Chagas es la alta tasa de efectos adversos asociada a estos fármacos, pudiendo presentarse hasta en el 40% de los pacientes tratados con benznidazol (Carrilero *et al.*, 2011), y el 61% de los tratados con nifurtimox (Murcia *et al.*, 2012).

Algunos efectos adversos del benznidazol son: neuropatía periférica, reacciones cutáneas más o menos severas y granulocitopenia. Los efectos secundarios habituales del nifurtimox son: dolor abdominal, anorexia, náusea, vómito y pérdida de peso. Las

posibles reacciones neurológicas son: inquietud, desorientación, pérdida de memoria, insomnio, espasmos, parestesias, polineuritis y convulsiones que desaparecen al reducir la dosis o suspender el tratamiento. El tratamiento temprano de la enfermedad de Chagas congénita presenta una buena respuesta terapéutica, con índices de curación cercanos al 100%. Ambos fármacos son activos en la fase aguda, y ayudan a controlar la enfermedad y disminuyen la probabilidad de paso a la cronicidad (De Andrade *et al.*, 1996; Sosa *et al.*, 1998; Schijman *et al.*, 2003)

Tratamiento de los síntomas digestivos: Una vez que la enfermedad ha progresado, no existen fármacos eficaces y el tratamiento tiene como objetivo la reducción de los síntomas. El esófago chagásico puede responder a los nitratos, a la dilatación con balón o, en última instancia, a la miotomía a nivel de la unión gastroesofágica. En ambos casos, el tratamiento es paliativo, con un objetivo de disminuir la presión del esfínter esofágico, mejorar el vaciado esofágico y el alivio de los síntomas, como la disfagia, la odinofagia y el reflujo gastroesofágico (Ahmed, 2008; Campos *et al.*, 2009). El tratamiento del megacolon chagásico es eminentemente quirúrgico (Sousa y Esper, 1985).

Tratamiento de los síntomas cardíacos: La cardiopatía chagásica comparte las indicaciones terapéuticas de otras miocardiopatías de distinto origen. Los pacientes pueden precisar diuréticos para los síntomas congestivos. Está indicado el bloqueo neurohormonal con inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina, bloqueadores beta y antialdosterónicos, en función del grado de afectación y la clase funcional. El trasplante cardíaco es también una opción terapéutica en pacientes con insuficiencia cardíaca refractaria. Al ser muy frecuentes los fenómenos trombóticos y embólicos en los pacientes con enfermedad de Chagas, en algunos casos puede ser útil el uso de fármacos antiplaquetarios o anticoagulantes para la prevención de los accidentes tromboembólicos. El deterioro del sistema de conducción y las bradiarritmias pueden precisar de la implantación de marcapasos. En pacientes con arritmias ventriculares complejas o disfunción sistólica severa puede considerarse el implante de un dispositivo cardioversor-desfibrilador. En caso de arritmias ventriculares frecuentes, el antiarrítmico de elección es la amiodarona y, así mismo, puede considerarse la

ablación por radiofrecuencia del sustrato anatómico. El dolor anginoide debe ser diferenciado del causado por una cardiopatía isquémica asociada y tratarlo en consecuencia. A todos estos pacientes se les debe derivar a un especialista en cardiología y a un centro especializado en enfermedades importadas (Feitosa *et al.*, 2010).

1.7. Epidemiología

La enfermedad de Chagas estuvo originalmente confinada a áreas rurales pobres de América del Sur y Centroamérica en donde el mecanismo de transmisión más común es a través del vector y la enfermedad aguda generalmente ocurre en niños menores de 12 años (Schmunis, 2007). Esta enfermedad está ampliamente distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Chile y Argentina, se presenta en 21 países de Latinoamérica. La WHO estima que esta enfermedad afecta aproximadamente de 7 a 8 millones de personas y que están en riesgo de adquirir la infección 25 millones, con 56 000 nuevos casos anuales y 12 muertes muertes/año. De los individuos infectados aproximadamente un 30% desarrollará alteraciones cardíacas y hasta un 10% pueden desarrollar síntomas digestivos (WHO, 2010).

A causa de las complicaciones y muertes que ocasiona, la enfermedad de Chagas es la parasitosis más importante que aqueja a los países de América Latina. Sin embargo, la enfermedad de Chagas no solo es un problema de salud en América Latina, ya que gracias a la actual afluencia de inmigrantes infectados con *T. cruzi* ha cambiado el patrón epidemiológico, llegando a ser un problema de salud en EE. UU, Canadá y en muchas partes de Europa, así como en Japón y Australia en donde ha incrementado en número de individuos infectados (Rassi *et al.*, 2010).

1.7.1. Epidemiología en México

Estudios seroepidemiológicos han demostrado la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el 20% de las personas mayores de 5 años que viven en áreas rurales y suburbanas al sur del Trópico de Cáncer (Guzmán, 2001).

Las prevalencias más altas de casos reportados por serología son para Oaxaca (28.98%), Querétaro (18.99%), Jalisco (14.23%), Chiapas (12.74%), Nayarit (12.19%), Guerrero (12.16%) y Morelos (11.21%), seguidos por los estados de Hidalgo (8.03%), Puebla (6.14%), Veracruz (5.87%), Sinaloa (5.58%), Zacatecas (5.47%), Tabasco (4.17%), Yucatán (3.58%) y el Distrito Federal (3.09%) siendo este último porcentaje por casos importados. El resto de los estados reportan tasas que van del 0.56% al 2.78% (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2005).

El censo nacional del año 2010 (Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática, 2010) reportó 112.3 millones de personas en México y basado en el porcentaje de seropositividad publicado por Cruz-Reyes y Pickering-López (2006), el estimado de el número de personas afectadas en México es 5.5 millones.

1.8. Respuesta inmune a la infección por *T. cruzi*

La respuesta inmune a la infección por *T. cruzi* es compleja, y los patrones diferenciales de las respuestas pueden ocurrir en distintos compartimentos del sistema inmune, incluyendo la expansión de células, la producción de citocinas, y la muerte celular (Meis *et al.*, 2009).

Cuando se produce la infección por *T. cruzi*, la respuesta inmune innata y adquirida se caracterizan por el reclutamiento de células dendríticas, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y linfocitos B y T, así como la secreción de factores solubles (citocinas y quimiocinas) (Parodi *et al.*, 2009). El reconocimiento del sistema inmune a *Trypanosoma cruzi* depende de la activación de la inmunidad innata y adaptativa, y este parásito es capaz de regular negativamente el sistema inmune a través de la liberación de varias moléculas (Ouaissi *et al.*, 2001; DosReis, 2011). Las alteraciones inmunes relevantes en las infecciones humanas se caracterizan por depresión inmune en la fase aguda y patología autoinmune en la fase crónica (Reed, 1998).

1.8.1. Respuesta inmune innata en la infección por *T. cruzi*

El sistema inmune innato tiene capacidad para discriminar entre los agentes propios y los de patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRP), que son codificados por la línea germinal. Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), y son moléculas conservadas y compartidas por varios microorganismos, incluyendo *T. cruzi*, y son el punto de activación de la respuesta innata y adaptativa (Akira *et al.*, 2006). Varios hallazgos recientes indican que la inmunidad innata controla la activación de la inmunidad adaptativa (Iwasaki y Medzhitov, 2010).

En el control de la infección por *T. cruzi*, las células de la inmunidad innata tiene un papel importante en la supresión de la replicación y propagación del parásito en el tejido del hospedero durante la fase aguda de la infección. Por ejemplo, la inducción de mediadores pro-inflamatorios como interleucina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF)- α y óxido nítrico (NO) son responsables del control de la parasitemia y mortalidad en ratones experimentalmente infectados con *T. cruzi*. En la respuesta inmune a patógenos intracelulares, la IL-12 es un mediador clave de la producción de IFN- γ a través de la inducción del desarrollo de células Th1 y la activación de células NK (Vespa, 1994). El IFN- γ juega un rol clave durante la infección de *Trypanosoma cruzi*, ya que activa a los macrófagos e incrementa la producción de óxido nítrico el cual es citotóxico para la forma intracelular e inhibe su desarrollo (Alvarez *et al.*, 2011).

Los receptores tipo Toll (TLRs) muestran un patrón de expresión diverso en una variedad de células y tejidos, así como diferente localización subcelular, cada TLR reconoce diferentes estructuras químicas que están altamente conservadas en microorganismos y que son denominadas colectivamente como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Ishii, 2008). Entre estos están los lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, y varias proteínas derivadas de bacterias, virus, hongos, protozoos y helmintos. Las vías de señalización activadas por los TLRs tienen un importante rol en la modulación tanto de la respuesta inmune innata como la adquirida (Rodríguez *et al.*, 2012). Se ha visto que los componentes derivados de *T. cruzi* inducen una respuesta inflamatoria y hay evidencias de que varias de estas

moléculas actúan como agonistas de los TLRs induciendo la producción de óxido nítrico (NO) y la secreción de citocinas inflamatorias y quimiocinas por las células de defensa (Campos *et al.*, 2001).

En los últimos diez años, varios estudios han demostrado el reconocimiento de patrones moleculares asociados a *Trypanosoma cruzi* por receptores miembros de la familia TLR lo cual conduce a una respuesta inflamatoria e inducción de diversos mecanismos efectores de la respuesta inmune adaptativa, que culmina con el control del patógeno, aunque no se consigue su eliminación total (Silva *et al.*, 2011).

La primera molécula caracterizada como PAMPs de *T. cruzi* fue la molécula de anclaje de glicoproteínas, el glicosilfosfatidilinositol derivado de tripomastigote (tGPI), el cual es similar a mucina, se distribuye en la membrana de la superficie celular del parásito, y es activador de TLR2 tanto de humano como de ratón (Campos *et al.*, 2001). Este reconocimiento induce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y NO en células de la inmunidad innata (Camargo *et al.*, 1997^a, Camargo *et al.*, 1997^b).

Otro miembro de la familia GPI, purificado a partir de las formas de epimastigotes, es el glicoinositolfosfolípido (eGIPL), cuyos residuos de lípidos (N-lignoceroylsphinganine) inducen la activación la vía NF-κB por medio de TLR4 (Campos *et al.*, 2001). Los anclajes GIPLs son libres y están presentes abundantemente en la superficie de la membrana de todos los estadios del parásito (Almeida y Gazzinelli, 2001, Ouaisi *et al.*, 2002).

Más recientemente se ha demostrado que los ácidos nucleicos derivados de *T. cruzi* también actúan como PAMP, los cuales contienen abundantes motivos de oligodeoxinucleotido CpG no metilados, y el RNA purificado a partir de *T. cruzi* promueve la activación en la célula huésped de la TLR9 y TLR7 respectivamente, estimulando la respuesta de citocinas de los macrófagos y las células dendríticas (Shoda *et al.*, 2001; Caetano *et al.*, 2011).

Se ha visto que TLR2, TLR4 y TLR9 cooperan en la activación de la inmunidad innata en las células del huésped conduciendo a la regulación de la infección parasitaria (Kayama y Takeda, 2010).

En la enfermedad de Chagas no se presenta una respuesta inmunológica polarizada del tipo Th1/Th2, ya que tanto la producción de IFN- γ como de IL-10, que tienen un papel antagónico (protector y deletéreo respectivamente), puede ser simultánea e intensa en diferentes modelos (Reed *et al.*, 1994).

Como se mencionó antes, se ha observado que en el humano la resistencia a la infección es mediante la síntesis de IL-2 y TNF α por macrófagos y células dendríticas, que activan a las células NK para producir IFN- γ y favorecer el desarrollo de linfocitos Th del perfil Th1 (Hunter *et al.*, 1996), *T. cruzi* puede promover la producción de IL-10 por las células dendríticas lo que permite su persistencia (Alba *et al.*, 2010).

El TGF- β es un mediador de la susceptibilidad a la enfermedad en la infección por *T. cruzi*, TGF- β puede tener un potente efecto inmunosupresor sobre las funciones efectoras de las células T incluyendo proliferación y producción de citocinas (Araujo-Jorge *et al.*, 2012).

La IL-10 es otro candidato mediador de la inhibición de la activación de macrófagos, con lo cual la IL-10 podría jugar un papel importante en la virulencia de *T. cruzi*. La IL-10 es un potente inhibidor de la producción de IFN- γ el cual media la muerte de los parásitos a través de las células T así como de células NK. Por lo tanto, IL-10 media la susceptibilidad a la enfermedad en la fase aguda de la enfermedad a través de la disminución en la producción de IFN- γ así como de IL-12, que es necesaria en pequeñas cantidades para el desarrollo de la respuesta protectora Th1, sin embargo el exceso en la producción de esta citocina está asociada con el incremento en la producción de IL-10 (Reed, 1998).

El mecanismo clásico propuesto que ocurre en la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, involucra la activación de la síntesis de IL-12 por los macrófagos, lo cual

provoca la síntesis de IFN- γ por las células NK que a su vez aumenta la IL-2 y la síntesis de TNF α , así como la producción de NO por macrófagos y monocitos que contribuyen la eliminación del parásito (Camargo et al., 1997). Las células NK están asociadas más con la respuesta aguda tardía siendo una fuente importante de IFN- γ antes del desarrollo de la inmunidad medida por células T (Sathler-Avelar et al., 2003).

1.8.2. Respuesta inmune adquirida

1.8.2.1 Respuesta inmune celular

A pesar de la pronta respuesta protectora ejercida por las células NK y macrófagos, diversos estudios han mostrado la necesidad de las células TCD4⁺ y TCD8⁺ en el control de la parasitemia y en la sobrevivencia de la infección aguda (Tarleton, 1995).

Los linfocitos T CD4⁺ participan en el control de *T. cruzi* a través de la secreción de citocinas tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ), y pueden estimular la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, los cuales aparecerán como la protección sistémica central contra la infección de *T. cruzi* (Padilla et al., 2009; Parodi et al., 2009). La actividad de las células CD4⁺ amplifica la actividad fagocítica de macrófagos, estimula la proliferación de células B y por lo tanto de anticuerpos así como el incremento en la respuesta de las células T CD8⁺ (Brener y Gazzinell, 1997). La polarización de la respuesta inmune en Th1/Th2 en función de los patrones de citocinas que producen las células CD4⁺ es una característica importante de la infección crónica, la cual parece resultar en el antagonismo ejercido por el IFN- γ e IL-10 (Mosmann TR y Sad, 1996).

Las células T CD8⁺ contribuyen al control de *T. cruzi*, actuando indirectamente mediante la secreción de IFN- γ para activar macrófagos y directamente a través de la producción de perforina y su concomitante actividad citotóxica (de Alencar et al., 2009). La función de este grupo de células no se restringe a la fase aguda de la infección, ya que se ha visto que la carencia de estas en la fase crónica resulta en el incremento de la carga parasitaria y quizás paradójicamente en el incremento de la inflamación (Martin y Tarleton, 2004).

Hay un consenso cada vez mayor de que la respuesta inmune protectora contra *T. cruzi* requiere la activación de células T CD8⁺, mientras que los anticuerpos pueden jugar un rol secundario (Dumonteil y Quijano-Hernández, 2011).

1.8.2.2 Respuesta inmune humoral

La fase aguda de la enfermedad de Chagas se caracteriza por una activación policlonal de células B, con un incremento notorio de todos los subtipos de inmunoglobulinas. Se ha observado en el modelo murino que hay una activación preferente de los isotipos IgG2a e IgG2b (-Ortiz *et al.*, 1980; Ortiz D'Imperio-Lima *et al.*, 1985; Minoprio *et al.*, 1986; García *et al.*, 1997).

En las respuestas antiparasitarias inespecíficas intervienen todas las subclases de isotipos, las respuestas inespecíficas, principalmente las correspondientes a autoanticuerpos naturales, se limitan a la subclase IgG2a (Spinella *et al.*, 1992; Minoprio *et al.*, 1988).

No se conoce el papel de la respuesta inespecífica, pero se cree que la activación policlonal de células B podría contribuir a la inmunosupresión inicial que acompaña a la fase aguda de la infección. Los principales mecanismos del sistema inmune para el control del parásito son a través de la activación de macrófagos y anticuerpos anti-*T. cruzi*. Los anticuerpos no solo están involucrados en la resistencia a la infección por *T. cruzi* mediante el proceso de opsonización si no a través de la destrucción inducida por el complemento (Kierszenbaum y Howard, 1976; Krettli y Brener, 1976; Almeida *et al.*, 1991).

La producción de diferentes subclases de isotipos de IgG se regula por distintas citocinas. Las citocinas Th1 como IFN- γ es responsable de la producción de IgG2, las citocinas Th2 como IL-4 e IL-10 estimulan la producción de IgG1 e IgG3 (Brière *et al.*, 1994; Kawano y Yata, 1994). La IgG1 media la lisis por la unión con la proteína C1q del

complemento y fagocitosis del macrófago y la IgG2 media la inmunidad por células efectoras no fagocíticas (Fanger y Guyre, 1991).

No se ha logrado esclarecer si realmente existe una correlación entre las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas y los niveles de subclases de isotipos IgG.

1.9. Desarrollo de vacunas contra la enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi presenta un gran número de determinantes antigénicos al sistema inmune del hospedero mamífero durante el transcurso de la infección, y su reconocimiento varía dependiendo de la fase de la enfermedad (Frash *et al.*, 1989; Umezawa *et al.*, 1996). En el hospedero se induce una respuesta inmune tanto humoral como celular que reduce los niveles de parasitemia, pero no se elimina por completo el parásito (Tanowitz *et al.*, 1992).

En los últimos años varios estudios se han centrado en el desarrollo de una vacuna eficaz para el control de la infección por *T. cruzi*; en la búsqueda de este objetivo se han identificado antígenos, rutas de inmunización, adyuvantes y mecanismos inmunológicos capaces de conferir cierta protección contra la infección por *T. cruzi* (; Planelles *et al.*, 2001; Bhatia y Garg, 2002; Garg y Tarleton, 2002; Fralish y Tarleton, 2003; Morell *et al.*, 2006).

Una gama amplia de formulaciones de vacunas han sido evaluadas a lo largo de los últimos años, estos van desde parásitos completos, proteínas purificadas o recombinantes, vectores virales y vacunas de ADN (Tabla 1, 2, 3 y 4). Hay dos estadios del parásito contra los cuales se ha enfocado el desarrollo de una vacuna efectiva. Las vacunas contra tripomastigotes, que son los que infectan a la célula huésped después de la picadura de un triatomino infectado o después de ser liberados de una célula infectada, podrían impedir el inicio y/o la persistencia de la infección y limitar la parasitemia. Las vacunas contra amastigotes intracelulares replicativos

podrían detener la propagación de parásitos en el hospedero y prevenir la liberación de los parásitos al torrente sanguíneo. Ambos tipos de vacunas podrían arrestar o atenuar el desarrollo de la enfermedad en los seres humanos y en otros mamíferos reservorios. Además, las vacunas contra cualquiera de estas etapas del parásito podrían prevenir la infección por triatomíneos y, por tanto, interrumpir o reducir la transmisión del parásito tanto en poblaciones humanas y en los reservorios, así como en los insectos (Vázquez-Chagoyan, 2011).

Con el uso de parásitos muertos de *T. cruzi* se observó que se producía una protección modesta contra la infección (Basombrio, 1990). Por otro lado los parásitos vivos atenuados son más inmunogénicos y en los resultados obtenidos se encontró que eran capaces de conferir protección significativa (Basombrio y Besuschio, 1982).

Se han hecho intentos de generación de una vacuna más definida y específica al inmunizar ratones con proteínas purificadas a partir de cultivos del parásito, estas proteínas incluyen cruzipaina, la proteína de la varilla paraflagelar o antígenos secretados-excretados de tripomastigotes (Taibi *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1996). El resultado de estas vacunas es dependiente de la formulación utilizada y el tipo de respuesta inmune inducida. Por ejemplo en la inmunización con cruzipaina administrada con Alum o adyuvante de Freund produce una respuesta inmune sesgada hacia el tipo Th2 con niveles altos de anticuerpos, esta respuesta no es protectora. Por otra parte, el mismo antígeno administrado con oligonucleótidos CpG induce una respuesta inmune de tipo Th1 con niveles elevados en la producción de IFN- γ , lo que protege a ratones contra la infección mediante la reducción de la parasitemia y el aumento de la sobrevivencia (Frank *et al.*, 2003). Los trabajos más recientes se están basando en el uso de proteínas recombinantes, y han sido ampliamente evaluadas, algunos de los antígenos más prometedores examinados incluyen a la cruzipaina, una glicoproteína llamada GP82, y varias proteínas de la superfamilia de las trans-sialidasas como ASP-2 y TS se ha obtenido que todos pueden proporcionar una protección significativa en una variedad de modelos de ratón cuando se administran con los oligonucleótidos CpG como adyuvantes (Tabla 1). De lo anterior se vio la necesidad de inducir una fuerte respuesta inmune celular con activación de células CD8⁺ y actividad citotóxica en lugar

de una respuesta de anticuerpos para el control de la infección de *T. cruzi* (Domunteil y Quijano-Hernández, 2011).

Varios de estos antígenos se han formulado como vacunas de vectores virales recombinantes, así como vacunas de ADN ya que estas pueden ser más eficaces que las proteínas recombinante en la inducción de una respuesta inmune de tipo Th1 con células CD8⁺ citotóxicas (Martin *et al.*, 2006; Crampton y Vanniasinkam, 2007), (Tablas 2 y 3). Se ha evaluado una vacuna llamada Sendai y vectores de adenovirus, estos expresan varios de los antígenos mencionados, incluyendo ASP-2 y proteínas TS de la superfamilia de las trans-sialidasas y se vio que son capaces de inducir una respuesta fuerte de IFN- γ , así como la activación de las células T CD8⁺ citotóxicas, lo que llevó a una significativa protección contra la infección observada por una disminución de la parasitemia y aumento de la supervivencia de los ratones. La protección que se obtiene es a menudo mejor que la que se obtiene con la inmunización de la proteína recombinante correspondiente, lo cual refuerza de la idea de que el tipo de vacuna es clave para lograr la respuesta inmune deseada. Además, las estrategias de inmunización combinada de ADN seguido por la proteína recombinante o vectores virales, también han sido evaluados y pueden mejorar aún más la protección (Domunteil y Quijano-Hernández, 2011). Nuevos vectores virales recombinantes se han descrito recientemente, tales como el virus de la fiebre amarilla expresando ASP-2 (Nogueira *et al.*, 2011), y el virus de la influenza que expresa un único epítipo dominante CD8⁺ (Takayama *et al.*, 2010), proporcionando alternativas adicionales para la inmunización. Se ha observado que la inmunización con una vacuna de adenovirus que expresan este epítipo es suficiente para inducir protección, destacando el papel central de la población de células T en el control del parásito (Miyahira *et al.*, 2005). Epítopos altamente inmunodominantes CD8⁺ se han identificado en la familia de proteínas trans-sialidasas y esta es la razón por qué la mayoría de los estudios de vacunas se han centrado en antígenos de esta familia (Haolla *et al.*, 2009).

Una variedad limitada de antígenos de *T. cruzi* han sido evaluados hasta ahora, y es por ello que ahora algunas las investigaciones se han centrado en la identificación

de nuevos antígenos. Así, por ejemplo, los antígenos TcG1, TcG2 y TcG4, correspondientes a una proteína ribosomal putativa y proteínas hipotéticas, respectivamente. Recientemente se ha encontrado que la inmunización con vacunas de ADN que codifican los tres antígenos seguidos por la proteína recombinante es capaz de inducir anticuerpos líticos, células T CD8⁺ y respuestas de citocinas que protegen a los ratones en la parasitemia aguda y del daño a tejido cardíaco en la fase crónica (Bhatia y Garg, 2008; Gupta y Garg, 2010).

Por otro lado la inmunización con cDNA de una biblioteca de tripomastigotes y la posterior selección de las clonas que favorecen la protección, han sido utilizados para identificar una serie de nuevos antígenos que sean capaces de conferir aumento de la supervivencia después del reto infeccioso (Tekiel *et al.*, 2009). Del mismo modo, una nueva familia de proteínas de superficie se ha identificado recientemente y parece ser específica para *T. cruzi* (García *et al.*, 2010). Estos estudios por lo tanto pueden llevar a la identificación de proteínas que funcionen como antígenos con un potencial prometedor como nuevos candidatos a vacuna.

Los estudios mencionados anteriormente apoyan la viabilidad de una vacuna preventiva contra *T. cruzi*, pero también se ha visto que las vacunas terapéuticas pueden controlar una infección en curso de *T. cruzi* (tabla 4). De hecho la administración de vacunas de DNA que codifican un antígeno de la superfamilia transialidasas (TSA-1) o el antígeno secretado Tc24 (Ovaissi *et al.*, 1992), seguido de la infección con *T. cruzi* es capaz de reducir la parasitemia y la reacción inflamatoria cardíaca, así como incrementar la sobrevivencia de ratones tratados (Dumonteil *et al.*, 2004). Similarmente la inmunoterapia con la proteína recombinante SA85-1.1 de la superfamilia de las transialidasas ha permitido reducir la parasitemia y el daño al tejido cardíaco (Duthie *et al.*, 2007). Es importante mencionar que no se observa exacerbación de la enfermedad a pesar de la activación significativa de la respuesta inmune después de la administración de la vacuna. De acuerdo con los datos mencionados anteriormente sobre las vacunas preventivas, la eficacia de las vacunas terapéuticas parece basarse en la reorientación de la respuesta inmune hacia el tipo Th1, con la producción de IFN γ y la activación de células T CD8⁺ (Zapata-Estrella *et al.*, 2006; Limon-Flores *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos resultados

prometedores en modelos de ratones, algunos de estas candidatos a vacunas se han evaluado en perros que son considerados un excelente modelo animal, pues presenta una progresión de la enfermedad más similar a la que se presenta de humanos que el modelo murino (Barr *et al.*, 1991; Guedes *et al.*, 2002; Cruz-Chan *et al.*, 2009). En este modelo se ha probado la administración de dos dosis de vacunas de DNA que codifican TSA-1 y Tc24 durante la fase aguda de la infección, observándose una disminución en la severidad de las arritmias cardiacas, reducción de la densidad de nidos de amastigotes y mortalidad cuando son usadas como vacunas preventivas enfatizando el potencial de esta formulación (Quijano-Hernández, 2008).

Tabla 1. Subunidades de vacunas de proteínas contra *Trypanosoma cruzi*.

Proteínas	Adyuvante (si fue usado)	Modelo experimental Ratón (<i>T. cruzi</i>) cepa	% sobrevivencia	Referencia
GP90	Saponina	CBA, Tití, (Y)	60 (100)c	Scott et al. (1985)
GP82	Alum o CpG-ODN	Balb/c (CL)	No determinado o 20%	Eickhoff et al. (2010) and Santori et al. (1996)
GP56	Adyuvante de Freund	Swiss-Webster (Y)	Swiss-Webster (Y)	Harth et al. (1994)
Cruzipaina b	IL-12, CpG-ODN	C3H/HeN (RA), Balb/c (Tulahuen)	67–80 (60–100)c	Frank et al. (2003), Laderach et al. (1996) and Schnapp et al. (2002)
PFR1, PFR2b	Alum, Freund, IL-12	C57BL/6, Balb/c (Peru)	83–100 (30–60)c	Luhrs et al. (2003), Miller et al. (1996), Wrightsman et al. (2002) and Wrightsman
TC52	Alum, Bordtella pertusis	Balb/c (Y)	62 (120)c	Ouaissi et al. (2002)
CRP	Adyuvante de Freund	Balb/c (Y)	10 (40)c	Sepulveda et al. (2000)
ASP2	Alum, CpG-ODN	A/Sn (Y)	53 (60)d	Araujo et al. (2005)
TS	CpG-ODN	Balb/c (Tul)	100 (84), 80 (48)d	Giddings et al. (2010) and Hoft et al. (2007)
TS mutante	Adyuvante de Freund	Balb/c (Tul)	100 (60)c	Fontanella et al. (2008)
TcSP (dominio R)	Adyuvante de Freund	Balb/c(H8)	100%d	Salgado-jiménez et al. (2012)
TcSP2 TcSP2-CHP Y TcSP2-ATP	Titer-Max®	Balb/c (H8) Balb/c (H8)	100d 75d	Carabarin-Lima et al., (2011)

NOTA:

A: En estos animales experimentales se observó la supervivencia durante n días después de la infección.

b: Estos antígenos mostraron proporcionar diferente grado de protección en diferentes cepas de ratón (los datos presentados son del modelo animal que exhibe mejor protección).

c-e: En la infección de prueba, los animales inmunizados mostraron muy baja ($\leq 10\%$)^c, moderada ($\sim 50\%$)^d o similar parasitemia^e como la detectada en animales no inmunizados/infectados (datos presentados son a partir de animales que mostraron mejor protección).

F: La inmunización con estos antígenos fue eficaz en la disminución de la gravedad de la enfermedad crónica. Se evaluó por análisis histopatológico de biopsias de tejidos cardiacos.

Es de interés que los mismos antígenos y formulaciones de vacunas puedan ser utilizados tanto para la prevención de la enfermedad de Chagas, así como para la terapia de una infección en curso, haciendo de esto una herramienta muy flexible para el control de la enfermedad. Los resultados obtenidos en estos estudios por lo tanto dan pruebas fuertes y abundantes de la viabilidad de las vacunas tanto preventivas como terapéuticas para el control de la infección por *T. cruzi*. En la mayoría de los casos antes mencionados se han trabajado con antígenos de superficie del parásito, sin embargo, hasta el momento la inmunidad conferida por los antígenos usados no ha sido capaz de prevenir la infección y en muchos casos no se genera una alta sobrevivencia en los animales inmunizados cuando son infectados, no obstante sus resultados si han establecido su potencial inmunogénico, sugiriendo la utilidad de los antígenos de superficie como vacunas para el control de la infección y la enfermedad. Las vacunas que se analizan en las tablas 1, 2,3 y 4 y los intentos recientes de generar una nueva y adecuada vacuna contra la enfermedad de Chagas, se desarrollaron sobre la base de los métodos tradicionales de vacunología, que se basan en la detección empírica de algunos candidatos, sobre la base de las características conocidas del patógeno. La vacunología en la era de la genómica está aprovechando las nuevas tecnologías para hacer frente a las enfermedades para las que el desarrollo de vacunas ha sido hasta ahora infructuosos (Seib *et al.*, 2012).

Los continuos avances en las tecnologías de secuenciación del genoma y bioinformática permiten ahora que en las investigaciones se pueda explorar el “libro de vida” de los microorganismos, su genoma, para la identificación de nuevos antígenos. El genoma de los microorganismos contiene el repertorio completo de posibles antígenos y son usados como el punto de inicio para capturar la información para el desarrollo de vacunas. Este proceso es llamado como “Vacunología reversa” (Rappuoli, 2000). La idea original de vacunología reversa es empezar con un escaneo *in silico* de la totalidad del genoma de un patógeno e identificar los genes que codifican proteínas con los atributos de una buena vacuna, por ejemplo se pueden elegir proteínas que estén expuestas en la superficie, que sean secretadas, que sean conservadas entre las diferentes cepas, pero no en el huésped, que sean abundantes o en el caso de parásitos según el estadio en que se expresen, y que presenten en su secuencia

epítopos para linfocitos B y T. Los candidatos seleccionados se puede expresar como proteínas recombinantes y con ello iniciar las pruebas correspondientes *in vitro* o en modelos *in vivo* para evaluar la inmunogenicidad y la protección (Seib, 2012).

Tabla 2. Subunidades de vacunas de DNA contra *Trypanosoma cruzi*.

DNA	Adyuvante (si fue usado)	Modelo experimental Ratón (<i>T. cruzi</i>) cepa	% sobrevivencia	Referencia
CRP		C3H/HeJ, Balb/c (Y)	100 (40)c	Sepulveda <i>et al.</i> (2000)
TSA1b	IL-12 + GM-CSF	BALB/c, C3H/HeSnJ, C57BL/6 (Brazil)	60 (140)d	Garg and Tarleton (2002) and Wizel <i>et al.</i> (1998)
ASP1b	IL-12 + GM-CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6 (Brazil)	<60 (140)d	Garg and Tarleton (2002)
ASP2b	IL-12 +GM-CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6(Brazil)	80 (140)c,f	Garg y Tarleton (2002)
TcSP (Dominio R)		Balb/c (H8)		Salgado-Jiménez <i>et al.</i> (2012)
TcSSP4		Balb/c(Y)	64 d	Arce-Fonseca <i>et al.</i> , (2005)
ASP2		Balb/c (Y)	63 (60)d,f	Vasconcelos <i>et al.</i> (2004)
ASP9		Balb/c (Y)	100 (60)c	Boscardin <i>et al.</i> (2003)
ASP-3		A/Sn (Col)	80 (120)c	Silveira <i>et al.</i> (2008)
TSA1 CTL epítipo		C57BL/6 (Tul)	60 (60)c	Chou <i>et al.</i> (2008)
TSb		Balb/c (Y)	100 (50)c,f	Costa <i>et al.</i> (1998)
TSSAb	IL-12, RANK-L, IL-15	BALB/c, C3H/HeJ, C57BL/6, B6 (Tulahuen)	80–100 (40)c	Katae <i>et al.</i> (2002) Miyahira <i>et al.</i> (2003) and Eickhoff <i>et al.</i> (2011)
KMP11	HSP-70	Balb/c (Y)	50 (70)c	Planelles <i>et al.</i> (2001)
LYT1	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)	80 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
FCaBP	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)	80 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
TCb3	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)		Fralish and Tarleton (2003)
PFR2 or PFR3	HSP70	Balb/c (Y)	100 (35)c,f	Morell <i>et al.</i> (2006)
TcG1	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		Bhatia <i>et al.</i> (2004) and Bhatia and Garg (2008)
TcG2	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		Bhatia <i>et al.</i> (2004) and

Continuación tabla 2

				Bhatia and Garg (2008)
TcG4	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		Bhatia <i>et al.</i> (2004) and Bhatia and Garg (2008)
TcG1 + TcG2 + TcG	IL-12 + GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		Bhatia <i>et al.</i> (2004) and Bhatia and Garg (2008)
ASP2 + TSA1	None	A/Sn (Y)	86 (60)c,f	Vasconcelos <i>et al.</i> (2004)
ASP1 + ASP2 + TSA1	IL-12 + GM-CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6 (Brazil)	83 (140)c	Garg and Tarleton (2002)
Familia TS		C57BL/6 (Brazil)	75 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
Familia mucinas		C57BL/6 (Brazil)	25 (75)	Fralish and Tarleton (2003)
pELI-TcT-E library		C3H/HeN (RA)	80 (50)c	Tekiel <i>et al.</i> (2009)

NOTA:

a: En estos animales experimentales se observó la supervivencia durante n días después de la infección.

b: Estos antígenos mostraron proporcionar diferente grado de protección en diferentes cepas de ratón (los datos presentados son del modelo animal que exhibe mejor protección).

c-e: En la infección de prueba, los animales inmunizados mostraron muy baja ($\leq 10\%$)^c, moderada ($\sim 50\%$)^d o similar parasitemia^e como la detectada en animales no inmunizados/infectados (datos presentados son a partir de animales que mostraron mejor protección).

F: La inmunización con estos antígenos fue eficaz en la disminución de la gravedad de la enfermedad crónica. Se evaluó por análisis histopatológico de biopsias de tejidos cardiacos.

Tabla 3. Subunidades de vacunas de virus recombinantes contra *Trypanosoma cruzi*.

Vacunas de Virus recombinantes	Modelo experimental Ratón (<i>T. cruzi</i>) cepa	% de supervivencia	Referencia
Ad-TSSA/MVA-TSSA MVA-RANK-L	C57BL/6 (Tulahuen)	100 (50)c	Miyahira <i>et al.</i> (2005)
rAD-ASP2	Balb/c (Y)	80 (160)c	Machado <i>et al.</i> (2006)
rAD-TS	Balb/c (Y)	50 (160)d	Machado <i>et al.</i> (2006)
rSeV-ASP2	C57BL/6 (Tul)	90 (50)d	Duan <i>et al.</i> (2009)
rADASP2 þ rAD-TS	Balb/c (Y)	100 (160)c	Machado <i>et al.</i> (2006)

NOTA:

A: En estos animales experimentales se observó la supervivencia durante n días después de la infección.

b: Estos antígenos mostraron proporcionar diferente grado de protección en diferentes cepas de ratón (los datos presentados son del modelo animal que exhibe mejor protección).

c-e : En la infección de prueba, los animales inmunizados mostraron muy baja ($\leq 10\%$)^c, moderada ($\sim 50\%$)^d o similar parasitemia^e como la detectada en animales no inmunizados/infectados (datos presentados son a partir de animales que mostraron mejor protección)

F: La inmunización con estos antígenos fue eficaz en la disminución de la gravedad de la enfermedad crónica. Se evaluó por análisis histopatológico de biopsias de tejidos cardiacos.

Tabla 4. Subunidades de vacunas de DNA inmunoterapéuticas contra *Trypanosoma cruzi*.

Vacunas de DNA inmunoterapéuticas	Modelo experimental Ratón (<i>T. cruzi</i>) cepa	% sobrevivencia	Referencia
TSA1b	Balb/c (H4), modelo agudo	70 (45) ^{c,f}	Dumonteil <i>et al.</i> (2004)
TSA1	CD1 (H1) modelo crónico	100 (140) ^f	Dumonteil <i>et al.</i> (2004)
TSA1	ICR (H1) modelo agudo	70 (50) ^{c,f}	Sanchez-Burgos <i>et al.</i> (2007) Zapata-Estrella <i>et al.</i> (2006)
Tc24b	Balb/c, ICR (H1) modelo agudo	100 (50) ^{c,f}	Dumonteil <i>et al.</i> (2004) Sanchez-Burgos <i>et al.</i> (2007)
TS	ICR (H1) modelo agudo	50 (50) ^c	Sanchez-Burgos <i>et al.</i> (2007)
Tc52	ICR (H1) modelo agudo	75 (50) ^c	Sanchez-Burgos <i>et al.</i> (2007)
ASP9		50 (50) ^c	Sanchez-Burgos <i>et al.</i> (2007)
TSA1 + Tc24	C57BL/6, Balb/c, ICR (H1)	80 (180) ^c	Limon-Flores <i>et al.</i> (2010)
SA85-1.1	C57BL/6 (CL)	Dosis subletal (90) ^{d,f}	Duthie <i>et al.</i> (2007)

NOTA:

A: En estos animales experimentales se observó la supervivencia durante n días después de la infección.

b: Estos antígenos mostraron proporcionar diferente grado de protección en diferentes cepas de ratón (los datos presentados son del modelo animal que exhibe mejor protección).

c-e: En la infección de prueba, los animales inmunizados mostraron muy baja ($\leq 10\%$)^c, moderada ($\sim 50\%$)^d o similar parasitemia como la detectada en animales no inmunizados/infectados (datos presentados son a partir de animales que mostraron mejor protección).

f: La inmunización con estos antígenos fue eficaz en la disminución de la gravedad de la enfermedad crónica. Se evaluó por análisis histopatológico de biopsias de tejidos cardíacos.

2. Proteínas membranales

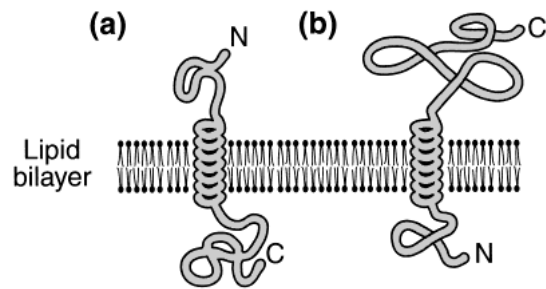
Las membranas celulares son cruciales para la vida de una célula. Una célula está delimitada por la membrana plasmática, la cual define sus límites y mantiene las diferencias esenciales entre el citosol y el medio ambiente extracelular. Dentro de la célula hay varios orgánulos tales como el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias, y otros constituidos de membranas. Las características diferenciales entre el contenido del citosol y cada uno de estos orgánulos son mantenidas por sus

respectivas membranas. Aunque la estructura básica de las membranas biológicas es proporcionada por la bicapa lipídica, la mayor parte de las funciones específicas se llevan a cabo por proteínas de la membrana. Las proteínas de membrana se componen de proteínas transmembranales y proteínas de anclaje a la membrana (Alberts *et al.*, 1994).

La forma en que una proteína está unida a la membrana o cómo se asocia con la bicapa lipídica por lo general refleja la función de la proteína. Además las diferentes ubicaciones en las membranas celulares hacen que tengan diferentes funciones biológicas. Las proteínas de membrana se clasifican según dos esquemas diferentes: uno en función del modo en que interactúan con las membranas, y el otro basado en su localización celular (Kuo-Cheu y Elrod, 1999).

1. Proteínas de membrana Tipo I: son proteínas transmembranales de paso único, tienen un dominio N-terminal extracelular (o luminal) y el C-terminal citoplásmico (Fig. 1a).
2. Proteínas de membrana Tipo II: También son proteínas transmembranales de paso único pero en estas el extremo N-terminal es citoplásmico y el C-terminal es extracelular. (Fig. 1b).
3. Proteínas transmembranales multipaso: En este tipo de proteínas la proteína atraviesa la bicapa lipídica varias veces (Fig. 2a). Se cree que la mayor parte de los segmentos que atraviesan la membrana tiene una conformación alfa-helicoidal.
4. Proteínas de membrana ancladas por una cadena de lípidos (Fig. 2b) ver la explicación más adelante.
5. Proteínas de membrana ancladas mediante GPI (Fig. 2c). Tanto las cadenas ancladas por lípidos y GPI, se llaman proteínas ancladas a la membrana. Sin embargo, las primeras se asocian con la bicapa covalentemente por medio de un ácido graso, mientras que las segundas están asociadas a la membrana por anclaje a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI).
6. Proteínas periféricas de membrana: (Fig. 2d). Estas proteínas están unidas a la membrana indirectamente por interacciones no covalentes con otras proteínas de membrana.

Extracellular or Luminal



Cytoplasmic

Fig. 1. Visión esquemática de las proteínas transmembranales tipo I (a) y tipo II (b).

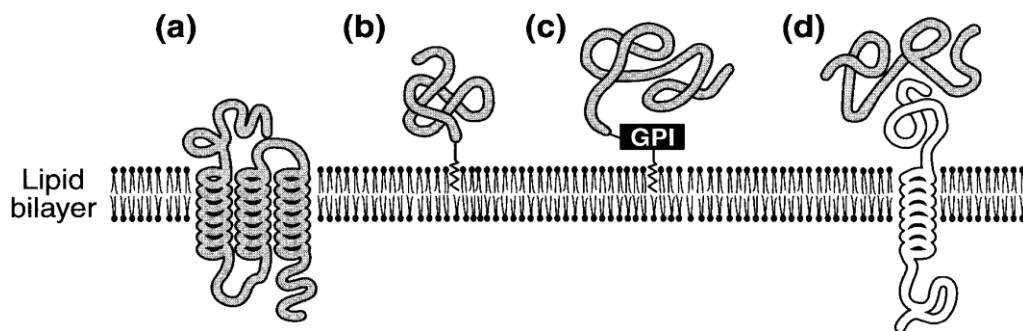


Fig. 2. Visión esquemática de las proteínas multipaso (a), proteínas con anclaje de lípidos (b), proteínas con anclaje GPI (c) y proteínas de membrana periféricas (d).

3. Familia de proteínas cinasas

Las proteínas cinasas son una gran familia de enzimas que median la respuesta de células eucariotas a estímulos externos. El número de proteínas descritas recientemente como pertenecientes a esta familia crece exponencialmente gracias a las técnicas de clonación y secuenciación. Este tipo de proteínas poseen residuos de amino ácidos característicos que están altamente conservados, los cuales comprenden el llamado “dominio catalítico” (Hanks *et al.*, 1988).

Las cinasas son enzimas que regulan el estado de fosforilación de proteínas intracelulares. Estas proteínas se caracterizan porque unen covalentemente un grupo fosfato, a partir de un ATP donador, a residuos de serina, treonina y/o tirosina, de sus

sustratos. La reacción de fosfotransferencia requiere la presencia de tres sitios específicos: un sitio de unión de ATP, un dominio que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP, y un sitio para la unión del sustrato (Hubbard y Cohen, 1993). El proyecto del genoma

humano ha permitido la identificación de 520 proteínas quinasas que constituyen lo que se denomina como el «kinoma» humano (1). De las 520 proteínas cinasas identificadas, 90 son tirosina cinasas, 43 son tirosina cinasas-like y el resto, son serina/treonina cinasas (Chlessinger, 2000). Las tirosina cinasas se dividen generalmente en dos grupos: tirosina cinasas que funcionan como receptores (RTKs) y tirosina cinasas no-receptores (no-RTKs). Las primeras, son proteínas transmembrana que contienen un dominio extracelular por el que se unen a diferentes ligandos, y un dominio intracelular, con actividad tirosina cinasa (Hubbard y Till, 2000). Las tirosina cinasas que no son receptores de membrana, son proteínas intracelulares que funcionan por debajo de las RTK en rutas de transducción de señales. La actividad tirosina cinasa de RTKs, se inicia por la unión de un ligando y subsiguiente dimerización del receptor. Como consecuencia, el dominio catalítico intracelular del receptor activado se autofosforila en residuos de tirosina. Estos residuos de tirosina, forman sitios de unión para proteínas que contienen dominios SH2, que junto con otras proteínas asociadas, transmiten la señal hacia el interior celular, a través de tirosina cinasas no receptoras, o de serina/treonina proteína cinasas. La cascada de sucesos de fosforilación resulta en amplificación y transmisión intracelular de la señal. Las proteínas cinasas poseen una amplia variedad de sustratos, tales como proteínas estructurales, enzimas metabólicas, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, etc. Por ello, las rutas de transducción de señales juegan un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la proliferación celular, la diferenciación celular, la supervivencia, la migración o la angiogénesis (Pawson, 2004).

3.1 Kinoma de *Trypanosoma cruzi*

Las proteínas cinasas representan blancos para fármacos en varias enfermedades humanas y animales. Con la secuenciación del genoma de tres

protozoos tripanosomatidos causantes de infecciones en humanos, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi*, se ha logrado definir el kinoma para cada uno de estos parásitos, reportándose 179, 156 y 171 proteínas cinasas respectivamente que pueden ser catalíticamente activas, así como 17, 20 y 19 genes de proteínas cinasas atípicas (El-Sayed *et al.*, 2005). El kinoma de los trypanosomátidos difiere en numerosas formas del hospedero humano. El kinoma de los tres trypanosomátidos fue clasificado dentro de los principales grupos de proteínas cinasas de eucariontes (basándose en la similitud de secuencias y los dominios catalíticos: AGC, CAMK, CMGC, TK, TKL, STE, etc) (Manning *et al.*, 2002). También hay muchas ePKs de trypanosomátidos que no muestran una fuerte similitud con ninguna de las familias ePK reconocidas, lo que sugiere que estas enzimas difieren en estructura y función de ePKs mamíferos y podrían ser posibles blancos farmacológicos o incluso antígenos para vacunas (Naula *et al.*, 2005).

4. Proteínas con secuencias de aminoácidos repetidos en tándem

Las proteínas con aminoácidos repetidos en tándem están ampliamente distribuidas en todos los organismos, y han sido observadas en grupos tan distantes como virus y humanos. Estas proteínas presentan diferencias estructurales y biológicas; han sido descritas como proteínas con motivos de dedos de Zinc, repetidos WD40, repetidos armadillo, repetidos HEATS y repetidos ricos en leucina, etc. (Andrade *et al.*, 2001; Kloss *et al.*, 2008). Las secuencias de repetidos son relativamente comunes, y se encuentran en al menos el 14% de todas las proteínas (Marcotte *et al.*, 1999).

Las proteínas que contienen regiones de aminoácidos repetidos en tándem han sido descritas en diferentes microorganismos patógenos incluyendo los agentes de la tripanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*), malaria (*Plasmodium* spp.), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) y leishmaniasis (*Leishmania* spp.) (Ibañez *et al.*, 1988; Schofiel, 1991; Buscaglia *et al.*, 1999). Están presentes en muchos de sus antígenos inmunodominantes, su función es poco conocida y se ha sugerido que están implicados en la unión a receptores de las células del hospedero y a la activación de

linfocitos B, por lo que la respuesta de anticuerpos hacia estos dominios de repetidos se ha estudiado ampliamente (Vos et al., 2000).

Poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que conducen a la inmunodominancia de las secuencias repetidas, a excepción de su polivalencia que puede hacer que se activen directamente las células B y se comporten en algunos casos como antígenos T-independientes (Schofiel, 1991).

4.1. Proteínas con secuencias de repetidos en tandem en *Trypanosoma cruzi*

En *T. cruzi* cerca del 50% del genoma son secuencias de DNA repetidas, las cuales incluyen secuencias que codifican para proteínas de superficie, retrotransposones y repetidos subteloméricos (El-Sayed et al., 2005). Varios antígenos de *T. cruzi* contienen motivos de amino ácidos repetidos en tándem; estos han sido identificadas sistemáticamente por escaneo inmunológico de librerías de cDNA y usando anticuerpos de individuos infectados. El 25 % de las secuencias detectadas contienen motivos de repetidos en tándem compuestos de 5-68 aminoácidos. Así en *T. cruzi* las proteínas con repetidos corresponden al 2% de los ORFs, y estas proteínas son reconocidas con mayor efectividad por anticuerpos que las proteínas sin repetidos (Ibanez et al., 1988; Hoft et al., 1989; Levin et al., 1989). Como ya se había mencionado anteriormente, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que conducen a la inmunodominancia de las secuencias repetidas, y aun es mas limitado el conocimiento acerca de la respuesta hacia estos epítomos por las células T. En algunos estudios se ha reportado que algunos antígenos con repetidos de *T. cruzi* inducen una respuesta inmunológica dependiente de linfocitos T (Álvarez et al, 2004; Abel et al, 2005; Pereira et al, 2005). Lo anterior sugiere un papel cooperativo de las células T en la generación de inmunodominancia de los epítomos con repetidos en antígenos de *T. cruzi*. No obstante la alta inmunogenicidad de las proteínas con repetidos en tándem observada en la interacción *T. cruzi*-hospedero es conocida, también se sugiere que las regiones repetitivas de estas proteínas podrían actuar como señuelo para desviar la respuesta inmune de regiones funcionales (Frasch, 1994).

Como se mencionó anteriormente, el avance en el desarrollo de herramientas bioinformáticas ha permitido que el genoma de *T. cruzi* este disponible para su análisis. Por otro lado, se han desarrollado nuevas herramientas que permiten hacer un escaneo computacional con el que se pueden identificar nuevos antígenos mediante la detección de proteínas con aminoácidos repetidos en tándem.

Goto y colaboradores (2007), reportaron el uso exitoso de bioinformática en la detección de antígenos con repetidos en tándem de el protozoario *Leishmania donovani*, encontrando que de los 8191 genes escaneados, 64 contenían dominio de repetidos, de estos 22 codificaban para antígenos previamente caracterizados y 42 no habían sido descritos, además demostraron que los dominios de repetidos de estas proteínas eran antigénicos. En *T. cruzi* también se ha hecho este tipo de análisis para la búsqueda de genes con secuencias de repetidos en Tándem (genes con TR) en el genoma, Sin embargo, aun no se ha logrado caracterizar la totalidad de las proteínas que poseen este tipo de dominios de repetidos. Goto y cols., (2006), realizaron un estudio sistemático de los genes que poseen repetidos en Tándem que se encuentra en *T. cruzi*, en comparación con otros organismos, aunque las características de los genes con TR variaron de organismo a organismo, la presencia de genes que tienen dominios TR grandes fue únicamente para los tripanosomátidos examinados, incluyendo *T. cruzi*.

Estos resultados sugieren la viabilidad del enfoque bioinformático para la identificación de proteínas de *T. cruzi* que poseen repetidos en Tándem y que puedan ser buenos inmunógenos, que ayuden al desarrollo de pruebas de diagnóstico, blancos de drogas o como vacunas.

II. Antecedentes

El proceso de la vacunología reversa se ha aplicado a varios patógenos, incluyendo *Neisseria meningitidis* del serogrupo B, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y cepas patógenas de *Escherichia coli*, y ha proporcionado decenas de nuevos antígenos candidatos para la investigación preclínica y clínica (Pizza *et al.*, 2000; Wizemann *et al.*, 2001; Mora y Bensi, 2005; Falugi *et al.*, 2008 y Moriel *et al.*, 2010).

El desarrollo de una vacuna contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (MenB) representa el primer ejemplo de la utilidad de la vacunología reversa (Toneatto *et al.*, 2011). La vacuna Reversa MenB fue realizada gracias a la primera secuenciación del genoma de la cepa *N. meningitidis* del serogrupo B (cepa MC58) en el año 2000. Con la secuenciación del genoma de este patógeno, los investigadores fueron capaces de seleccionar cerca de 600 posibles candidatos de vacunas mediante análisis *in silico*, de estos 350 proteínas recombinantes se expresaron con éxito en *E. coli* y se utilizaron para inmunizar ratones, de las cuales se confirmaron 91 nuevas proteínas de superficie por análisis de citometría de flujo, de ellas se encontró que 28 proteínas inducían la producción de anticuerpos bactericidas (Pizza *et al.*, 2000). Después de un análisis más detallado, se formulo una vacuna MenB de cuatro componente (4CMenB), esta consta de tres antígenos proteicos recombinantes (NHBA-GNA1030 y GNA2091-fHbp Proteínas de fusión y NadA) y vesículas de la membrana externa de la cepa utilizada para la vacuna OMV de Nueva Zelanda (que contiene PorA 1.4) (Giuliani *et al.*, 2006). Con el uso del genoma meningocócico se han descubierto otros antígenos importantes que han sido identificados como factores de virulencia relevantes, por ejemplo la proteína de unión al Factor H (fHbp) que se une el factor H (FH), un inhibidor clave de la vía alternativa del complemento, y que permite el meningococo para evadir la muerte por el sistema inmunológico innato (Madico *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2006).

En *T. cruzi* la secuenciación del genoma (El-Sayed *et al.*, 2005), abre un potencial para llevar a cabo a gran escala la detección e identificación de genes de interés como vacunas. Programas bioinformáticos han sido diseñados para evaluar las

funciones de genes basándose en homologías con genes ya caracterizados en otros organismos, la presencia de algunos motivos característicos en la secuencia, y su localización celular. Estos programas, por lo tanto, permiten solventar algunos obstáculos del pasado, pues permiten ahorrar tiempo ya que se evitan algunas técnicas experimentales tardadas, y en general con ellos se puede proceder directamente a las secuencias blanco según la información disponible para el diseño de una vacuna (Vázquez-Chagoyán *et al*, 2011).

En el año 2004, Bhatia y colaboradores, basados en este enfoque emplearon herramientas bioinformáticas, junto con una estrategia experimental para identificar los genes en una base de datos de *T. cruzi* que codificaran proteínas con anclajes glicosil-phosphatidylinositol o secretadas. Con la caracterización molecular y bioquímica de ocho de las secuencias seleccionados por este método, se identificaron tres genes candidatos nombrados TcG1, TcG2 y TcG4 que se conservan en el genoma de todas las cepas de *T. cruzi* de importancia clínica, se expresan en diferentes etapas de desarrollo del parásito y son inmunogénicos en varios hospederos.

Bhatia y Garg (2008), probaron la eficacia de estos tres antígenos antes mencionados como vacunas contra la infección de *T. cruzi*, así como contra el desarrollo de la enfermedad en un modelo murino; cuando se inmunizaron los animales se obtuvo una producción de anticuerpos del los tipos IgG, IgG1 e IgG2b, estos resultados sugieren que la inmunización con las vacunas de DNA que codifican estos antígenos promueve una fuerte respuesta de anticuerpos específica al parásito del tipo Th1 que persiste aun después del reto infeccioso con *T. cruzi*. En cuanto al control de la parasitemia se vio que los ratones inmunizados con TcG1, TcG2, y TcG4 exhiben baja carga parasitaria de 66%, 50% y 90% respectivamente en tejido cardiaco comparando con el grupo control infectado no inmunizado o inmunizados únicamente con el vector plasmídico. En la etapa crónica de la infección el grupo inmunizado presento una carga parasitaria menor que en los grupos controles cuando se inmunizo con TcG1 y TcG2 y fue casi imperceptible en el tejido cardiaco cuando fueron inmunizados con TcG4. Estos resultados sugieren que los ratones inmunizados con TcG1, TcG2 y TcG4 presentan mejor respuesta en el control de la carga parasitaria en

la fase aguda de la enfermedad lo cual resulta en una disminución substancial de la persistencia del parásito en el tejido durante la fase crónica. La infiltración de citocinas proinflamatorias en tejido cardíaco y músculo esquelético también fue marcadamente reducida en los ratones que fueron inmunizados con los plásmidos que codifican los antígenos, lo cual indica que la patología de la enfermedad también fue controlada durante la fase crónica. Con estos resultados se demostró que las vacunas con los plásmidos que codifican los antígenos *TcG1*, *TcG2* y *TcG4* proveen resistencia a la infección por *T. cruzi* así reducción de la patología causada por este. Por lo tanto con este estudio se validó la utilidad del enfoque computacional-bioinformático para la identificación de potenciales candidatos a vacuna contra *T. cruzi*.

III. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es un problema grave de salud pública que afecta cerca de 10 millones de personas, y del 20 al 40 % de los pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi* mueren por alteraciones cardíacas (insuficiencia cardíaca congestiva). La quimioterapia para el tratamiento, tanto para la fase aguda como crónica de la enfermedad, es de uso limitado debido a la alta toxicidad y pobre eficacia de las drogas disponibles.

Actualmente no existe ninguna vacuna 100% efectiva. Una variedad limitada de antígenos de *T. cruzi* han sido evaluados hasta ahora, es por ello que la identificación de nuevos antígenos que tengan un potencial prometedor como candidatos a vacuna es necesaria. El conocimiento de la secuencia del genoma de este parásito puede ser explotado en este sentido, y con la ayuda de las herramientas bioinformáticas disponibles este se puede analizar, lo cual abre un potencial para llevar a cabo a gran escala la identificación y selección de genes de interés como vacunas y esto podría mejorar los esfuerzos hacia el desarrollo de una inmunidad protectora con los nuevos blancos antigénicos.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Seleccionar mediante el enfoque de vacunología reversa antígenos de *Trypanosoma cruzi*

2. Objetivos específicos

- Analizar por bioinformática el genoma de *Trypanosoma cruzi* y seleccionar posibles antígenos.
- Amplificar y clonar el DNA que codifica para los antígenos de *Trypanosoma cruzi* seleccionados.
- Expresar y purificar las proteínas recombinantes para inmunizar ratones BALB/c.
- Determinar la expresión estadio específica de las proteínas nativas.
- Comprobar la localización subcelular de las proteínas nativas.
- Determinar la parasitemia y mortalidad en ratones BALB/c inmunizados con las proteínas recombinantes.

V. METODOLOGÍA

1. Análisis bioinformático para selección de antígenos

Se uso una combinación de herramientas bioinformáticas para la selección de los antígenos de *Trypanosoma cruzi*.

Se analizo la base de datos TriTrypDB 5.0 (Junio, 2013) que contiene 11,109 ORFs de *Trypanosoma cruzi* de la cepa CL Brener Non-Esmeraldo-like y se seleccionaron secuencias de proteínas con regiones transmembranales.

Al mismo tiempo se uso la base de datos de secuencias de familias proteicas llamada **pfam**. Las familias se construyen siguiendo 4 pasos básicos: (1) la realización de una serie de alineamientos multiples de alta calidad, (2) la creación de un perfil de similitud basado en el Modelo oculto de Markov (HMM) según el alineamiento, (3) búsqueda del perfil de similitud creado por HMM en la base de datos de UniProtKB y (4) la selección de la secuencia o dominio específico de la familia (Punta *et al.*, 2012). En esta base de datos se pueden encontrar las secuencias correspondientes a una familia determinada, agrupadas por especies, por lo cual fueron seleccionadas las de *Trypanosoma cruzi*.

Posterior a esto se usaron los siguientes programas:

TMHMM 2.0: Servidor en línea que predice, con un 97-98% de efectividad, la localización y orientación de alfa hélices transmembranales en secuencias de proteínas, está basado en el modelo oculto de Markov (HMM) con una arquitectura que corresponde estrechamente con el sistema biológico (Sonnhammer *et al.*, 1998). Este programa se utilizó para hacer una clasificación de las proteínas en membranales y no membranales.

SMART: (Simple Modular Architecture Research Tool) es un programa en línea (<http://smart.embl.de/>) para la identificación y anotación de dominios de proteínas y

análisis de la arquitectura de los mismos (Letunic *et al.*, 2012). Esta herramienta se usó para predecir los dominios o motivos sugerentes de funciones putativas de las proteínas. Con este programa se seleccionaron aquellas proteínas de *T. cruzi* con posible función en señalización.

SignalP 4.0: Este es una herramienta bioinformática que predice la presencia de péptido señal en una secuencia de proteína, este programa es útil porque puede distinguir entre péptido señal y péptidos no señal como por ejemplo secuencias transmembranales. SignalP 4.0 está disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (Nordahl, 2011).

En la base de datos **EuPathDB** (<http://eupathdb.org>) que incluye 11 bases de datos genómicos de patógenos eucariotas (Aurrecoechea, 2013), se seleccionó la de trypanosomatidos **TriTrypDB** y en ella se realizó un BLAST para la búsqueda de ESTs de cada una de las secuencias, con ello se determinó en qué estadio de *T. cruzi* se expresa dicha proteína.

Se usaron diferentes programas para predecir la localización subcelular con la finalidad de asegurar la predicción, los programas que se emplearon son los siguientes:

CELLO: Es un software que predice la localización subcelular que toma en cuenta 4 parámetros: la composición de aminoácidos, la composición de dipéptidos, composición de aminoácidos particionados y las propiedades fisicoquímicas basados en la composición de la secuencia. Los resultados de la predicción son expresados en porcentaje y pueden ser extracelular, nuclear, citoplásmica, mitocondrial, de cloroplastos, vacuolar, lisosomal, del citoesqueleto, del retículo endoplásmico, peroxisomal, del aparato de Golgi o de la membrana plasmática. Este método tiene una eficacia de predicción de 89%, valor que es 14% más alto que el programa PSORT uno de las herramientas más usadas para la predicción de localización subcelular y está disponible en (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) (Yu *et al.*, 2006).

ESLpred: Esta basado en el método de la maquinaria de soporte vectorial (SVM), para la predicción usa tres características de las proteínas; 1) propiedades fisicoquímicas, 2) composición de aminoácido, y 3) composición de dipéptidos. La exactitud de la predicción es 78,1%, 77,8% y 82,4% respectivamente (<http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/>) (Bhasin y Raghava, 2004).

SLPFA: Predice la localización subcelular de proteínas mediante la combinación de técnicas para el alineamiento de secuencias y las características según la composición y frecuencia de aminoácidos. La diferencia de este método a otros que comparan los alineamientos de secuencias, es el alineamiento que se aplica a bloques de secuencia, y cada bloque tiene cierta composición de aminoácidos característica lo que permite diferenciarlos. Este programa se considera útil para la predicción de la localización subcelular de proteínas recientemente descubiertas y sobre las cuales no se tiene mucha información, y tiene un precisión en la predicción del 90-96% (<http://sunflower.kuicr.kyoto-u.ac.jp/~tamura/slpfa.html>) (Tamura y Akutsu, 2007).

EuLoc: Es un método híbrido para la predicción de la localización subcelular de proteínas eucariotas. Incorpora el método del modelo oculto de Markov (HMM), un enfoque de búsqueda de homologías (PSI-BLAST) y maquinaria de soporte de vectores (SVM), además de características de las secuencias terminales de direccionamiento, secuencia de motivos biológicos Pfam, PROSITE y NLSdb, la composición de aminoácidos y la modificaciones post-transcripcionales. EuLoc proporciona una buena capacidad de predicción y equilibrado para cada tipo de localización subcelular. La precisión global y precisión de localización de Eu-Loc es 90.5 y 91.2% (<http://euloc.mbc.nctu.edu.tw/>) (Chang *et al.*, 2013).

ngLOC: Es un método probabilístico y clasificador bayesiano basado en n-gram que permite predecir la localización subcelular de proteínas tanto en procariotas y eucariotas. La precisión de la predicción global varía de 85,3% a 91,4% a través de especies. Este programa puede predecir hasta 11 ubicaciones diferentes, tanto en especies animales como vegetales. ngLOC también predice de 4 a 5 ubicaciones distintas en bacterias gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente. Para la

predicción considera únicamente la información de la secuencia de la proteína, ngLOC (<http://ngloc.unmc.edu>). (King *et al.*, 2012).

Se usaron dos programas para la predicción de epítomos, uno para linfocitos B y otro para linfocitos T.

LEPS: (Linear Epítomo Prediction by Propensities and Support Vector Machine). Esta herramienta predice epítomos lineales para células B. Considera segmentos proteicos con un nivel de inmunogenicidad altamente global o con antigenicidad relativamente alta en regiones locales. Se pueden seleccionar diferentes combinaciones de propiedades físico-químicas (estructura secundaria, polaridad, hidrofobicidad, accesibilidad a la superficie, flexibilidad y otros como el peso molecular), también permite la exploración de tamaños de ventanas y únicamente se puede presentar una sola secuencia de la proteína a la vez. Este programa reconoce características de segmentos de aminoácidos entrenado a reconocer las características de los segmentos de aminoácidos (AASs) con longitudes de 2 a 4 residuos. Después utiliza el sistema SVM (support vector machine) para caracterizar los patrones en grupos de epítomos y no epítomos. Por lo tanto, el enfoque LEPS primero realiza propensiones físico-químicas y enfoques matemáticos morfológicos y luego usa las características AASs para agrupar los epítomos lineales predichos y eliminar aquellos que son menos probables. Esta herramienta también permite obtener la estructura 3D de los epítomos lineales predichos. LEPS está disponible para su uso académico en <http://leps.cs.ntou.edu.tw> (Wang *et al.*, 2011).

CTLPred: Es un método directo para la predicción de epítomos de linfocitos T citotóxicos a partir de una secuencia antigénica. Este método está basado en una matriz cuantitativa (QM) y técnicas de aprendizaje automático así como SVM (Support Vector Machine) y redes neurales artificiales (ANN). Este método ha sido formado y probado sobre un grupo de datos no redundantes de epítomos y no-epítomos de células T que incluyen 1137 epítomos de células T restringidos al MHC de clase I probados experimentalmente. La precisión de los métodos basados en QM, ANN y SVM es 70.0, 72.2 y 75.2%, respectivamente. El servidor permite un mayor consenso

y la predicción combinada de los métodos basados en SVM-ANN. Además con este método es posible discriminar entre epítomos CTL y no-epítomos que se unen a MHC, lo cual no es posible con los métodos de predicción de ligandos del MHC (<http://www.imtech.res.in/raghava/ctlpred/> y <http://bioinformatics.uams.edu/mirror/ctlpred/>) (Bhasin y Raghava, 2004).

Una vez seleccionados los antígenos se llevo a cabo el diseño de los oligonucleótidos correspondientes para obtener las proteínas recombinantes purificadas.

2. Material biológico

En este trabajo se empleo la cepa H8 de *T. cruzi*, la cual se mantuvo virulenta mediante pases en ratones BALB/c. Los tripomastigotes sanguíneos se obtuvieron de sangre de ratones infectados en el pico de parasitemia (21 días). La sangre fue colectada de la cola y transferida a un tubo Eppendorf con amortiguador salino de fosfatos y EDTA 0.05% y se contaron los parásitos en una cámara de Neubauer.

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 4-6 semanas de edad, obtenidos de la Unidad de Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN (México) para todos los experimentos, estos se mantuvieron en condiciones adecuadas en el bioterio.

Se usaron las cepas bacterianas de *Escherichia coli* TOP10 y BL21, el plásmido que usado es pRSETA (contiene una bandera de Histidinas para fusionar y obtener proteínas recombinantes y es inducible con IPTG) (Fig. 3). Las cepas bacterianas se cultivaron en forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB) y cuando fue necesario se suplementó con ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml) o cloranfenicol (25 µg/ml).

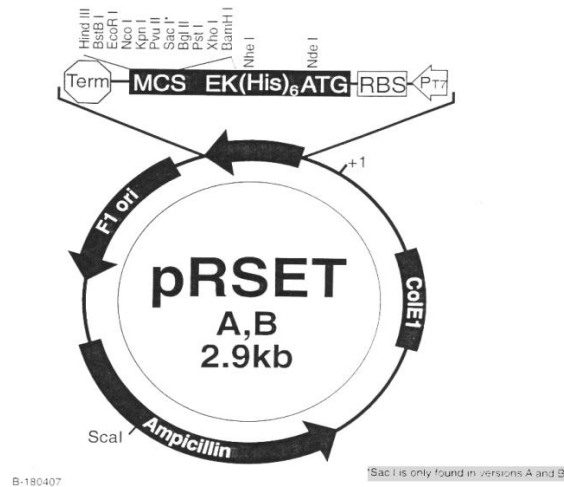


Figura 3. Mapa de los plásmidos pRSETB y pRSETC. Los vectores pRSET (A, B y C) fueron diseñados para la expresión y purificación de niveles altos de proteína. Tienen un tamaño de 2940 pb y contienen 11 sitios de clonación. La expresión está bajo el control del promotor T7, contienen el gen de resistencia a ampicilina para la selección de clonas positivas.

3. Amplificación de fragmentos de DNA que codifican los antígenos reversos

Todas las manipulaciones de DNA (PCR, restricciones, ligaciones, clonaciones y subclonaciones) fueron realizadas mediante técnicas convencionales de biología molecular (Ausubel *et al.*, 1997; Sambrook y Rusell, 2002).

Mediante la técnica de PCR se amplificaron los fragmentos correspondientes a los antígenos seleccionados a partir de DNA genómico de epimastigotes. Los tamaños de los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 1%, y fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados y fotografiados en un transiluminador de luz UV.

Los productos de PCR se sometieron a digestión enzimática con las enzimas de restricción correspondientes y fueron clonados en el vector de expresión TOPO ---- y posteriormente dos de ellos TcKF6 y TcRM3, fueron subclonados en el vector de expresión pRSETB y pRSETC respectivamente para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

4. Células competentes *E. coli* Top 10F'

Las bacterias de *E. coli* Top 10F' se cultivaron en 10 ml de medio Luria Bertani: durante toda la noche a 37 °C, se inocularon 5 ml de este cultivo en 10 ml de medio LB fresco y se cultivaron a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 (600 nm). Las bacterias se colectaron a 4 000 rpm durante 10 min, la pastilla se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ 50 mM en frío y se dejó esta solución por un periodo de entre 25–35 min en hielo, después las bacterias se colectaron por centrifugación a 3 000 rpm 5 min y la pastilla se resuspendió en 100 µl de CaCl₂ 50 mM y se incubaron en hielo durante 20 min.

5. Purificación de DNA plasmídico

Se transformaron bacterias *E. coli* TOP 10F' competentes con el plásmido pRSETB y pRSETC, posteriormente estas células se inocularon en placas de medio LB-Ampicilina (100 mg/ml), se seleccionó al azar una colonia transformada de las placas LB/Amp y se inoculó en 25 ml de medio LB/ampicilina incubando toda la noche a 37° C. La purificación del DNA se realizó por el método de lisis alcalina (Maniatis *et al*, 1989). Este método consiste en lo siguiente: del cultivo de toda la noche se centrifugó durante 10 minutos a 10, 000 rpm; la pastilla se resuspendió en 1.5 ml de STE (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 y sacarosa 50 mM), se añadió lisozima en una concentración de 1mg/ml y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, después se adicionaron 3 ml de la solución II (NaOH 2N y SDS al 1% preparada al momento), la muestra se mezcló por inversión y se incubó en hielo 15 min. Se adicionaron 2.25 ml de acetato de potasio 3 M pH 4.8 y la mezcla se colocó en hielo otros 15 min, la solución fue centrifugada a 12,000 rpm 30 min para separar el debris y el DNA cromosomal, el sobrenadante se transfirió a un tubo Corex de vidrio y se le agregaron 3ml de isopropanol absoluto. Para recuperar los ácidos nucleicos la mezcla se incubó por 15 min a temperatura ambiente y después se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70 %, la cual se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 200 µl de agua, se le agregó RNAsa A-T1 y se incubó a 37° C

durante 2 horas. A partir de esta mezcla el DNA plasmídico se purificó por cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna QIAGEN-tip 20, finalmente el DNA se corrió en un gel de agarosa al 1 % y en un transiluminador de luz UV se identificaron las bandas que correspondían al tamaño de pRSETB y pRSETC, el DNA se conservó a -70 °C para su uso posterior.

6. Purificación de las proteínas recombinantes

Se transformaron bacterias BL21 (DE3) pLysS con los plásmidos recombinantes pRSETB-TcKF6 y pRSETC-TcRM3, se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina (100mg/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación constante. Posteriormente se inocularon 3 ml de este cultivo en 250 ml de medio fresco con ampicilina y se incubaron hasta una densidad óptica de 0.5 (600 nm). Se indujo la expresión de las proteínas recombinantes con isopropil-1-tio- β -D galactósido a 1 mM (IPTG Boehringer Mannheim) por dos horas 30 minutos en agitación constante, después las bacterias se centrifugaron a 8000 rpm en un rotor JA10 Beckman. La pastilla de células se resuspendió en 15 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, PMSF 1M, β Me 10 mM y cloruro de guanidina 6M) incubándolo 5 minutos en hielo. Las muestras fueron sonicadas 3 veces por 1 min con intervalos de 2 min en hielo y después se centrifugaron a 10 000 rpm en el rotor JA20 10 min; se colectó el sobrenadante y a partir de este las proteínas recombinantes fueron purificadas por cromatografía de afinidad de Ni-agarosa (Novagen 69670-3). en condiciones desnatualizantes y fueron dialisadas contra PBS

7. Electroforesis e inmunotransferencias

Las proteínas TcKF6 y TcRM3 purificadas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% (Gel separador: acrilamida al 15 %, bisacrilamida al 0.216 %, Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS al 0.1 %, persulfato de amonio al 0.063 % y TEMED al 0.05 %; gel concentrador: acrilamida al 5 %, bisacrilamida al 0.090 %, Tris-HCl 500 mM pH 8.8, Tris-HCl 104 mM pH 6.8, SDS al 0.083%, persulfato de amonio al 0.062 % y TEMED al 0.0375 %) y se corrieron a 80 volts (Tanque Bio-Rad

modelo Mini-PROTEAN® II Cell) en amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS al 0.1 %). Al terminar la electroforesis las proteínas se observaron por tinción con azul de Coomassie o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) usando un sistema miniprotean (Bio-Rad). El ensayo de inmuno-transferencia se realizó utilizando anticuerpos anti-histidinas (Santa Cruz Biotechnology) ya que las proteínas recombinantes poseen una bandera de histidinas, el anticuerpo se usó a una dilución 1:1000,

Por otro lado con el fin de determinar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes rTcKF6 y rTcRM3, se probó el reconocimiento de estas en ensayos de Western Blot por lo sueros de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes, sueros de humano no infectado, suero chagásico humano y suero chagásico de ratón, todos los sueros mencionados fueron usados a una dilución de 1:2000. En estos ensayos se usaron como control negativo el suero de ratones preinmunes y anticuerpos anti-histidinas como se mencionó anteriormente.

Los anticuerpos unidos se revelaron con un anticuerpo de chivo anti-IgG de ratón o anti humano en su caso, ambos acoplados a fosfatasa alcalina (Invitrogen 62-6522) a una dilución 1:5000, donde NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) se usaron como sustratos. Finalmente la membrana se lavó con agua corriente para detener la reacción de la enzima (Ausubel *et al*, 1997).

8. Inmunización con las proteínas recombinantes e infección

Se obtuvieron sueros preinmunes de dos grupos de 4 ratones hembras BALB/c de 4-6 semanas de edad, posteriormente estos dos grupos de ratones fueron inmunizados 2 veces con 10 µg de la proteína recombinante TcKF6 ó TcRM3 respectivamente, por la vía intraperitoneal, la primera de estas inmunizaciones con Titer Max® y siguiente con adyuvante incompleto de Freund (Sigma F-5506). Por otro lado también se manejaron dos grupos de 4 ratones cada uno para cada una de las proteínas, un grupo fue inmunizado solo con el adyuvante Titer Max® y PBS y el otro grupo no recibió inmunización. Al término de las inmunizaciones se obtuvo el suero inmune de un mes, dos meses y tres meses, para los ensayos de inmunotransferencia y

inmunofluorescencia. Posterior a la última inmunización, se dejó transcurrir un periodo de 15 días y los ratones fueron infectados con 2×10^4 tripomastigotes sanguíneos por vía intraperitoneal, se obtuvo un suero de estos ratones en un periodo de 19 a 21 días posterior al reto parasitario.

9. Parasitemia y mortalidad de ratones inmunizados con proteínas recombinantes

Posterior a la inmunización con las proteínas recombinantes y después del reto parasitario se empezó a monitorear la parasitemia (c/3 días) y la sobrevivencia (diariamente) de los ratones. Las muestras sanguíneas fueron colectadas de la vena de la cola, para determinar el número de parásitos por mililitro de sangre mediante conteo directo en cámara de Neubauer.

10. Expresión estadio específica y localización subcelular de las proteínas nativas TcKF6 y TcRM3.

Para la determinación de la expresión estadio específico de las proteínas los anticuerpos obtenidos se probaron en ensayos de inmunotransferencia contra extractos de tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes. Las formas de epimastigotes de la cepa H8 de *T. cruzi* fueron cultivadas a 28°C en medio LIT (infusión de hígado y triptosa) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (Castellani *et al.*, 1967), estos parásitos se recuperaron por centrifugación a 4000 Rpm. Los tripomastigotes y amastigotes fueron recuperados a partir del sobrenadante de cultivos de fibroblastos 3T3/NIH infectadas con epimastigotes, las células fueron donados por la Dra. Rebeca Manning Cela del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, México, D. F. Fibroblastos 3T3/NIH fueron plaqueados a una densidad de 2×10^4 cel/cm² en medio D-MEM con suero fetal bovino al 10%. Después de 5 días se infectaron las células con infectadas con 9.5×10^6 epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa H8, los cultivos de fibroblastos infectados se mantuvieron en medio D-MEM con suero fetal al 2%, después de un periodo de 11 días con cambio de medio diario, los sobrenadantes de estas células que ya contenían parásitos libres (tripomastigotes) fueron centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos y los parásitos recuperados se usaron por un lado para la

preparación de extractos totales o para la preparación de laminillas para inmunofluorescencias para lo cual fueron fijados sobre cubreobjetos de vidrio. Después de un periodo de 20 días con cambio de medio diario en el sobrenadante del cultivo de las células 3T3/NIH se observaban amastigotes libres los cuales fueron recuperados por centrifugación (4000 Rpm 5 minutos) y del mismo modo procesados para la preparación de extractos totales o fijados a laminillas para su uso en inmunofluorescencias.

Los extractos totales de amastigotes y tripomastigotes fueron preparados de la siguiente manera: después de centrifugar los sobrenadantes de los cultivos de las células 3T3/NIH que contenían tripomastigotes o amastigotes, la pastilla obtenida fue resuspendida en 50 μ l de amortiguador de muestra (Glicerol 2%, SDS 4 %, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, Azul de bromofenol 0.2 %) y fueron hervidas por 5 min en baño María posterior a esto se le agrego β Me 200 mM. Para la preparación de extractos de epimastigotes se partió de 1 ml de cultivo de epimastigotes en crecimiento exponencial, estos fueron lavados dos veces con buffer de fosfatos salinos (PBS) por centrifugación (2000 rpm por 3 minutos) y la pastilla fue procesada como se menciona anteriormente en el caso de amastogotes y tripomastigotes. Los extractos proteicos se separaron en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Para comprobar la localización subcelular de las proteínas nativas en los diferentes estadios de *T. cruzi*, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta en los tres estadios de *T. cruzi* usando los antiuerpos policlonales contra las proteínas recombinantes producidos. Para ello los parásitos (amastigotes y tripomastigotes) obtenidos por centrifugación (como se explico previamente) del de sobrenadantes de cultivos de fibroblastos infectados y epimastigotes obtenidos de cultivos puros en fase exponencial (lavados previamente), fueron fijados en cubreobjetos de cristal, esto se llevo a cabo de la siguiente manera: la pastilla de parásitos recuperados se resuspendió en 400 μ l de PBS, se tomó 50 μ l y se coloco la gota sobre cubreobjetos de vidrio, se dejo secar a temperatura ambiente por 30 min o hasta que estaba completamente seca la superficie. Los parásitos ya fijados de cada estadio se separaron en dos grupos esto

para manejar dos condiciones una sin permeabilizar y otra en la que se llevo un proceso de permeabilización para este último los preparaciones fueron incubadas con metanol por 5 minutos y lavadas dos veces con PBS, posteriormente los parásitos permeabilizados y no permeabilizados fueron incubados con suero fetal bovino 10% en PBS por 1 hr a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron los parásitos con PBS y se incubaron con los sueros preinmunes (control negativo), anticuerpos policlonales anti TcKF6 o TcRM3 (sueros obtenidos después de 2 inmunizaciones con las proteínas recombinantes) y sueros de ratones no inmunizados y retados con el parásito (control positivo) a una dilución de 1:100 para la proteína TcKF6 y 1:50 para la proteína TcRM3 en PBS-leche al 1% durante 2h a 37°C. Posteriormente se lavaron 6 veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo de chivo anti IgG de ratón acoplado a FITC por 1:30 h a 37°C, se lavaron los parásitos con PBS y se montaron las preparaciones con VectaShield Acoplado a DAPI y se observaron mediante microscopia confocal.

VI. RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de la base de datos TriTrypDB 5.0 (Junio, 2013)

El análisis bioinformático se realizó con el fin de identificar genes que codifiquen para proteínas para evaluarlas como candidatos potenciales a vacunas. El primer criterio utilizado en el análisis del genoma fue seleccionar aquellos genes que codificaran proteínas con regiones transmembranales mediante el programa TMHMM. De los 11109 marcos de lectura abierto se analizaron las proteínas codificadas por éstos y se encontraron 2752 secuencias con estas características (24.7%); de estas proteínas se determinó que 595 poseían un dominio cinasa en su secuencia de amino ácidos, y de las restantes se seleccionaron 160 proteínas que poseían secuencias de aminoácido repetidos además de las regiones de hélices transmembranales.

Ejemplos de los resultados obtenidos con el programa TMHMM se muestran en la figura 4, en los que se observa gráficamente la disposición de las hélices transmembranales así como la longitud de las porciones extramembranales. Se seleccionaron aquellas proteínas que poseían secuencias extramembranales de mayor tamaño con simple o múltiple paso membranar, obteniéndose una lista más reducida de 96 secuencias del grupo con un dominio cinasa y 67 secuencias del grupo de proteínas con repetidos de amino ácidos.

Del BLAST realizado en la base de datos TriTrypDB para la búsqueda de ESTs de cada una de las secuencias hasta el momento seleccionadas, se determinó qué de las 96 proteínas de la familia cinasas 38 se expresaban en los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* (14 en amastigotes, 22 en epimastigotes y 2 en tripomastigotes), por otro lado para las proteínas que poseen repetidos de amino ácidos se determinó que 67 se expresaban en los diferentes estadios (11 de amastigotes, 42 de epimastigotes y 14 de tripomastigotes).

Con el uso de los programas de predicción de localización subcelular se seleccionaron 6 secuencias, de estas tres son de la familia cinasa y tres con repetido en aminoácidos, una por cada estadio en ambos grupos, la predicción para estas fue de membrana plasmática en dos o tres de los programas usados (Tabla 5 y 6).

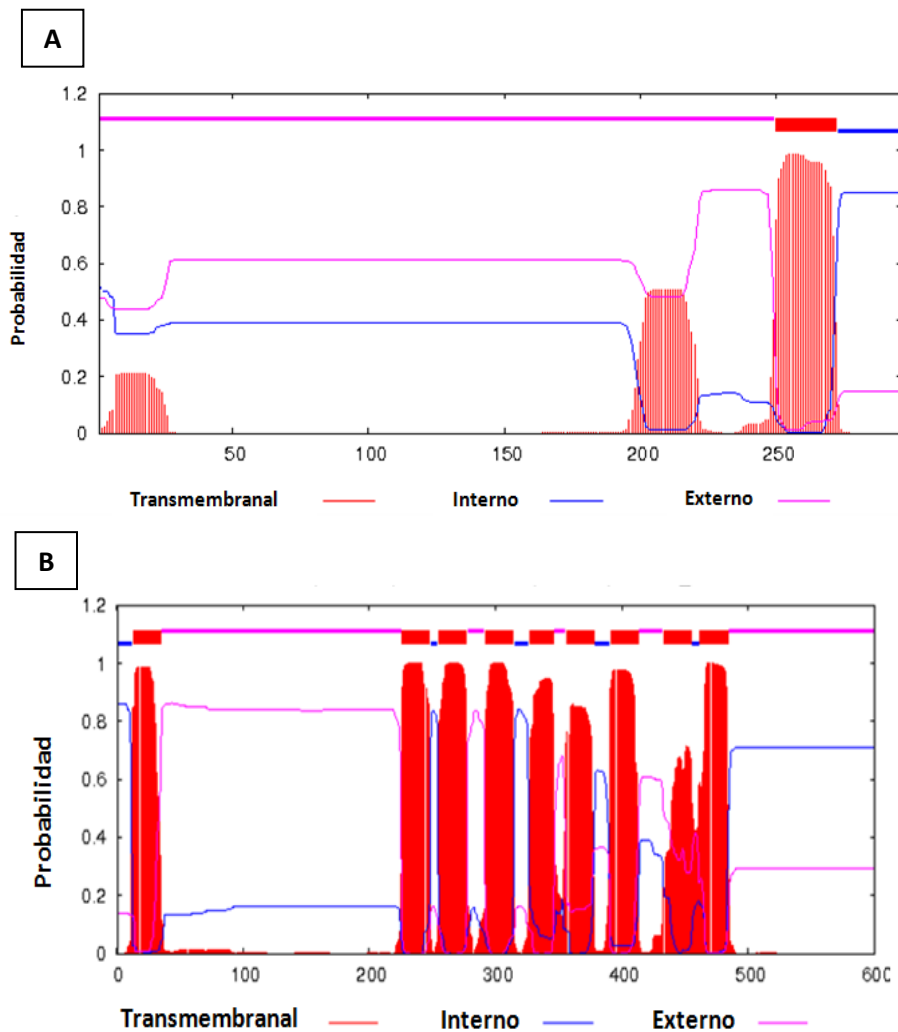


Fig. 4. Gráficas obtenida con TMHMM. Se observa la localización de las regiones transmembranales en rojo, porciones citoplasmática en azul y extramembranales en rosa. (A) Secuencia TcRE6 seleccionada posee una sola región extramembranal y (B) secuencia TcRL9, se observan varias regiones transmembranales, se seleccionó por la primera región extratransmembranal.

TABLA 5. Resultados de la predicción de localización membranal para las proteínas de la familia Cinasa.

PROT	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR					EST	E-VALOR	(% IDENTIDAD)	ESTADIO
	ESLpred	SLPFA	EuLoc	CELLO	ngLOC				
TcKM2	Citoplásmica	Mitocondrial	nuclear	Mem-Plas	Mem-Plas	CF888819	2.7e-9	37	AMA
TcKW8	Citoplásmica	Mitocondrial	Mem-Plas	Mem-Plas	Mem-Plas	AI622945	6.0e-120	96	EPI
RTcKF6	Citoplásmica	Mitocondrial	Mem-Plas	Membrane	Mem-plas	GW396174	1.5e-35	57	TRIP

La predicción de epitopos para linfocitos B y linfocitos T citotóxicos se realizó mediante los programas LEPS Y CTLPred respectivamente. La predicción se realizó a partir de la regiones extramembranales de cada proteína (para las que poseían más de

una de estas secuencia como TcKW8, TcRM3 y TcRL9 se usó la secuencia de mayor longitud para la predicción). Las regiones extramembranales usadas para cada predicción y los epítomos predichos se muestran en la figura 5. En el caso de las secuencias TcKW8 y RTcKF6 se seleccionó una secuencia de menor tamaño, esto por que contenía la mayor cantidad de epítomos concentrados, dicha región seleccionada se resalta dentro del rectángulo azul.

TABLA 6. Resultados de la predicción de localización membranal para las proteínas con repetidos en Tandem.

PROT	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR					EST	E-VALOR	(% IDENTIDAD	ESTADIO
	ESLpred	SLPFA	EuLoc	CELLO	ngLOC				
TcRM3	Extracelular	Secretada	Membrana	Mem-Plas	Mem-Plas	GW396214	3.8e-36	90	AMA
TcRL9	Extracelular	Mitocondrial	Membrana	Mem-Plas	Mem-Plas	AA926512	1.2e-80	97	EPI
TcRE6	Extracelular	Secretada	Mem-Plas	Mem-Plas	Mem-Plas	JK744049	8.6e-41	53	TRIP

TcKM2

EKAAESKGRGTIFIVKAYSQDKQGVLDTRDLIPSAQIMENYTVIGKIGGGAE GIVFRVRHEPTKKEFAMKVIRCPDHSRVNSALKEIKVLLHLRHRHVVSIVDFFLLFHND
 TIRHEFVADYKNEAQLSESTRSLGFCSTGCLGSNGSPVVRNEVLSDFVCFHPSEVGVCLVMALCTS GDMQDTIEDARRRLMDVGSHPFIEAQILSWMEQCASALAFIHEQG
 FLHRDLKFTNVFFDDDKKIKIGDFGLAATVGLGRQSI VGT

TcKW8

RATRAELKLALGGAPVSARSRRRAVLREVLEDVCTTLRCRLDKVRLYMPDRFNARVAAAGYGSPPFRSECGIDKASLDGNSSEELKRVTCVAVYVYTPRTVRNPTDAVV
 ELIMRAVVKIATDCGGCFEVQRPDYCVISFGAQLRGKFAAEALEAVEFARRLREELTACAELDGLYRVIVESGVLGSGVSGGGRSHFVLLCRNLHYRLGGFLPHTGVVA
 AVTEETALLVRGRCLLPFETVYLEDAATTCVKLHEVICGAAGTAAWQNYEHYCYSEAYDMMERSEYGSALWWEKARAVEQALAEESPLCRSSQAARLEKECVMRMRSGD
 YAPFARRPRLANGENDGVPHSDVSVTSTVSEETVSQKTASATSSFRGFLVTPAPESDAVSEVAAGCLPHRFDRDLGNVWKRALNPIEDPSTDTIPVYMAISATGTLAVLKV
 COLTDAAARLTRAENVDAALEELMGLRVNDSLQYLSYCYVPPHRVVLVMQYVPGGTLREMKSRYGRKPLPTAVRRNVASMLRGLAHLHGRGVIHGRLCPEENVMGVSRWR
 LKGMLLGAAPLIHQYETIYVPEVAA GGAKTAA NDVYALGLLLLLAMLTDSPHWQWSANAALDRSRNELDSSLADSTAFREALRNGLLTPVPTPADTDELRTVLEACLRTA
 PGDRPTALRLQEVRCDRSL

RTcKF6

PLLSISLSPLCSVIVRTMTDTRKMANANSGLPQPPAEGDAAKSDPLGILGTHPDCKYIKKKLLQGGSFGSAWRVEERETGTIYAAKVMDDTNMSSKDRGFVTNEVKCLS
 RCNNANIIRHHVSYBERGGMLLIIMEYADGGDLYKQIKARQOSTRYFKEHEVLFIFLQCLALDHIHMNMHRDLKTANVLLTTGLVKLGFDFGFSRQYEDSLSNPVGSTF
 CGTPYYLSPELWRRAPYSKSEMWALGVVLYEVIVLKRPFGGGRNMDLIDNLIHARRQPLPNYSEDLRNVCDQLLSLDPKYRPSLRQLFQQPFIRKGLLETLRSSVLNHNH
 IPQNVQKDIACNVDEVLNSIDIQYESSRVVPRRGIVTRHTADRQWQDCELLLDEEAVVMRDVATGSEERVE LNALTSVCPIDAAIAHEKFVFPAMKNQTKAFWKEVNETS
 YEEWLVALQNALPF

TcRM3

LTYLWSAACGEVELQQQRQPGV FQWYLVPEYCEQTFDFSDINRETDAAERFSEDAKCLKKSCDNKPI SFKPLLCGNDITSE DQCPNFGTMASVLSATRVKAFTMACPVAG
 ESCTLFECANCTNTDVKAVASVILQLAAQASNASIALSYARPLLCDNFVVDKLLGAMSDCNELKAG

TcRL9

GANTVHVGRATCGTTIPIDSHWVTGPMWSFRGLASGSFSRRTSTVGSALIFGRAYISEEME FVLNSEAGMGPSSVVVFELNTILEPESECEFYWSPKKAAMDGTEITAAARV
 MALGASAGSSCPMPFEVEVSLLYDEEVSHFLRVDPKGGTNSVSFSTKDKMWPVIFRVPDKCEVYLLLLTNRQGSITHRW

TcRE6

MMCRLLCALLVIALFYFSSARATASEVKPEQEVNVKVTVSEVLNELGGEHNSD TDVDELRSKGTASGAGHNANGMLPSNSEPLVPMVDTLKSSEPKDVQEQALDGVTEAA
 KGGKEKPLNPEVTDTSDAQQSTSVTAVRKVSESETTAANATTTT TTNAPT TTTTAPQATGITTTAAPT TTTASAPSHLREIDGSLSSAWVFAPLLAASALAYNTLGG
 KGGWAVRAS TQRRGHVYVYCGPMYKVR

Fig. 5. Predicción de epítomos para linfocitos B y linfocitos T citotóxicos. En amarillo se resaltan los epítomos para linfocitos B, en rojo y subrayado en negro los epítomos para linfocitos T citotóxicos.

Finalmente para obtener el DNA que codifican para los fragmentos seleccionados de TcKM2, TcKW8, RTcKF6 TcRM3, TcRL9 y TcRE6 se diseñaron oligonucleótidos específicos, incluyendo las secuencias de reconocimiento para restricción enzimática (Tabla 7).

TABLA 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos seleccionados de las proteínas TcKM2, TcKW8, RTcKF6 TcRM3, TcRL9 y TcRE6.

OLIGOS	DELANTERO	REVERSO	TAMAÑO	ESTADIO
CINASAS				
TcKM2	5'CGGATCCGAGAAAGCAGCGGAGTCGAAG3'	5'GAAATATAAGCTTAGGTCGCTGCAAGACCAAAATCC3'	773	AMA
TcKW8	5'CGGATCCCCCGTGTACATGGCTATATCC3'	5'GAAATATAAGCTTAAAGTCGCAACGCAGTAGGGC3'	788	EPI
TcKF6	5'CGGATCCGGCATTCTTGGCAGCATCCG3'	5'GAAATATAAGCTTACCAAGCGCCACATCTCACTC3'	623	TRIP
REPETIDOS				
TcRM3	5'CGGATCCCTGACGTATCTCTTGGGCCG3'	5'GGAATCCCCCGCCTTCAGTTCGTTGCAG3'	548	AMA
TCRL9	5'CGGATCCGGGGCGAACACGGTTCACGAG3'	5'GAAATATAAGCTTATCCTTGGCGGTTTCGTGAGTAAAAG3'	576	EPI
TcRE6	5'CGGATCCATGATGATGTGCCGCTGCTG3'	5'VGAATATAAGCTTACATCGGACCACAGTAGACGTAC3'	756	TRIP

2. Construcción de proteínas recombinantes

Las DNA correspondientes a los fragmentos seleccionados de las proteínas TcKM2, TcKW8, RTcKF6 TcRM3 y TcRL9 se obtuvieron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento TcRE6 no se logro amplificar después de varios ensayos en los que se modifico la temperatura de alineamiento, se probaron diferentes concentraciones de MgCl₂. En la figura 6 se muestran los productos de amplificación con los tamaños esperados.

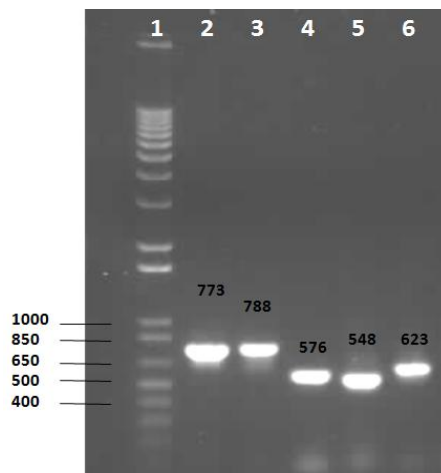


Fig. 6. Amplificación por PCR de los fragmentos TcKM2, TcKW8, RTcKF6 TcRM3 y TcRL9. 1) Marcador de peso molecular 1Kb, (2) TcKM2, (3) TcKW8, (4) TcRL9, (5) TcRM3 y (6) RTcKF6.

Los amplicones así como el vector de expresión pCR® 4-TOPO® fueron purificados y posteriormente sometidos a digestión con la enzima EcoRI y se ligaron para crear los plásmidos recombinantes correspondientes. Para comprobar la presencia de los insertos en cada uno de los plásmidos, estos se purificaron y se trataron con la enzima de restricción Eco RI. Los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa (Figuras 7 y 8). Los resultados muestran que se clonaron de manera correcta los amplicones correspondientes TcKM2, TcKW8, RTcKF6 TcRM3 y TcRL9.

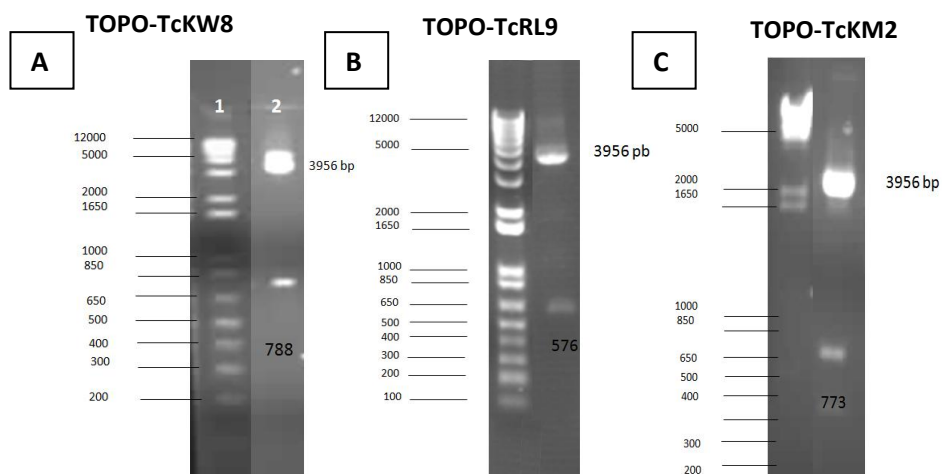


Fig.7. Análisis por restricción con Eco RI de la clonación de los amplicones en el vector pCR® 4-TOPO®. Se observa la liberación de los insertos (A)TcKW8, (B) TcRL9 y (C) TcKM2.

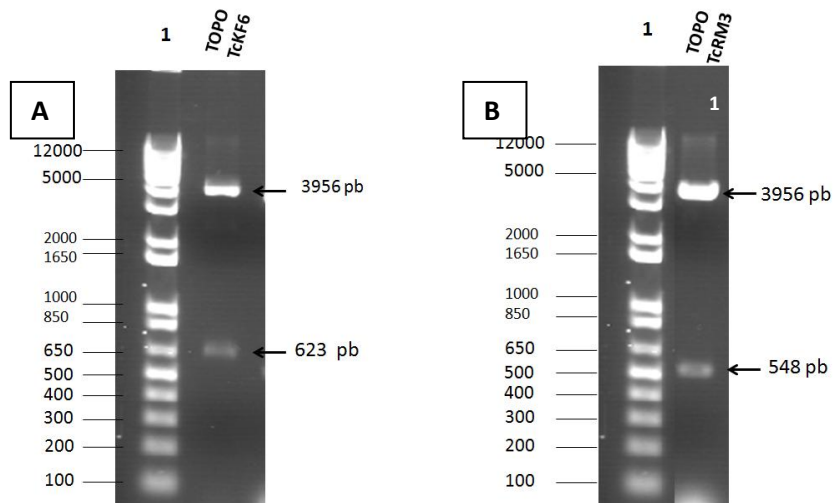


Fig. 8. Análisis por restricción con Eco RI de la clonación de los amplicones en el vector pCR® 4-TOPO®. Se observa la liberación de los insertos (A)RTcKF6 y (B) TcRM3.

Los fragmentos RTcKF6 y TcRM3 se purificaron y se subclonaron en marco de lectura abierto en los vectores pRSETB y pRSETC respectivamente previamente tratados con la enzima de restricción Eco RI para obtener los plásmidos pRSET-KF6 y pRSET-RM3. Se obtuvieron algunas colonias transformantes a las cuales se les realizaron análisis por restricción con Eco RI para verificar que se tenían clonados los genes de interés. Los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa (Figura 9), y los resultados muestran la liberación de inserto correspondiente de cada uno de los plásmidos.

3. Purificación de las proteínas recombinantes rTcKF6 y rTcM3

Las proteínas recombinantes rTcKF6 y rTcRM3 purificadas por cromatografía de afinidad se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, observándose que cada proteína migró como una banda única con un peso de 20kDa para la proteína rTcKF6 (Fig. 10) y de 18 kDa para la proteína rTcRM3 (Fig.11). ambas proteínas se obtuvieron con una gran pureza mayor al 95% al analizarlas por SDS-PAGE. Los resultados de los ensayos de Western Blot muestran que las proteínas purificadas son reconocidas por el anticuerpo anti-histidinas, observándose una sola banda en ambos casos, con los pesos esperados (Fig. 10 y 11). El rendimiento de la purificación para la proteína rTcKF6 fue de 16800µg/µl y para la proteína rTcRM3 de 7697 µg/µl.

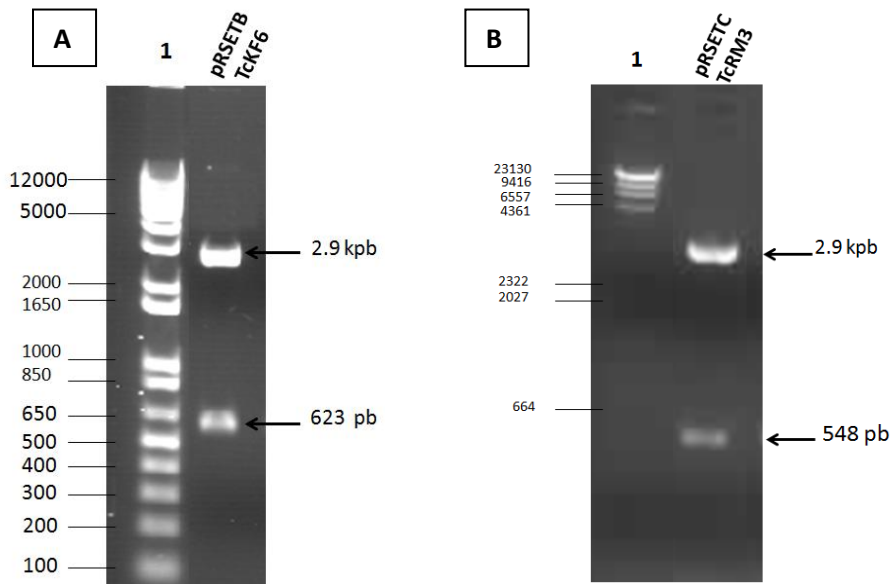


Fig 9. Análisis de los productos de digestión con la enzima Eco RI de los plásmidos pRSETB-KF6 (A) y pRSETC-RM3 (B).

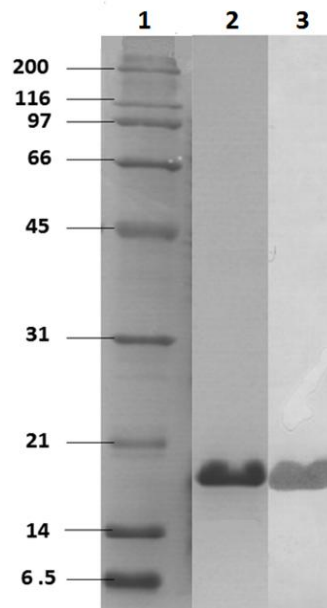


Fig.10. Purificación de la proteína His-rTcKF6. La proteína His-RTcKF6 purificada por cromatografía de afinidad se analizó por SDS-PAGE (2) y por inmunotransferencia (3) con anticuerpos anti-histidinas.

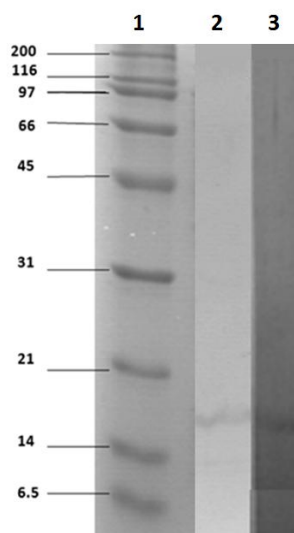


Fig.11. Purificación de la proteína His-rTcRM3. La proteína His-TcRM3 purificada por cromatografía de afinidad se analizó por SDS-PAGE (2) y por inmunotransferencia (3) con anticuerpos anti-histidinas.

Los ensayos de Western Blot con las proteínas recombinantes rTcKF6 y rTcRM3 dieron como resultado que estas son reconocidas por los sueros de ratones inmunizados con estas, lo cual comprueba su potencial inmunogénico, por otro lado también se probó que sueros chagasicos de ratones (no inmunizados) y humanos también reconocen las proteínas rTcKF6 y rTcRM3, sin embargo el reconocimiento de la proteína rTcRM3 por los sueros chagasicos de ratón y humanos fue menor en comparacion con el reconocimiento a la proteína rTcKF6. Los sueros preinmunes de ratón y humano no mostraron reconocimiento a las proteínas recombinantes (Fig. 12).

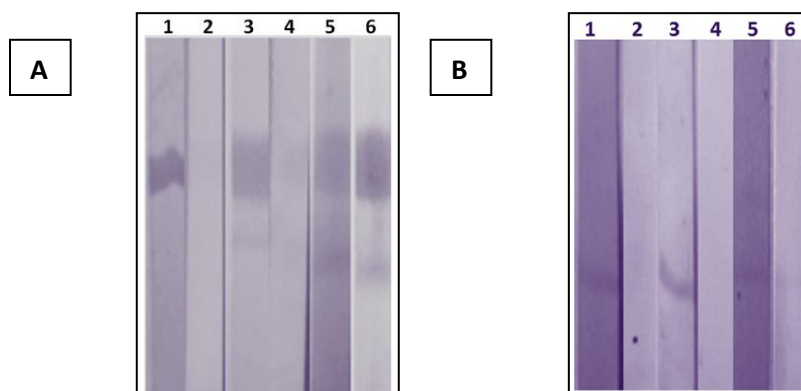


Fig.12. Inmunogenicidad de las proteínas rTcKF6 (A) y rTcRM3 (B). Inmunotransferencia de las proteínas purificadas en incubadas con 1) anticuerpos anti-histidinas, 2) suero preinmunes, 3) sueros inmunes, 4) suero humano no infectado, 5) suero humano chagásico y 6) suero de ratón infectado.

4. Análisis de la expresión de las proteínas nativas TcKF6 y TcRM3

El análisis de la expresión se realizó por ensayos de inmunotransferencia e utilizando los anticuerpos anti-TcKF6 y anti-TcRM3. Para tal fin, extractos totales de tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con cada uno de los anticuerpos policlonales obtenidos de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes respectivas. Los resultados se observa que los anticuerpos policlonales anti-TcKF6 reconocen proteínas en los extractos de los tres estadios; en tripomastigotes se observa el reconocimiento de tres proteínas de alto peso molecular (135, 180 y 200 kDa) y una proteína de 48 kDa, en amastigotes el anticuerpo policlonal reconoció 4 proteínas una proteína de 240 kDa, una de 200 kDa, otra de 135 kDa, y una de 48 kDa, tres de estas de estas reconocidas en el extracto anterior. en epimastogotes hubo reconocimiento de 11 proteínas, una 200 kDa, dos de 80 kDa a 140 kDa, 4 proteínas de 48 a 70 kDa (en estas se encuentra la proteína de 48 kDa fuertemente reconocida en los otros estadios), 4 proteínas son reconocidas específicamente en este estadio (dos con pesos entre 25 a 35 kDa y dos de 17 a 20 kDa) (Fig.13A). Cabe mencionar que el peso molecular esperado de la proteína nativa es de 20 kDa. Para el caso de los anticuerpos policlonales anti-TcRM3, estos reconocieron de forma débil solamente una proteína de 48 kDa en trypomastigotes y amastigotes, mientras que en epimastigotes se observan 9 proteínas (135, 100, 75, 55, 48, 35, 30, 20 y 17 kDa) (Fig. 13B). El peso molecular de la proteína nativa esperado es de 17 kDa. Es importante mencionar que como un control negativo se usó un pool de los sueros preinmunes de ambos grupos de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes y ninguno de los dos presento reconocimiento de proteínas en los extractos de los tres estadios del parásito (datos no mostrados).

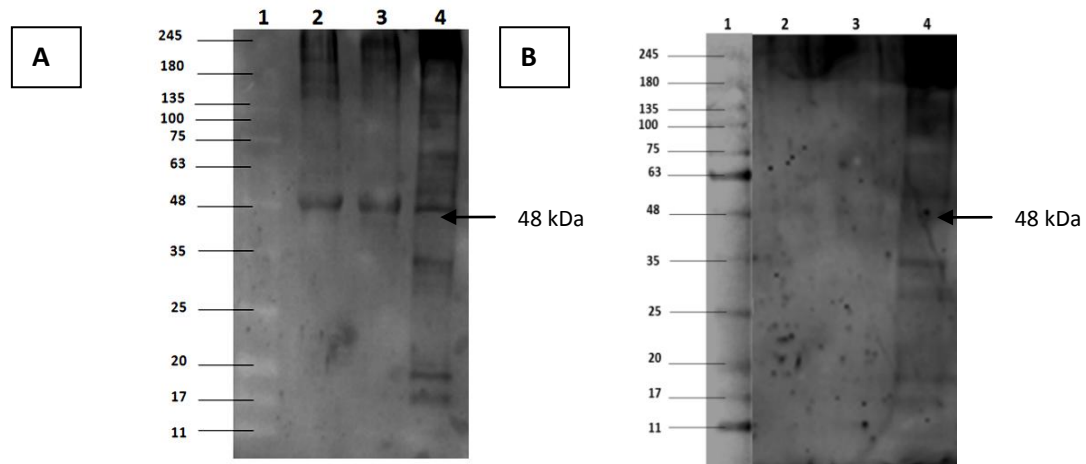


Fig.13. Reconocimiento de proteínas en extractos totales de *Trypanosoma cruzi* por sueros de ratones inmunizados con las proteínas rTcKF6 (panel A) y rTcRM3 (panel B). 1) marcadores de peso molecular, 2) extractos totales de tripomastigotes, 3) extractos totales de amastigotes y 4) extractos totales de epimastigotes.

5. Localización subcelular de las proteínas nativas TcKF6 y TcRM3.

Con la finalidad de analizar la distribución subcelular de las proteínas nativas TcKF6 y TcRM3 en el parásito, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia como se describe en materiales y métodos, usando los anticuerpos policlonales anti-TcKM6 y anti-TcRM3. Como controles se utilizaron el suero de ratones infectados con tripomastigotes y el suero preinmune de cada grupo experimental; estos sueros control se ensayaron con amastigotes (Fig. 14), tripomastigotes (Fig 15) y epimastigotes (Fig. 16). Los resultados mostraron que el suero de los ratones infectados contiene anticuerpos que reconocen a los tres estadios, mientras que los sueros preinmunes no presentan reconocimiento alguno. Con respecto a los anticuerpos policlonales anti-rTcKF6, éstos presentan reactividad con componentes de la membrana plasmática y del citoplasma en los tres estadios (Figuras 17, 18, y 19). Con respecto a los anticuerpos policlonales anti-TcRM3, es débil el reconocimiento en membrana plasmática y en el citoplasma de los amastigotes (Fig. 20) y de los epimastigotes (Fig. 22), mientras que en los tripomastigotes el reconocimiento fue más intenso en ambos compartimientos celulares (Fig. 21).

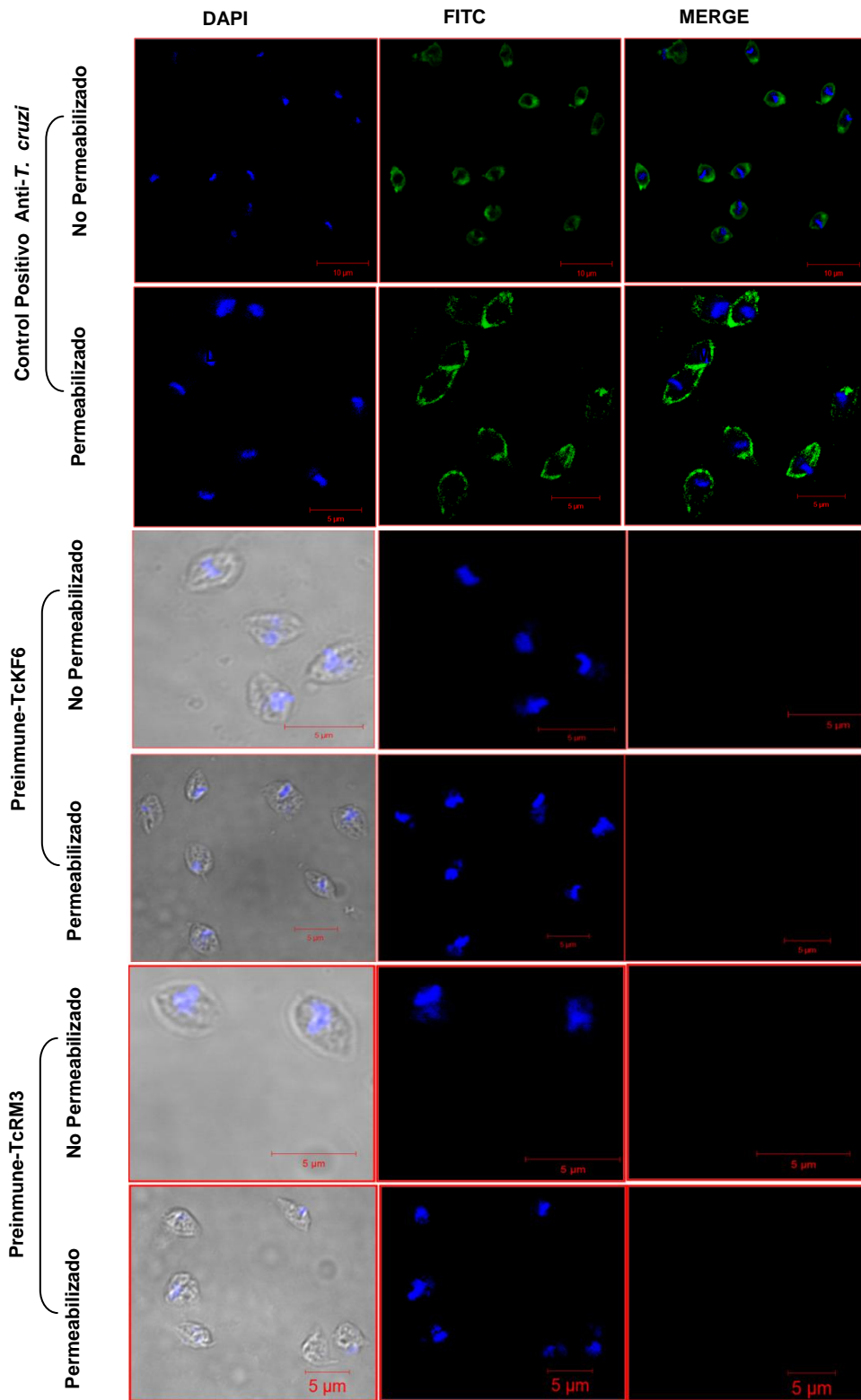


Fig.14. Inmunofluorescencias en preparaciones de **amastigotes** con anticuerpos anti-*T. cruzi* (control positivo) y sueros preinmunes (control negativo) de ratones que fueron posteriormente inmunizados con las proteínas recombinantes.

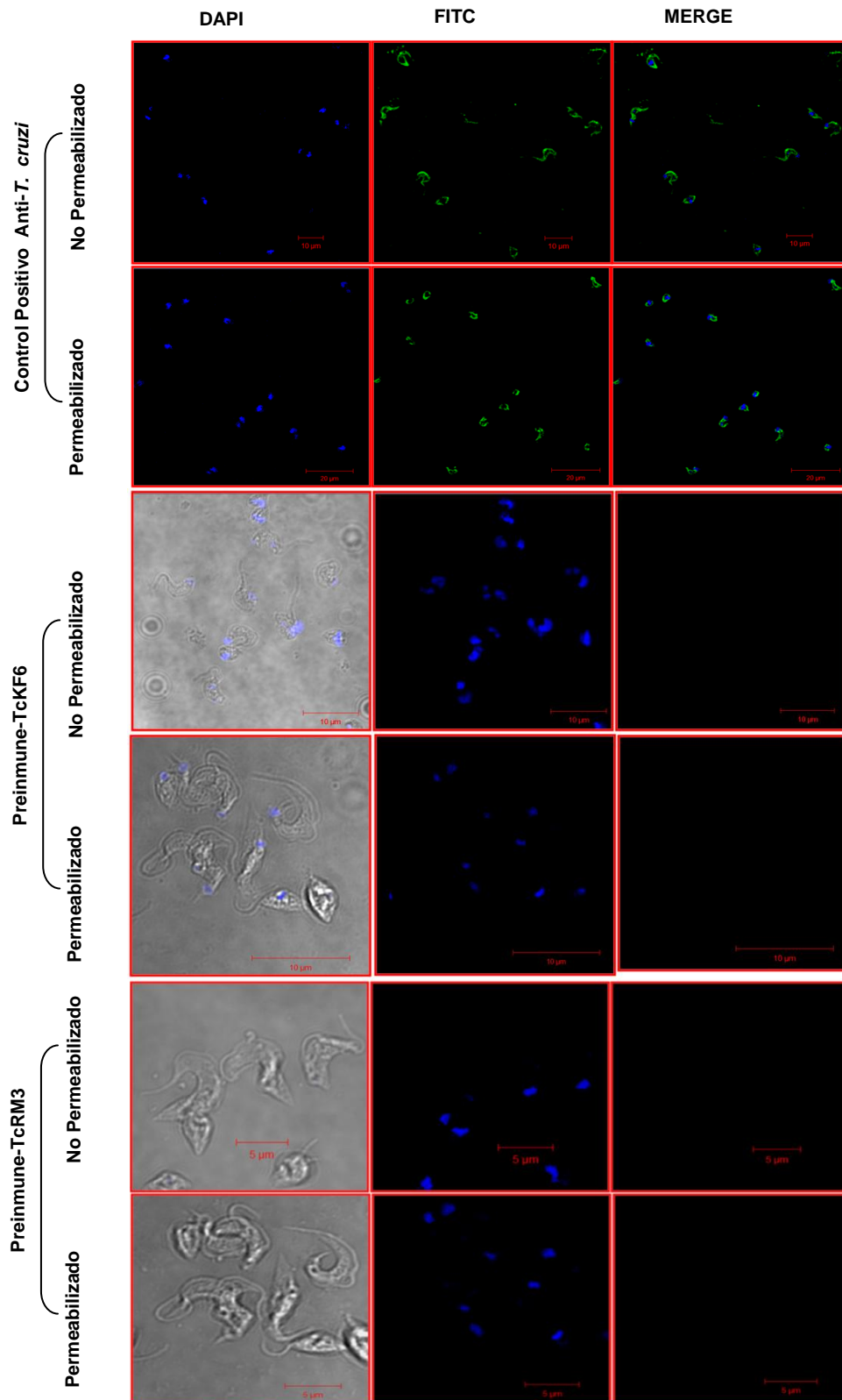


Fig.15. Inmunofluorescencias en preparaciones de **tripomastigotes** con anticuerpos anti-*T. cruzi* (control positivo) y sueros preinmunes (control negativo) de ratones que fueron posteriormente inmunizados con las proteínas recombinantes.

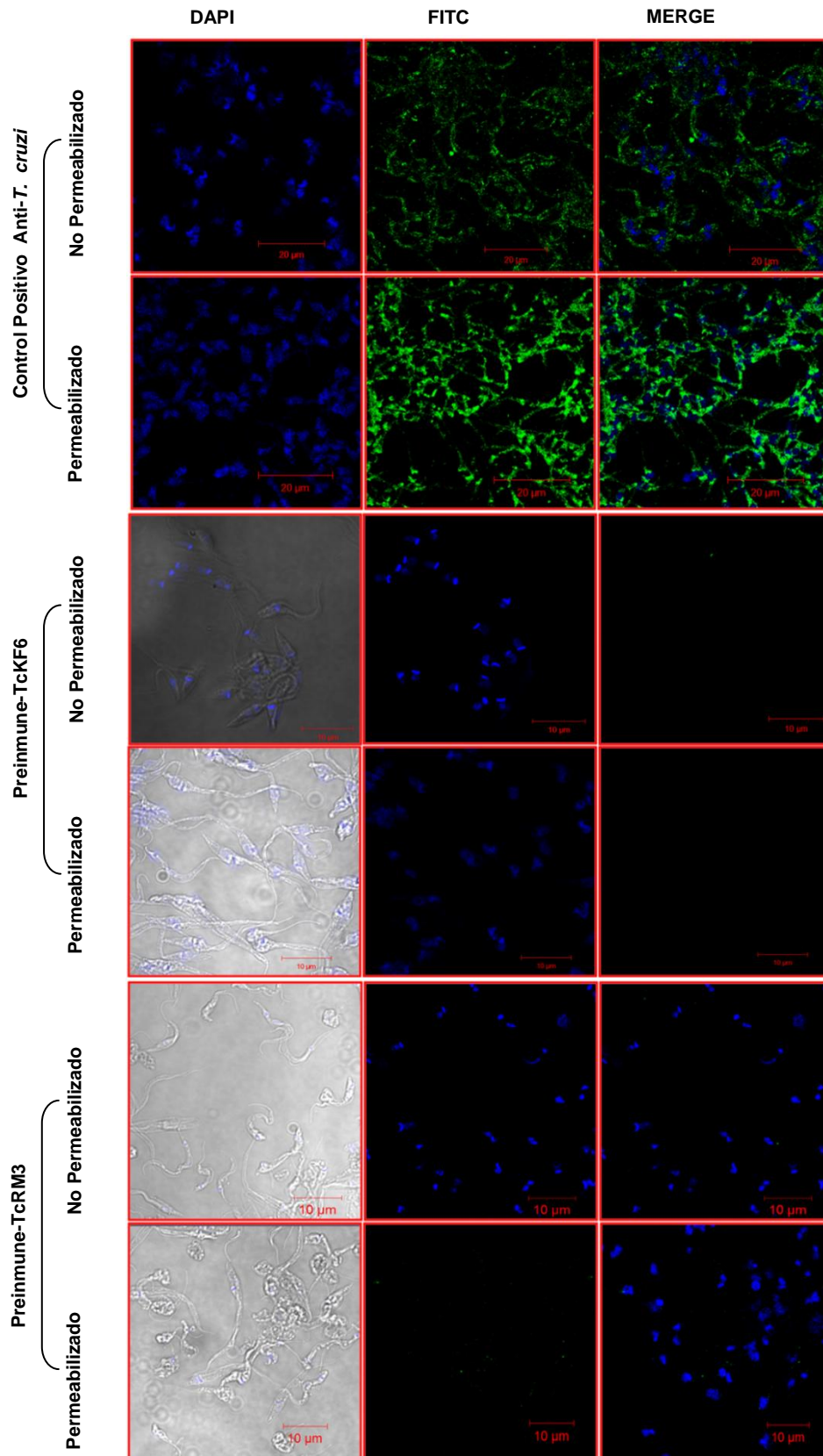


Fig.16. Inmunofluorescencias en preparaciones de **epimastigotes** con anticuerpos anti-*T. cruzi* (control positivo) y sueros preinmunes (control negativo) de ratones que fueron posteriormente inmunizados con las proteínas recombinantes.

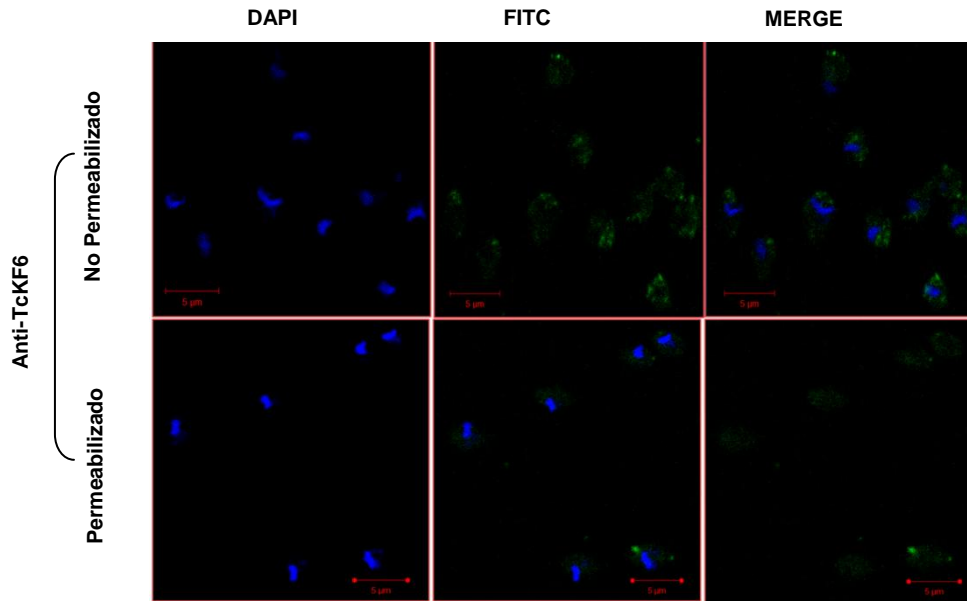


Fig.17. Inmunofluorescencias en preparaciones de **amastigotes** con anticuerpos policlonales anti-rTcKF6. Se observa reconocimiento en membrana plasmática (parásitos no permeabilizados) y en citoplasma (parásitos permeabilizados).

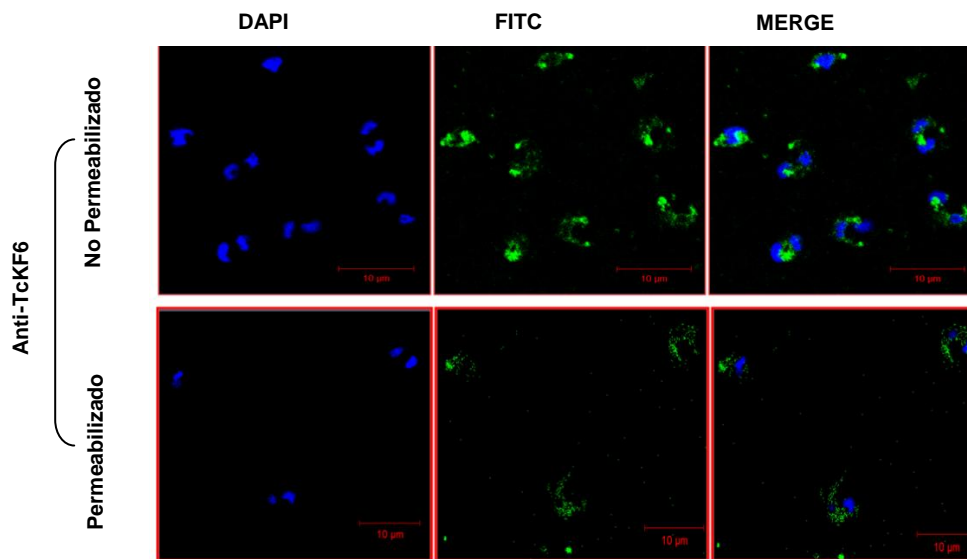


Fig.18. Inmunofluorescencias en preparaciones de **trypomastigotes** con anticuerpos policlonales anti-rTcKF6. Se observa fuerte reconocimiento en membrana plasmática (parásitos no permeabilizados) y más bajo en citoplasma (parásitos permeabilizados).

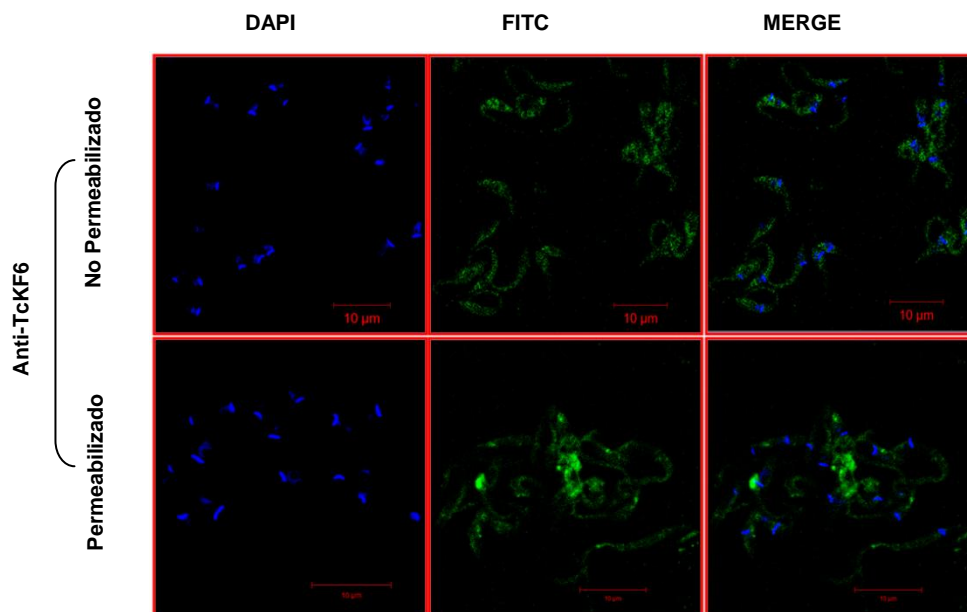


Fig.19. Inmunofluorescencias en preparaciones de **epimastigotes** con anticuerpos policlonales anti-rTcKF6. Se observa fuerte reconocimiento en membrana plasmática (parásitos no permeabilizados) y citoplasma (parásitos permeabilizados).

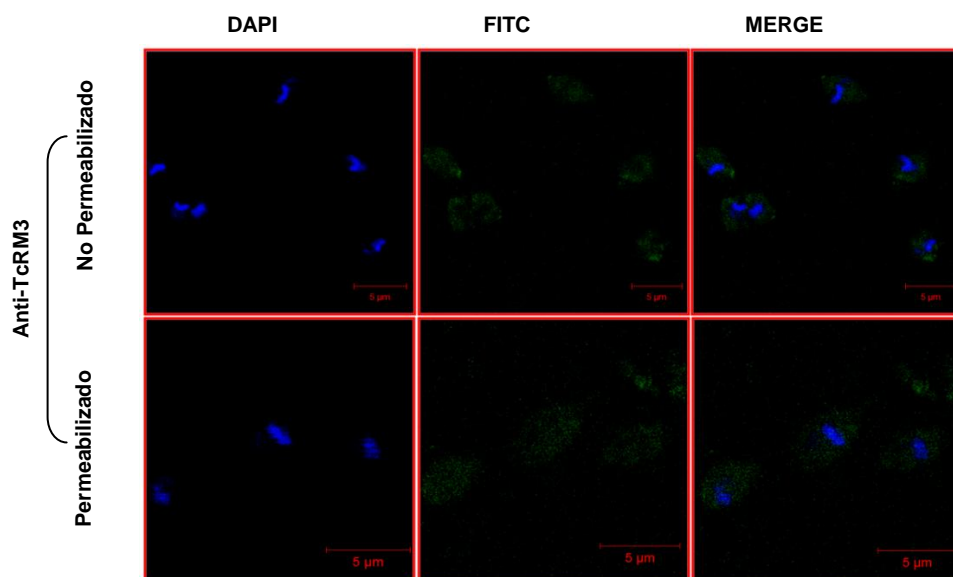


Fig.20. Inmunofluorescencias en preparaciones de **amastigotes** con anticuerpos policlonales anti-rTcRM3. Se observa reconocimiento débil en membrana plasmática (parásitos no permeabilizados) y citoplasma (parásitos permeabilizados).

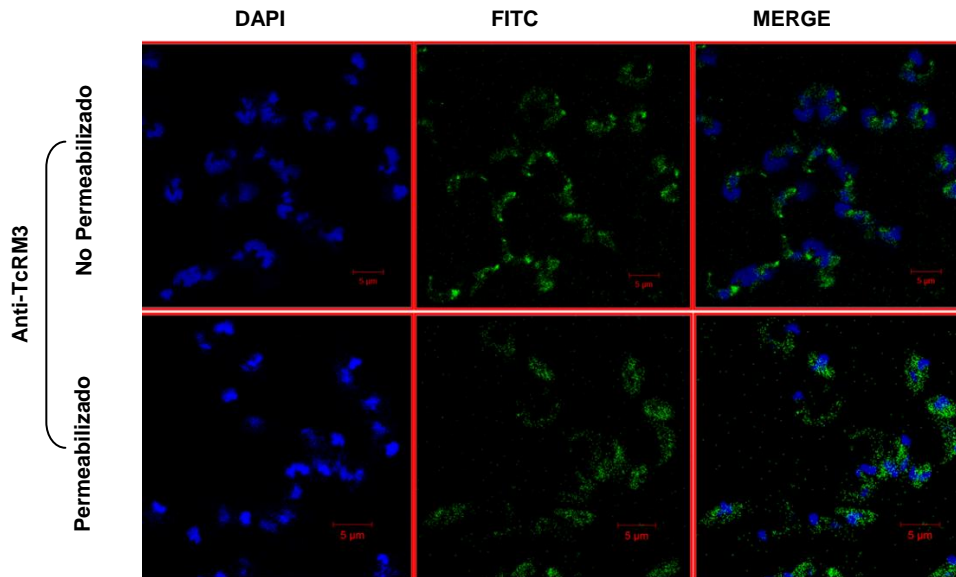


Fig.21. Inmunofluorescencias en preparaciones de **tripomastigotes** con anticuerpos policlonales anti-rTcRM3. Se observa reconocimiento fuerte en membrana plasmática (parásitos no permeabilizados) y citoplasma (parásitos permeabilizados).

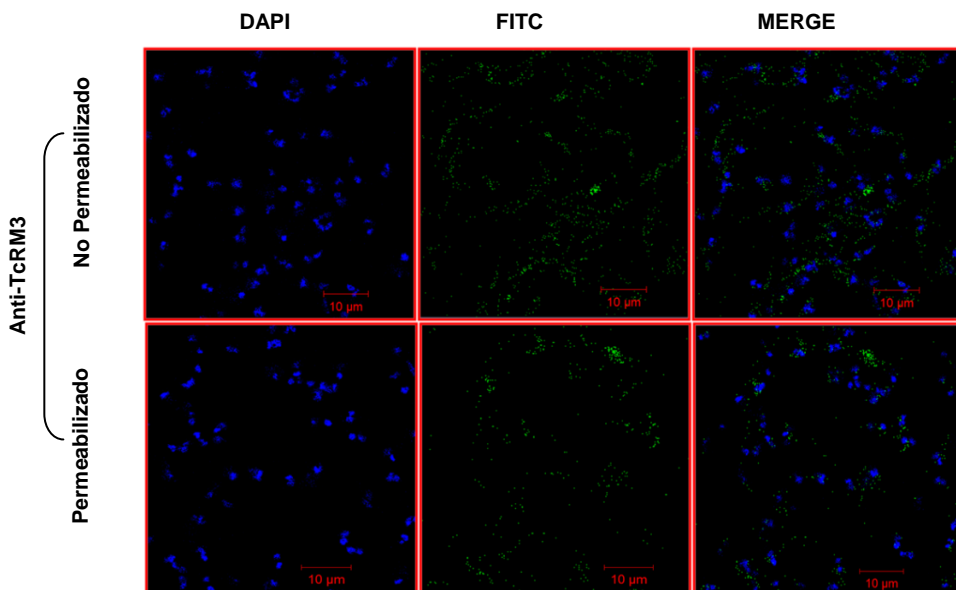


Fig.22. Inmunofluorescencias en preparaciones de **epimastigotes** con anticuerpos policlonales anti-rTcRM3. Se observa reconocimiento débil en membrana plasmática (parásitos no permeabilizados) y citoplasma (parásitos permeabilizados).

6. Parasitemia y mortalidad de ratones inmunizados con proteínas recombinantes

Para evaluar si la inmunización con las proteínas recombinantes podría inducir inmunidad protectora contra la infección aguda, dos semanas posteriores a la última inmunización con la proteína TcKF6, los animales fueron retados vía i.p con 2×10^4 formas viables de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa H8. Los niveles de parasitemia se empezaron a monitorear 14 días pos-infección y la sobrevivencia de todos los animales fue registrada durante veintiseis días posteriores a la infección inicial, como se describe en la sección de materiales y métodos. El perfil de parasitemia mostró que al inicio de la infección (14 días) no hubo disminución de la parasitemia en el grupo inmunizado con respecto a los grupos control, a los 16 días se observó un aumento de la parasitemia en todos los grupos aunque para el grupo inmunizado con la proteína TcKF6 fue 31% menor con respecto al grupo control inmunizado únicamente con Titer-Max y PBS y 36% menor con respecto al grupo control no inmunizado, Para el día 18 los valores de parasitemia fueron variables en los tres grupos sin observarse una diferencia importante, y en días posteriores se observó un aumento de la parasitemia en el grupo inmunizado con la proteína pero a partir del día 22 ésta disminuyó (Fig. 23A). También se analizó el efecto de la inmunización sobre la sobrevivencia de los animales infectados y se observó que a partir de los 16 después de la inmunización (dpi) se empezó a registrar mortalidad en el grupo inmunizado con un 75% de sobrevivencia, para el día 18 se presentó un 50% al igual que para el grupo control inmunizado con Titer-Max y PBS y para el grupo control no inmunizado se presentó una sobrevivencia de únicamente 25%. Para el día 20 dpi los dos grupos control tenían un 0% de sobrevivencia a diferencia del grupo inmunizado con la proteína recombinante que presentaba un 50% de sobrevivencia, manteniéndose esto hasta los 24 dpi (Fig. 23B). De los datos obtenidos se concluye que la inmunización con rTCKF6 retarda la mortalidad de los ratones infectados.

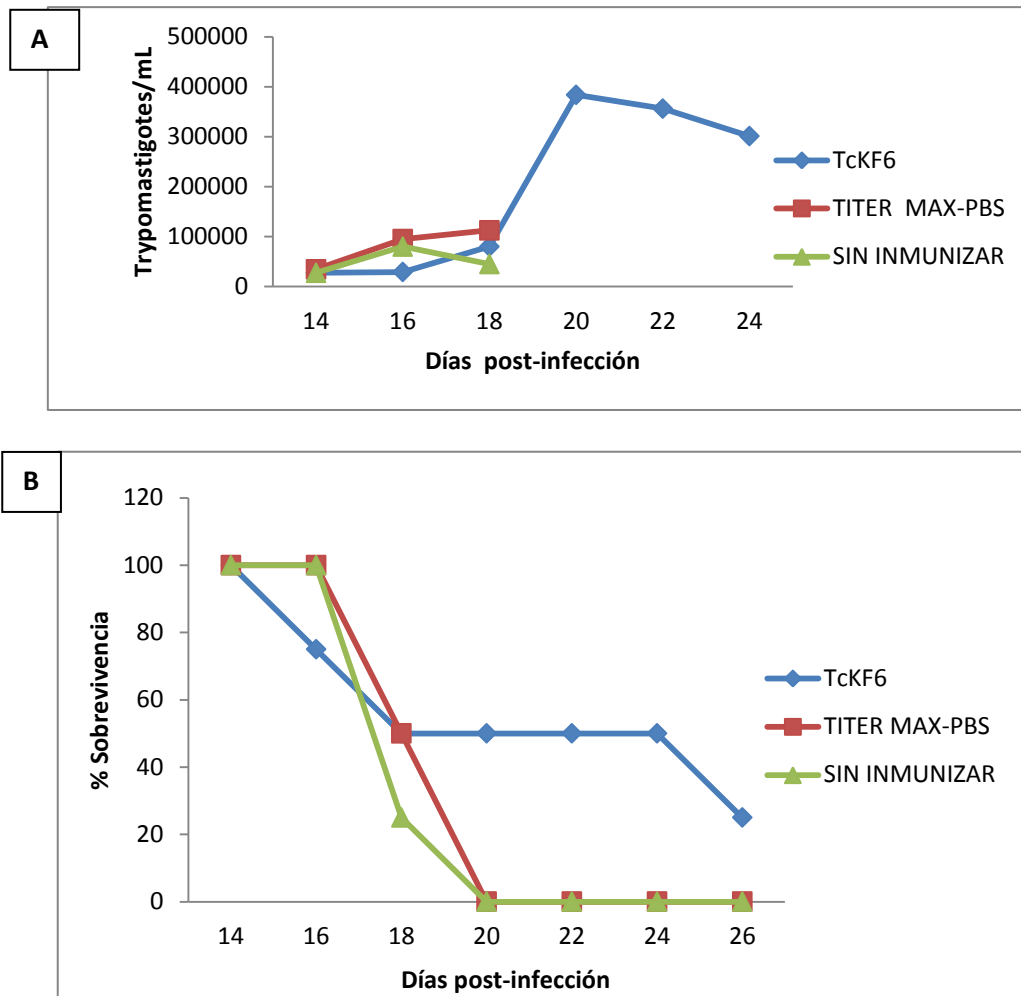


Fig.23. Parasitemia y sobrevivencia en ratones inmunizados con la proteína recombinante TcKF6. Ratones inmunizados con la proteína rTcKF6, Titer Max-PBS o no inmunizados, se inocularon con tripomastigotes sanguíneos y se monitoreó la parasitemia (A) y la sobrevivencia (B) después del reto parasitario.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Trypanosoma cruzi presenta un gran número de determinantes antigénicos al sistema inmune del hospedero mamífero durante el transcurso de la infección y su reconocimiento varía dependiendo de la fase de la enfermedad (Frash *et al.*, 1989; Umezawa *et al.*, 1996). En el hospedero se induce una respuesta inmune tanto humoral como celular que reduce los niveles de parasitemia, pero no se elimina por completo el parásito (Tanowitz *et al.*, 1992).

A la fecha no hay vacunas 100% efectivas contra la enfermedad de Chagas. En los últimos años varios estudios se han centrado en el desarrollo de una vacuna eficaz para el control de la infección por *T. cruzi*, por lo cual una amplia gama de formulaciones de vacunas han sido evaluadas (Ej. DNA, proteínas recombinantes) y se ha logrado observar que varias son capaces de conferir cierta protección contra la infección (Planelles *et al.*, 2001; Garg y Tarleton, 2002; Bhatia y Garg, 2008; Fralish y Tarleton, 2003; Morell *et al.*, 2006).

En la mayoría de los estudios realizados se han trabajado con antígenos de superficie del parásito (Tekiel *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta el momento la inmunidad conferida por los antígenos usados no ha sido capaz de prevenir la infección y en muchos casos no ha sido capaz de generar una alta sobrevivencia en los animales inmunizados cuando son infectados, no obstante sus resultados si han establecido su potencial inmunogénico, sugiriendo la utilidad como vacunas de este tipo de antígenos de superficie en el control de la infección y la enfermedad.

De tal manera el propósito de este trabajo fue seleccionar y caracterizar algunos antígenos de superficie de *T. cruzi* mediante el uso de un enfoque conocido como vacunología reversa el cual está basado en el escaneo de bases de datos del genoma del patógeno mediante herramientas bioinformáticas para identificar candidatos potenciales para desarrollar una vacuna (Seib, 2012).

En la primera etapa de este trabajo se separaron las proteínas de membrana de las proteínas que no son de membrana, esto con el programa TMHMM y se obtuvo que 24.7% de las proteínas poseían hélices transmembranales. En un estudio previo Silber y Pereira (2012), analizaron 19673 genes de *Trypanosoma cruzi* que codifican proteínas y encontraron que alrededor del 26% (5174 genes) de los genes de *T. cruzi* codifican proteínas putativas de membrana, de este porcentaje el 48% son anotadas como proteínas hipotéticas. Esta predicción coincide con el obtenido en este trabajo, sin embargo es importante mencionar que la cantidad de genes analizados fue mayor en el trabajo de Silber y Pereira (2012). El programa para predicción de hélices transmembranales también ha sido usado para predecir proteínas de membrana en especies de *Leishmania major* y *Leishmania infantum*, John y colaboradores (2012), y por comparación de ambos genomas con el enfoque de vacunología reversa se encontraron 8122 proteínas comunes de las cuales 16.6% correspondían a proteínas de membrana plasmática.

En este estudio se seleccionaron de la lista de proteínas de membrana, aquellas secuencias que poseían repetidos en tándem. Se ha visto que las proteínas con amino ácidos repetidos en tándem (proteínas TR) están ampliamente distribuidas en todos los organismos y han sido descritas en varios patógenos incluyendo los agentes de la tripanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*), malaria (*Plasmodium* spp.), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) y leishmaniasis (*Leishmania* spp.) (Ibañez *et al.*, 1988; Hoft *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1989; Schofiel, 1991; Burns *et al.*, 1992, Burns *et al.*, 1993; Gruber y Zingales, 1993; Bhatia *et al.*, 1999; Buscaglia *et al.*, 1999). Están presentes en muchos de sus antígenos inmunodominantes y su función es poco conocida, pero se ha sugerido que están implicados en la unión a receptores de las células del hospedero y la activación de linfocitos B, por lo tanto dichas secuencias se seleccionaron con el objetivo de que funcionaran como blanco de las células B en la respuesta inmune generada por la inmunización con las proteínas recombinantes. En los resultados de este trabajo se encontró que 1.4% de las proteínas analizadas (160 proteínas) poseen repetidos, este valor coincide con lo reportado previamente para *T. cruzi* (alrededor del 1-2% del total de genes) (Goto y Carter, 2008).

Las proteínas cinasas (PKs) son mediadores clave de la transducción de señales para la coordinación de procesos intracelulares como son control transcripcional, progresión del ciclo celular y diferenciación. La búsqueda bioinformática en la base de datos PFAM de proteínas cinasas eucarióticas (ePKs) y proteínas cinasas atípicas (aPKs) en el genoma de tripanosomatidos revelo un total de 176 PKs en *T. brucei*, 199 in *L. major* y 190 in *T. cruzi*, de este ultimo 171 corresponden a cinasas eucarióticas (ePKs) que son probablemente calificadas como activas y 19 genes de proteínas cinasas atípicas (Parsons *et al.*, 2005). El kinoma completo de tripanosomatidos es aproximadamente el 30% del número en su hospedero humano (Manning *et al.*, 2002), aproximadamente 33% mas grade que el de *Saccharomyces cerevisiae* y el doble del de *Plasmodium falciparum* (Ward *et al.*, 2004). El número de cinasas en los tres parásitos sugiere que la fosforilación es un mecanismo importante para la regulación celular en los tres parásitos, por lo cual en este trabajo se decidió seleccionar de las proteínas de membrana aquellas que tuviesen dominios cinasas en su secuencia.

Mediante la búsqueda en la base de datos de PFAM se obtuvo una lista de 595 proteínas de *Trypanosoma cruzi* que poseen dominio cinasa, este número es mayor que el reportado previamente para *T. cruzi* en el 2005, pero es importante mencionar que la base de datos usada en este trabajo fue la versión del 2013 que considera también a secuencias de proteínas clasificadas como de función putativa.

El kinoma de tripanosomatidos difiere en varias vías del de su huésped humano, una diferencia clave es que en tripanosomatidos se pierden las familias de cinasas ligadas a receptores (tirosina cinasas TK) y las tirosinas cinasas citosólicas (TKL), aunque pueden tener cinasas de especificidad dual atípicas (Parsons *et al.*, 2005). Esto coincide los resultados obtenidos en este trabajo ya que las proteínas seleccionadas poseían dos de ellas (TcKM2 yTcKW8) dominio cinasa de doble especificidad Ser/Thr/Tyr cinasa y una de ellas (TcKF6) con un solo dominio Serina/Threonina cinasa.

En la enfermedad de Chagas se ha reportado que la resistencia a la infección depende de una respuesta inmune humoral y celular por el hospedero, requiriendo la

activación de las células NK, linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, así como anticuerpos líticos. Las citocinas también están activamente involucradas, resaltando la importancia de IFN- γ y TNF- α (respuesta inmune tipo Th1) durante la infección (Tarleton, 1995; Hunter *et al.*, 1996; Camargo *et al.*, 1997; Sathler-Avelar *et al.*, 2003). Los linfocitos T CD4⁺ participan en el control de *T. cruzi* a través de la secreción de citocinas tipo Th1 y pueden estimular la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, los cuales aparecerán como la protección sistémica central contra la infección de *T. cruzi* (Padilla *et al.*, 2009; Parodi *et al.*, 2009). Las células T CD8⁺ contribuyen al control de *T. cruzi*, actuando indirectamente mediante la secreción de IFN- γ para activar macrófagos y directamente a través de la producción de perforina y su concomitante actividad citotóxica (de Alencar *et al.*, 2009).

Un gran número de estudios utilizando diferentes formulaciones de vacunas han establecido previamente que una respuesta inmune tipo Th1 caracterizada por la producción de IFN- γ se requiere para el control del parásito (Bhatia y Garg, 2005; Dumonteil, 2007). Nuevos vectores virales recombinantes se han descrito recientemente, tales como el virus de la fiebre amarilla expresando ASP-2 (Nogueira *et al.*, 2011), y el virus de la influenza que expresa un único epítipo dominante CD8⁺ (Takayama *et al.*, 2010). Se ha observado que la inmunización con una vacuna de adenovirus que expresan este epítipo es suficiente para inducir protección, destacando el papel central de la población de células T en el control del parásito (Miyahira *et al.*, 2005). Por lo anterior la identificación de antígenos con epitopos para el MHC clase I es un punto crucial para el desarrollo de vacunas contra *T. cruzi*.

La fase aguda de la enfermedad de Chagas se caracteriza por una activación policlonal de células B, con un incremento notorio de todos los subtipos de inmunoglobulinas. Se ha observado en el modelo murino que hay una activación preferente de los isotipos IgG2a e IgG2b (Ortiz-Ortiz *et al.*, 1980; D'Imperio-Lima *et al.*, 1985; Minoprio *et al.*, 1986; García *et al.*, 1997). Los principales mecanismos del sistema inmune para el control del parásito son a través de la activación de macrófagos y anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*. Los anticuerpos no solo están involucrados en la resistencia a la infección por *T. cruzi* mediante el proceso de opsonización y a través

de la destrucción mediada por complemento (Kierszenbaum y Howard, 1976; Krettli y Brener, 1976; Almeida *et al.*, 1991).

Se ha visto que la actividad tripanolítica y de aglutinación de los anticuerpos específicos de antígenos están correlacionadas con la protección a la infección de (Sepulveda *et al.*, 2000; Umekita y Mota, 2000). Por tal motivo hizo la predicción de epítomos para linfocitos B, con lo cual se buscara promover la respuesta de inmune más efectiva al conjugarse con las respuesta de células T citotóxicas buscada con la predicción de epítomos.

Una vez seleccionadas las proteínas de membrana con dominio cinasa o repetidos en tándem se procedió a realizar la predicción de epítomos para linfocitos T citotóxicos y linfocitos B en las regiones extracelulares de estas proteínas. Estas secuencias extracelulares fueron seleccionadas para evitar dificultades en los procedimientos de clonación ya que ha sido reportados que 250 de 600 candidatos a vacuna de *N. meningitides* fallaron para ser clonado y expresados debido a la presencia de más de una hélice transmembranal (Pizza *et al.*, 2000). Por lo tanto se evitaron los problemas de clonación que pudiesen ser generados por la presencia de estas. Otro aspecto por el cual fue considerada esta región extracelular es porque puede proveer residuos de aminoácidos que interactúen con proteínas del hospedero y servir para generar respuesta inmune.

Un candidato a vacuna con secuencias similares a las del hospedero (ej. humano o ratón) es probable que sea un pobre inmunógeno o que se genere autoinmunidad debido mimetismo de epitomos (Nachamkin *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2009). Considerando este aspecto se realizó un BLAST en el genoma de humano y ratón de las proteínas TcKF6 y TcRM3 que fueron inmunizadas en ratones. El resultado del BLAST con TcKF6 en el genoma humano dio como resultado que el porcentaje de identidad no es mayor del 43% en ninguna de las secuencias con homología detectadas, las cuales son de la familia Serina/Treonina cinasas, y se observó una secuencia conservada (GTPYYLSPE), la cual al ser analizada resultó ser un dominio putativo conservado de la familia de cinasas. El

resultado del BLAST de la proteína TcKF6 en el genoma de ratón resultó en que hay un porcentaje de no más del 43% con varias isoformas de la proteína Nek que es una cinasa Serina/Treonina. En el caso de los resultados del BLAST de la proteína TcRM3 con el genoma de humano se reportó similitud con algunas proteínas con porcentajes no mayores al 36% al igual que con el genoma de ratón.

Todos estos procedimientos bioinformáticos dieron como resultado la selección de 6 genes de *T. cruzi* que codifican proteínas putativas de membrana como candidatos a vacuna, tres de ellas con dominio cinasa y 3 que poseían secuencias de repetidos en tándem, una para cada estadio del parásito en cada uno de los casos. De los 6 genes seleccionados 5 fueron amplificados a partir del DNA genómico de *T. cruzi*, de los cuales dos se expresaron correctamente en los vectores pRSETB y pRSETC. Lo cual demuestra hasta este punto que el enfoque bioinformático fue útil en la selección de proteínas que pudiesen ser obtenidas de forma recombinante.

Los resultados de los ensayos de Western Blot mostraron el reconocimiento de las proteínas recombinantes TcKF6 y TcRM3 por el suero de los ratones inmunizados con dicha proteínas, lo cual corrobora su inmunogenicidad predicha mediante el programa LEPS. Por otro lado, las proteínas recombinantes también fueron reconocidas por sueros de ratones y humanos infectados lo cual demuestra que estas proteínas podrían ser expresadas *in vivo* en al menos en los dos estadios del parásito que son amastigotes y trypomastigotes presentes en el hospedero.

Para comprobar la expresión de la proteína TcKF6 en tripomastigotes y TcRM3 en amastigotes de determinada por la busca de ESTs se realizaron los ensayos de inmunotransferencia con extractos totales de tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes. Los anticuerpos policlonales anti-TcKF6 mostraron reconocimiento principalmente de una proteína de 48 kDa en extractos totales de los tres estadios, sin embargo en epimastigotes hubo reconocimiento de más proteínas que en los extractos de los otros dos estadios. También se detectaron al menos un par de proteínas más en tripomastigotes que en amastigotes, lo cual correlaciona con lo observado en los ensayos de inmunofluorescencia en donde el marcaje del anticuerpo anti-TcRF6 fue débil en amastigotes tanto en membrana como en citoplasma, mientras que

trypomastigotes se observó un reconocimiento considerable en membrana y muy débil en citoplasma, y en epimastigotes se observó un marcaje fuerte tanto en membrana como en citoplasma.

En el caso de los anticuerpos policlonales anti-TcRM3, éstos reconocieron varias proteínas en extractos de epimastigotes y únicamente una proteína fue débilmente reconocidas en trypomastigotes y amastigotes, comparando con los resultados de las inmunofluorescencias en donde el reconocimiento en amastigotes fue débil tanto en membrana plasmática como en citoplasma, sin embargo el marcaje en trypomastigotes fue fuerte tanto en membrana como citoplasma, y en epimastigotes el marcaje fue débil en ambas localizaciones.

Realizando un BLAST con las secuencias de las proteínas recombinantes TcKF6 y TcRM3 en la base de datos TriTrypDB se observó que la secuencia de la proteína TcKF6 posee homología de más del 90% con otras proteínas proteína cinasas de la misma especie y cepa de *T. cruzi*, las cuales podrían expresarse en otros estadios, así como con proteínas de otras cepas y también con especies diferentes de tripanosomatidos como *Trypanosma vivax*, *T. brucei*, *T. congolense*, *Leishmanioia major* y *Leishmania braziliensis*. El resultado del BLAST de TcRM3 muestra que esta tiene homología del 50% al 98% con otras proteínas de tripanosomas como *T. rangeli*, *T. grayi*, *T. bruci*, *T. vivax* y *T. congolense* y homología en porcentajes del 35 al 50% con especies de leishmania como *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. major* y *L. infantum*. Lo anterior podría explicar los resultados obtenidos tanto en los ensayos de inmunotransferencia donde proteínas del tamaño esperado y diferentes fueron detectadas en extractos de epimastigotes, así como en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, donde como ya menciono anteriormente hubo reconocimiento del anticuerpo en los diferentes estadios.

En la búsqueda de una proteína que funcione como vacuna hay dos estadios del parásito contra los cuales se ha enfocado el desarrollo de una vacuna efectiva. Las vacunas contra trypomastigotes metacíclicos o sanguíneos podrían impedir el inicio y/o la persistencia de la infección y limitar la parasitemia. Las vacunas contra amastigotes

intracelulares replicativos podrían detener la propagación de parásitos en el hospedero y prevenir la liberación de los parásitos al torrente sanguíneo. Ambos tipos de vacunas podrían arrestar o atenuar el desarrollo de la enfermedad en los seres humanos y en otros mamíferos reservorios. Además, las vacunas contra cualquiera de estas etapas del parásito podrían prevenir la infección por triatominos y, por lo tanto, interrumpir o reducir la transmisión del parásito tanto en poblaciones humanas como en los reservorios y también en los insectos (Vázquez-Chagoyan, 2011). Por lo tanto las proteínas TcKF6 y TcRM3 que se expresan en diferentes estadios del parásito podrían ser buenos candidatos a vacunas.

Únicamente una de las proteínas recombinantes fue utilizada para ensayo de protección en los ratones, estos mostraron una disminución variable en la parasitemia y un 50% de mortalidad en los ratones inmunizados contra un 100% de los ratones no inmunizados, debido posiblemente a que el reto parasitario fue demasiado alto. Estos resultados indican que en estas condiciones la inmunización con la proteína TcKF6 no induce inmunidad protectora en la fase aguda de la infección (parasitemia) pero si puede inducir una inmunidad moderadamente protectora en la fase crónica (sobrevivencia) en el modelo experimental de la enfermedad de Chagas. Futuros ensayos con dosis menores de tripanosomas podrían determinar si efectivamente TcKF6 es capaz de inducir mayor protección.

El proceso de la vacunología reversa se ha aplicado a varios patógenos, incluyendo *Neisseria meningitidis* del serogrupo B, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y cepas patógenas de *Escherichia coli*, y ha proporcionado decenas de nuevos antígenos candidatos para la investigación preclínica y clínica (Pizza *et al.*, 2000; Wizemann *et al.*, 2001; Mora y Bensi, 2005; Falugi *et al.*, 2008; Moriel *et al.*, 2010). El desarrollo de una vacuna contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (MenB) representa el primer ejemplo de la utilidad de la vacunología reversa (Toneatto *et al.*, 2011). En *Trypanosoma cruzi* además de este trabajo hay otros en los que ya se ha reportado la aplicación de este enfoque (Bhatia *et al.*, 2004; Bhatia y Garg, 2008). ya que gracias a la secuenciación del genoma (El-Sayed *et al.*, 2005) se ha abierto un potencial grande para llevar a

cabo a gran escala la detección e identificación de genes de interés como vacunas.

VIII. CONCLUSIÓN

En conclusión se demuestra la eficacia del análisis bioinformático aquí reportado en la identificación de nuevas proteínas del parásito *Trypanosoma cruzi* que podrían ser útiles como candidatos a vacuna. Específicamente nuestros datos muestran la identificación de 6 genes, que corresponden a 3 proteínas cinasas putativas (TcKF6, TcKM2 y TcKW8) y a 3 proteínas que poseen repetidos de amino ácidos en Tandem en su secuencia (TcRM3, TcRL9 y TcRE6). De estas se comprobó la expresión en membrana plasmática en los tres estadios de desarrollo del parásito y en citoplasma de dos de estas proteínas TcKF6 y TcRM3 en consecuencia es importante evaluar el potencial que tienen para inducir inmunidad protectora.

IX. PERSPECTIVAS

- Expresar y purificar las proteínas recombinantes TcKW8, TcRL9 y TcKM2 e inmunizarlos en ratones BALB/c, además de comprobar la localización subcelular de las proteínas nativas.
- Analizar el isotipo de anticuerpos y citocinas producidos en ratones BALB/c inmunizados con las proteínas recombinantes TcKF6, TcKW8, TcKM2, TcRL9 y TcRM3 anterior y posterior al reto parasitario con *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar la parasitemia y mortalidad en ratones BALB/c inmunizados con las proteínas recombinantes TcKM2, TcKW8, TcRM3, TcRL9 y TcRE6.
- Realizar ensayos de protección por inmunización con DNA de las proteínas correspondientes

X. BIBLIOGRAFÍA

Abel LC, Iwai LK, Viviani W, Bilate AM, Fae KC, Ferreira RC, Goldberg AC, Juliano L, Juliano MA, Lanni B, Mady C, Gruber A, Hammer J, Sinigaglia F, Kalil J, Cunha-Neto E (2005). T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes Infect* 7: 1184–1195.

Abramowicz M (2004). *Drugs for Parasitic Infections*. New Rochelle (NY): The Medical Letter.

Ahmed AA (2008). What is the best treatment?. *Ann Afr Med*. 7:141-8.

Akira S, Uematsu S y Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.

Alba SCD, Solana ME, Poncini CV, Pino-Martinez AM, Tekiel V, Gonzalez-Cappa SM (2010). Dendritic cells devoid of IL-10 induce protective immunity against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 28: 7407-7413.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994). In: *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. New York: Garland Publishing.

Almeida IC, Gazzinelli RT (2001). Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J.Leukoc.Biol.*70: 467-477.

Almeida IC, Milani SR, Gorin PA y Travassos LR (1991). Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *The Journal of immunology*, 146(7): 2394-2400.

Almeida IC, Milani SR, Gorin PA y Travassos LR (1991). Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *The Journal of immunology*, 146(7): 2394-2400.

Alvarez MN, Peluffo G, Piacenza L. y Radi R (2011). Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem* 286:6627-6640.

Alvarez P, Buscaglia CA, Campetella O (2004). Improving protein pharmacokinetics by genetic fusion to simple amino acid sequences. *J. Biol.Chem.* 279: 3375–3381.

Andrade MA, Perez-Iratxeta C y Ponting CP (2001). Protein repeats: structures, functions, and evolution. *Journal of structural biology* 134(2): 117-131.

Araujo AF, de Alencar BC, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Penido ML (2005). CD8 β -T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible

mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect. Immun.* 73:6017–6025.

Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Bailly S y Feige JJ (2012). The TGF- β Pathway as an Emerging Target for Chagas Disease Therapy. *Clinical Pharmacology Therapeutics* 92(5): 613-621.

Arce-Fonseca M (2005). Respuesta inmune inducida por inmunización con DNA que codifica para un antígeno de amastigote de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Patología experimental.

Aurrecoechea C, Barreto A, Brestelli J, Brunk BP, Cade S, Doherty R y Warrenfeltz S (2013). EuPathDB: The Eukaryotic Pathogen database. *Nucleic acids research* 41(D1): D684-D691.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1997). Currents protocols in Molecular Biology. Green publishing associates and John Wiley and Sons. New York, N.Y.

Barr SC, Gossett KA, Klei TR (1991). Clinical, clinicopathologic and parasitologic observations of tripanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am J Vet Res* 52:954-60.

Basombrío MA, Besuschio S (1982). *Trypanosoma cruzi* cultura used as vaccine to prevent chronic Chagas' disease in mice. *Infect Immun* 36:351-6.

Basombrio MA (1990). *Trypanosoma cruzi*: partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. *Exp Parasitol* 71:1-8.

Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL (2008). Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis* 21: 476–82.

Bhasin M y Raghava GPS. 2004. ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST. *Nucleic acids research* 32(suppl 2): W414-W419.

Bhasin M y Raghava GPS (2004). Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques. *Vaccine*, 22(23): 3195-3204.

Bhatia A, Daifalla NS, Badaro S, Reed SG, y Skeiky YA (1999). Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102:249–261.

Bhatia V, Garg N (2005). Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Rev. Vaccines* 4: 867–880.

Bhatia V, Garg NJ (2008). Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clin Vaccine Immunol* 15:1158-1164.

Bhatia V, Garg NJ (2008). Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clin Vaccine Immunol* 15:1158-1164.

Bhatia V, Sinha M, Luxon B, Garg N (2004). Utility of *Trypanosoma cruzi* sequence database for the identification of potential vaccine candidates: *in silico* and *in vitro* screening. *Infect. Immun.* 72, 6245–6254.

Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM (2003). Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infect. Immun.* 71: 2744–2757.

Brener Z y Gazzinelli RT (1997). Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. *International archives of allergy and immunology*, 114(2): 103-110.

Brener Z (1972). Taxonomía y ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. En: Memorias del Simposio internacional sobre enfermedad de Chagas . Ed. Soc Argentina de Parasitología. Bs As. Pp. 13-19.

Brener Z (1971). Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Sao Paulo. *Rev Inst Med Trop* 12:171-8.

Brière F, Servet-Delprat C, Bridon JM, Saint-Remy JM y Banchereau J (1994). Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D⁺ (sIgD⁺) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *The Journal of experimental medicine*, 179(2): 757-762.

Britto CC, Cardoso MA, Wincker P y Morel CM (1993). A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88:171-2.

Britto CC (2009). Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:122-35.

Burleigh BA and Andrews NW (1995). The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasión of mammalian cells. *Annu Rev. Microbiol.* 49: 175-200.

Burns J.M. Shreffler WG. Rosman DE. Sleath PR. March CJ y Reed SG (1992). Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:1239–1243.

Burns JM. Shreffler WG. Benson DR. Ghalib HW. Badaro R. y Reed SG (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that

detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:775–779.

Buscaglia CA, Alfonso J, Campetella O, Frasch AC (1999). Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood. *Blood* 93(6): 2025-2032.

Buscaglia CA, Alfonso J, Campetella O, Frasch AC (1999). Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood. *Blood* 93(6): 2025-2032.

Caetano BC, Carmo BB, Melo MB (2011). Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology* 187(4): 1903–1911.

Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Gazzinelli RT (1997^b). Glycosylphosphatidylinositol anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.*158: 5890-5901.

Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos L R y Gazzinelli RT. (1997a). Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *The Journal of Immunology*, 159(12):6131-6139.

Campos GM, Vittinghoff E, Rabl C, Takata M, Gadenstatter M y Lin F (2009). Endoscopic and surgical treatments for achalasia: A systematic review and meta-analysis. *Ann Surg.* 249:45-57.

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT (2001). Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of Immunology*, 167(1): 416–423.

Carabarin-Lima A, González-Vásquez MC, Baylon-Pacheco L, Tsutsumi V, Talamas-Rohana P (2011). Immunization with the recombinant surface protein rTcSP2 alone or fused to the CHP or ATPase domain of TcHSP70 induces protection against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Vaccines Vaccin* 1:110.

Carrilero B, Murcia L, Martinez-Lage L y Segovia M (2011). Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *Rev Esp Quimioter* 24:123-26.

Castellani O, Ribeiro LV, y Fernandes JT (1967). Differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol.* 27: 347-382.

Chagas C (1909). Nova tripanomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. N. sp.. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 11-80.

Chang TH, Wu LC, Lee TY, Chen S P, Huang HD y Horng JT (2013). EuLoc: a web-server for accurately predict protein subcellular localization in eukaryotes by incorporating various features of sequence segments into the general form of Chou's PseAAC. *Journal of computer-aided molecular design* 1-13.

Chou B, Hisaeda H, Shen J, Duan X, Imai T, Tu L (2008). Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. *Microbes Infect.* 10: 241–250.

Costa F, Franchin G, Pereira-Chioccola VL, Ribeiro M, Schenkman S, Rodrigues MM (1998). Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* 16: 768–774.

Coura JR y Dias JC (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 31-40.

Crampton A, Vanniasinkam T (2007). Parasite vaccines: the new generation. *Infect Genet Evol* 7:664-73.

Cruz-Chan JV, Bolio-González ME, Colin-Flores R, Ramirez-Sierra MJ, Quijano-Hernandez IA, Dumonteil E (2009). Immunopathology of natural *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Vet Parasitol* 162:151-5.

Cruz-Reyes A y Pickering-López JM (2005). Chagamex [<http://www.unibio.unam.mx/chagamex>]. México DF: UNIBIO. Instituto de Biología. UNAM.

Cruz-Reyes A, Pickering-Lopez JM (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 345–354.

D'Imperio-Lima MR, Joskowics M, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H (1985). Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol.* 15(2):201-203.

de Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J (2009). Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun* 77:4383-95.

De Andrade AL, Zicker F, De Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR (1996). Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 348:1407-13.

de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DMS y Savino W (2009). Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(7): e417.

DosReis GA (2011). Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. Brazil. *J Med Biol Res* 1(44):84-90.

Duan X, Yonemitsu Y, Chou B, Yoshida K, Tanaka S, Hasegawa M (2009). Efficient protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection after nasal vaccination with recombinant Sendai virus vector expressing amastigote surface protein-2. *Vaccine* 27: 6154–6159.

Dumonteil E, Escobedo-Ortegon J, Reyes-Rodriguez N, Arjona-Torres A, Ramirez-Sierra MJ (2004). Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infect. Immun.* 72: 46–53.

Dumonteil E (2007). DNA vaccines against protozoan parasites: opportunities and challenges. *J. Biomed. Biotechnol* 6: 90520.

Dumontiel E y Quijano-Hernández I (2011). Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines* 7(11): 1184-1191.

Duthie MS, Khan M, Zakayan A, Whit M, Kahn SJ, Kahn SJ (2007). Parasite-induced chronic inflammation is not exacerbated by immunotherapy before or during *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 1005–1012.

Eickhoff CS, Giddings OK, Yoshida N, Hoft DF. 2010. Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 687–691.

Eickhoff CS, Vasconcelos JR, Sullivan NL, Blazevic A, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, Hoft DF (2011). Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long term protection of a genetic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (3): e983.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309:409–415.

Falugi F, Zingaretti C, Pinto V (2008). Sequence variation in Group A Streptococcus pili and association of pilus backbone types with Lancefield T serotypes. *J Infect Dis* 198: 1834–1841.

Falugi F, Zingaretti C, Pinto V (2008). Sequence variation in Group A Streptococcus pili and association of pilus backbone types with Lancefield T serotypes. *J Infect Dis* 198: 1834–1841.

Fanger MW y Guyre PM (1991). Bispecific antibodies for targeted cellular cytotoxicity. *Trends in biotechnology* 9(1): 375-380.

Feitosa G, Dos Santos RR, Rassi S (2010). Cell therapy in dilated chagasic cardiomyopathy: the MiHeart study [abstract]. *Eur Heart J* 31(Suppl) 323–4.

Fontanella GH, De Vusser K, Laroy W, Daurelio L, Nocito AL, Revelli S (2008). Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate. *Vaccine* 26: 2322–2334.

Fralish BH y Tarleton RL (2003). Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 21(21): 3070-3080.

Frank FM, Petray PB, Cazorla SI, Munoz MC, Corral RS, Malchiodi EL (2003). Use of a purified *Trypanosoma cruzi* antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. *Vaccine* 22:77-86.

Frasch AC, Affranchino JL, Ibañez CF, ReyesMB, Macina RA, Luquetti AO, Rassi A, Aslund L, Pettersson U (1989). Analysis of cloned *Trypanosoma cruzi* proteins that are antigenic during the acute and chronic phase of Chagas' disease. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 83(suppl 1):345-346.

Frasch AC (1994). Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitology* 108 (Suppl.): S37–S44. 26.

Freilij H, Muller L y González-Cappa SM (1983). Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas disease. *J Clin Microbiol* 18:327-30.

García EA, Ziliani M, Agüero F, Bernabó G, Sánchez DO, Tekiel V (2010). TcTASV: a novel protein family in *Trypanosoma cruzi* identified from a subtractive trypomastigote cDNA library. *PLoS Negl Trop Dis* 4:841.

García IE, Lima MRI, Marinho CR, Kipnis TL, Furtado GC y Alvarez JM. (1997). Role of membrane-bound IgM in *Trypanosoma cruzi* evasion from immune clearance. *The Journal of parasitology*, 230-233.

Garg N y Tarleton RL (2002). Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 70: 5547–5555.

Giddings OK, Eickhoff CS, Sullivan NL, Hoft DF (2010). Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect. Immun.* 78: 1333–1338.

Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M (2006). A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci* 103: 10834–10839.

Goto Y, Coler RN y Reed SG (2007). Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. *Infect. Immun.* 75:846–851.

Goto YD, Coler RN, Guderian J, Mohamath R y Reed SG (2006). Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. *Infect. Immun.* 74:3939–3945.

Goto YD, Carter SG (2008). *Reed, Immunological dominance of Trypanosoma cruzi Tandem repeat proteins.* *Infect. Immun.* 76: 3967–3974.

Gruber A y Zingales B (1993). *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp. Parasitol.* 76:1–12.

Guedes PM, Veloso VM, Tafuri WL, Galvao LM, Carneiro CM, Lana M (2002). The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop* 84:9-17.

Gupta S, Garg NJ (2010). Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4:797.

Guzmán C (2001). Epidemiology of chagas disease in México: an update. *Trends Parasitol.* 17:372-376.

Guzmán C, García L y Florian J (1988). Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusion de sangre en México. *Rev Panam Salud Pública.* 4:94-99.

Guzmán-Marín E. (1990). Los transmisores de la enfermedad de Chagas. *Rev. Biomed* 1:144-153.

Hanks SK, Quinn AM y Hunter, T (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241(4861): 42-52.

Haolla FA, Claser C, de Alencar BC, Tzelepis F, de Vasconcelos JR, de Oliveira G (2009). Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 27:5644-5653.

Harth G, Mills AA, Lin T, Araujo FG (1994). *Trypanosoma cruzi* glycoprotein of M(r). 56,000 characterization and assessment of its potential to protect against fatal parasite infections. *Mol. Microbiol.* 11: 261–271.

Hoft DF, Eickhoff CS, Giddings OK, Vasconcelos JR, Rodrigues MM (2007). Transsialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* immunity involving CD8⁺ CTL and B cell-mediated cross-priming. *J. Immunol.* 179: 6889–6900.

Hoft DF, Kim KS, Otsu K, Moser DR, Yost WJ, Blumin JH, Donelson JE, Kirchho LV (1989). *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect. Immun.* 57: 959–1967.

Hubbard SR y Till JH (2000). Protein tyrosine kinase structure y function. *Annu Rev Biochem* 69: 373-398.

Hubbard MJ y Cohen P. 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *TIBS.* 18: 172-177.

Hunter C A, Slifer T y Araujo F (1996). Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infection and Immunity*, 64(7): 2381-2386.

Ibañez CF, Affranchino JL, Macina RA, ReyesMB, Leguizamon S, Camargo ME, Aslund L, Pettersson U y Frasc AC (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30:27–33.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e informática (2010). Censo Nacional de Población y Vivienda México. Available from: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> (accessed June 2012).

Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S (2008). Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell. Host.Microbe* 3: 352-363.

Iwasaki A, Medzhitov R (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system, *Science* 3 (27): 291 e 295.

Jannin J y Villa L (2007). An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Suppl* 1:95-7.

John L, John GJ y Kholia T (2012). A Reverse Vaccinology Approach for the Identification of Potential Vaccine Candidates from *Leishmania* spp. *Appl Biochem Biotechnol* 167: 1340-1350.

Katae M, Miyahira Y, Takeda K, Matsuda H, Yagita H, Okumura K (2002). Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infect. Immun.* 70: 4833–4840.

Kawano Y, Noma T y Yata J (1994). Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *The Journal of Immunology*, 153(11): 4948-4958.

Kayama H y Takeda K (2010). The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and infection*, 12(7): 511-517.

Kierszenbaum P y Howard JG (1976). Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *The Journal of Immunology*, 116(5): 1208-1211.

King BR, Vural S, Pandey S, Barteau A y Guda C (2012). ngLOC: software and web server for predicting protein subcellular localization in prokaryotes and eukaryotes. *BMC research notes* 5(1): 351.

Kirchhoff LV (2011). Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). En: *Advances in Parasitology*. Editorial Board. 1^a edición. Vol. 75. Capítulo 1.

Kloss E, Courtemanche N y Barrick D (2008). Repeat-protein folding: new insights into origins of cooperativity, stability, and topology. *Archives of biochemistry and biophysics* 469(1): 83-99.

Krettli AU y Brener Z (1976). Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *The Journal of Immunology*, 116(3):755-760.

Kuo-chen C, Elrod WD (1999). Prediction of Membrane Protein Types and Subcellular Locations. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 34:137–153.

Laderach D, Cerban F, Motran C, Vottero de Cima E, Gea S (1996). *Trypanosoma cruzi*: the major cysteinyl proteinase (cruzipain) is a relevant immunogen of parasite acidic antigens (FIII). *Int. J. Parasitol.* 26: 1249–1254.

Letunic I, Doerks T y Bork P (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic acids research*, 40(D1), D302-D305.

Levin MJ, Mesri EA, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, Chiale P, Ruiz A, Rosembaum MB, Torres HN, Segura EL (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530–539.

Limon-Flores AY, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona JL, Ek-Macias L, Sanchez-Burgos G, Ramirez-Sierra M (2010). Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and

therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4 β and CD8 β T cells. *Vaccine* 28: 7414–7419.

Luhrs KA, Fouts DL, Manning JE (2003). Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 21: 058–3069.

Luquetti AO y Rassi A (2000). Diagnostico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. En: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2ª ed. Río de Janeiro: Guanabara Koogan pp. 344-78.

Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O (2006). Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum. Gene Ther.* 17: 898–908

Madico G, Welsch JA, Lewis LA (2006). The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance. *J Immunol* 177: 501–510.

Maniatis T, Fritsch E y Sambrook J (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912–1934.

Marcotte EM, Pellegrini M, Yeates TO Eisenberg D (1999). A census of protein repeats. *J. Mol. Biol.* 293: 151–160.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Maciel BC, Simoes MV y Schmidt A (2010). Chagas heart disease. In: Yusuf S, Cairns JA, Camm AJ, Fallen EL, Gersh BJ, eds. Evidence-based cardiology, 3rd ed. London: BMJ Books. Pp 823–41.

Markell E, Voge M, John D (1990). Parasitología Médica. Editorial Interamericana. 6ª edición. Pp. 104-153.

Martin D and Tarleton R (2004). Generation, specificity and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev* 201: 304-317.

Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S (2006). CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strainvariant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog* 2:77.

McGhee RB y Cosgrove WB (1980). Biology and physiology of the lower *Trypanosomatidae*. *Microbiol Rev.* 44:140-173.

Miller MJ, Wrightsman RA, Manning JE (1996). *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice immunized with paraflagellar rod proteins is associated with a T-helper type 1 response. *Exp Parasitol* 84:156-67.

Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M y Coutinho A (1988). Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scandinavian journal of immunology*, 28(5): 553-561.

Minoprio PM, Eisen H, Formi L, D' Imperio-Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scandinavian journal of immunology*, 24(6), 669-679.

Miyahira Y, Akiba H, Katae M, Kubota K, Kobayashi S, Takeuchi T (2003). Cutting edge: a potent adjuvant effect of ligand to receptor activator of NF-kappa B gene for inducing antigen-specific CD8⁺ T cell response by DNA and viral vector vaccination. *J. Immunol.* 171: 6344–6348.

Miyahira Y, Takashima Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Takeuchi T, Ohyanagi-Hara M (2005). Immune responses against a single CD8⁺ -T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 73: 7356–7365.

Mora M, Bensi G, Capo S (2005). Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci* 102: 15641–15646.

Morell M, Thomas MC, Caballero T, Alonso C y López MC (2006). The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 24(49): 7046-7055.

Moriel DG, Bertoldi I, Spagnuolo A (2010). Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 107: 9072–9077.

Mosmann TR y Sad S (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*, 17(3): 138-146.

Muñoz MJ, Murcia L y Segovia M (2011). The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9:5-7.

Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA y Segovia M (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31: 26-34.

Murcia L, Carrilero B, Viñas PA, y Segovia M (2012). Nifurtimox chemotherapy: colateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients. *Rev Esp Quimioter* 25:1-3.

Nachamkin I, Allos BA y Ho T (1998). *Clinical Microbiology Reviews*, 11:555–567.

Naula C, Parsons M y Mottram CJ (2005). Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* 1754(1-2): 151–159.

Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Galler R, Bonaldo MC. 2011. Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D viruses expressing a *Trypanosoma cruzi* Amastigote Surface Protein-2 CD8⁺ T cell epitope at two distinct regions of the genome. *Virology* 438:127.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2002). Technical Reports Series 905. Ginebra: Suiza. pp. 1-109.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2005). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR/GTC/09. Buenos Aires, Argentina.

Ortiz-Ortiz L, Parks DE, Rodriguez M y Weigle WO (1980). Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*, 124(1):121-126.

Ortiz-Ortiz L, Parks DE, Rodriguez M y Weigle WO (1980). Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*, 124(1):121-126.

Ouaisi A, Aguirre T, Plumas-Marty B, Piras M, Schoneck R, Gras Masse H (1992). Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biol Cell* 75:11-7.

Ouaisi A, Da Silva AC, Guevara AG, Borges M, Guilvard E (2001). *Trypanosoma cruzi*-Induced Host Immune System Dysfunction: A Rationale for Parasite Immunosuppressive Factor(s) Encoding Gene Targeting. *J Biomed Biotechnol* 1:11-7.

Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N (2002). The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* 168: 6366–6374.

Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL (2009). CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol.* 21:385-90.

Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL (2009). CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol.* 21:385-90.

Parodi C, Padilla AM y Basombrío MA (2009). Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 288-294.

Parsons M, Worthey EA, Ward PN y Mottram JC (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC, Genomics* 6 (1):127.

Pawson T (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*. 116: 191-203.

Pereira VR, Lorena VM, Nakazawa M, Luna CF, Silva ED, Ferreira AG, Krieger MA, Goldenberg S, Soares MB, Coutinho EM, Correa-Oliveira R, Gomes YM (2005). Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.* 96: 154–161.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G y Nielsen H (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8(10): 785-786.

Pinto DJ (1992). Epidemiology of Chagas disease. In: Chagas' disease (American tripanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. Eds. Pp. 49-80. ISBT Brasil'92, Sao Paulo Brasil.

Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti L.C, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora m, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Stormi E, Zuo P, Broecker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Herve T, Hood WD, Jeffries CA, Saunders JN, Granoff MD, Venter C, Moxon RE, Grnadi G, Rappuoli R (2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287: 1816–1820.

Planelles L, Thomas MC, Alonso C y López MC (2001). DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infection and immunity*, 69(10): 6558-6563.

Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K., Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 40: D290-D301.

Quijano-Hernandez IA, Bolio-González ME, Rodríguez-Buenfil JC, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E (2008). Therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* in dogs: a pilot clinical trial. *Ann NY Acad Sci* 1149:343-6.

Ramos-Ligonio A., Ramírez-Sanchez E M, González-Hernández JC, Rosales-Encina JL y López-Monteo A (2006). Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz. México. *Salud Pública*. 48:13-21.

Rappuoli R (2000). Reverse vaccinology. *Current Opinion in Microbiology* 3:445-450.

Rassi A, Rassi A Jr, Rassi GG (2000). Fase aguda da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, eds. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2nd edn. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Pp 231–45 (in Portuguese).

- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA (2010). Chagas disease. *The Lancet* 375: 1388-1402.
- Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH y Morrissey PJ (1994). IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology* 153(7): 3135-3140.
- Reed SG (1998). Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. *Chem Immunol.*70: 124–143.
- Rodrigues MM, Oliveira AC y Bellio M (2012). The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *Journal of Parasitology Research* 1-12.
- Salgado-Jiménez B, Arce-Fonseca M, Baylón-Pacheco L, Talamás-Rohana P y Rosales-Encina J L (2013). Differential immune response in mice immunized with the A, R or C domain from TcSP protein of *Trypanosoma cruzi* or with the coding DNAs. *Parasite immunology* 35(1): 32-41.
- Sambrook J, Rusell D (2002). *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. 3ª edn. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez-Burgos G, Mezquita-Vega RG, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra MJ, Arjona-Torres A, Ouaisi A (2007). Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50: 333–341.
- Santori FR, Paranhos-Bacalla GS, Franco DASJ, Yamauchi LM, Araya JE, Yoshida N (1996). A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. *Infect. Immun* 64: 1093–1099.
- Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PRZ y Martins-Filho OA (2003). Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scandinavian journal of immunology*, 58(6): 655-663.
- Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ (2003). A etiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 52: 441-9.
- Schlessinger J (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103: 211-225.
- Schmunis GA (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of internal migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102 (suppl 1): 75-85.
- Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore D, Curtiss R, Hoft DF (2002). Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect. Immun* 70: 5065–5074.

Schneider MC, Exley RM, Chan H (2006). Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 176: 7566–7575.

Schofield L (1991). On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites, *Parasitol. Today* 7(1991): 99–105.

Scott MT, Neal RA, Woods NC (1985). Immunization of marmosets with *Trypanosoma cruzi* cell surface glycoprotein (GP90). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 451–454.

Segura E, Sosa-Estani M, Gómez A y Salomon O (1999). Control de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en la Argentina, *Medicina Buenos Aires*. 59(supl II): 91-96.

Seib KL, Zhao X y Rappuoli R (2012). Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect* 5:109-116.

Sepulveda P, Hontebeyrie M, Liegeard P, Mascilli A y Norris KA (2000). DNA-based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 68:4986–4991.

Shoda LK M, Kegerreis KA, Suarez CE (2001). DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infection and Immunity* 69(4): 2162–2171.

Silber AM y Pereira CA (2012). Assignment of Putative Functions to Membrane “Hypothetical Proteins” from the *Trypanosoma cruzi* Genome. *J Membrane Biol* 245:125-129.

Silva GK, Gutierrez FRS, Guedes PMM (2010). Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology* 184(3):148–1152.

Silveira ELV, Claser C, Haolla FAB, Zanella LG, Rodrigues MM (2008). Novel protective antigens expressed by *Trypanosoma cruzi* amastigotes provide immunity to mice highly susceptible to Chagas’ disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 1292–1300.

Sonnhammer EL, von Heijne G y Krogh A (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In *Ismb* 6:175-182.

Sosa ES, Segura EL, Ruiz AM, Velázquez E, Porcel BM y Yampotis C (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 59:526-9.

Sousa AG y Esper FE (1985). Tratamento cirúrgico do megacolo adquirido. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia.* 12:13-7.

Spinella S, Liegeard P y Hontebeyrie-Joskowicz M (1992). *Trypanosoma cruzi*: Predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. *Experimental parasitology*, 74(1): 46-56.

Strout RG (1962). A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol* 48:100.

Taibi A, Plumas-Marty B, Guevara-Espinoza A, Schöneck R, Pessoa H, Loyens M (1993). *Trypanosoma cruzi*: immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J Immunol* 151:2676-89.

Takayama E, Ono T, Carnero E, Umemoto S, amaguchi Y, Kanayama A (2010). Quantitative and qualitative features of heterologous virus-vector-induced antigen-specific CD8+ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Parasitol* 40:1549-1561.

Tamura T y Akutsu T (2007). Subcellular location prediction of proteins using support vector machines with alignment of block sequences utilizing amino acid composition. *BMC bioinformatics* 8(1): 466.

Tanowitz HB, Gumprecht JP, Spurr D, Calderon TM, Ventura MC, Raventos-Suarez C y Berman J (1992). Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Infectious Diseases*, 166(3): 598-603.

Tarleton RL (1995). The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections *parasitol Today* 11(1): 7-9.

Tay-Zavala J, Lara-Aguilera R, Velasco-Castrejón O, Gutiérrez-Quiroz M (1991). En: *Parasitología Médica*. Editorial Mendez-Fernandez. 5ª edición. Capítulo X.

Tekiel V, Alba-Soto CD, González Cappa SM, Postan M, Sánchez DO (2009). Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library. *Vaccine* 27: 1323–1332.

Toneatto D, Oster P, Deboer AC (2011). Early clinical experience with a candidate meningococcal B recombinant vaccine (rMenB) in healthy adults. *Hum Vaccin* 7: 781–791.

Umekita LF y Mota I (2000). How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:253–288.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, y Camargo ME (1996). Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9): 2143-2147.

Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Claser C, Machado AM, Gazzinelli RT (2004). Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein- 2 and trans-sialidase. *Hum. Gene Ther.* 15: 878–886.

Vázquez-Chagoyán JC, Gupta S y Jain GN (2011). Vaccine Development Against *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. In: *Advances in Parasitology*. Muller R, Rollinson D y Hay SI Eds. 1ra. edición. Ed. Elsevier. Pp. 121-146.

Vega CS y Náquira VC (2006). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). Madrid: Ministerio de Salud.

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 62: 5177-5182.

Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ (2000). B-cell activation by T-cell independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol. Rev.* 176: 154–170.

Wang HW, Lin YC, Pai TW y Chang HT (2011). Prediction of B-cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification. *BioMed Research International Journal* 12.

Ward P, Equinet e. Packer J. Doerig C. 2004. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5: 79.

Weber CA, Mehta PJ, Ardito M, Moise L, Martin B y De Groot AS (2009). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 965–976.

Wilson C, Tiwana H y Ebringer A (2000). *Microbes and Infection*, 2:1489–1496.

Wizel B, Garg N, Tarleton RL (1998). Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 66: 5073–5081.

Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE (2001). Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 69: 1593–1598.

Wrightman RA, Manning JE (2000). Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 18: 1419–1427.

Wrightsmann RA, Luhrs KA, Fouts D, Manning JE (2002). Paraflagellar rod proteinspecific CD8 β cytotoxic T lymphocytes target *Trypanosoma cruzi*-infected host cells. *Parasite Immunol.* 24: 401–412.

Yu CS, Chen YC, Lu CH y Hwang JK (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 64(3):643-651.

Zapata-Estrella H, Hummel-Newell C, Sanchez-Burgos G, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra MJ, Arjona-Torres A (2006). Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunol Lett* 103:186-91.

Zulantay A I (2005). Enfermedad de Chagas crónica. Reacción de polimerasa en cadena (PCR) aplicada al diagnóstico y evaluación quimioterapéutica. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Instituto de la biotecnología. Departamento de parasitología. Grupo de Bioquímica y parasitología molecular. España. 138 pp.