



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“Evaluación del efecto terapéutico de diferentes
combinaciones de péptidos derivados de *Trypanosoma cruzi*
en ratones BALB/c infectados”**

Tesis presentada por
QFB CHRISTIAN FLORIAN TEH POOT

En opción al grado:
Maestro en Investigación en Salud

Director de tesis
PhD. ERIC OLIVER DUMONTEIL

Mérida, Yucatán, Enero 2017

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán, con recursos concurrentes de los proyectos “Optimización de vacunas contra *Trypanosoma cruzi*”, financiado por CONACYT CB-2010-01 #156513 y “Iniciativa Slim para el desarrollo de vacunas contra la pobreza”, financiado por el Instituto Carlos Slim de la Salud con No. de registro SISTPROY CIRB-2012-00001.

AGRADECIMIENTOS

De nuevo a mi director de tesis **PhD. Eric Oliver Dumonteil** por su confianza, amistad, apoyo, tiempo y la oportunidad de continuar ser parte de este proyecto de investigación.

A mi comité revisor compuesto por **Dra. Karla Acosta Viana, Dra. Karla Dzul Rosado, Dra. Fanny Concha Valdez, Dra. Gilma Sánchez Burgos y Dr. Miguel Rosado Vallado** por su tiempo, interés, ayuda, opiniones y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio de parasitología, **Dr. Etienne, Dr. Vladimir, Dra Liliana, M. en C. Pedro y Dra. Nora** por la oportunidad de trabajar a su lado. En especial, **Q.F.B. María Sierra** por brindarme sus consejos, una gran amistad y su apoyo todos los días.

A mis compañeros del posgrado y laboratorio por su amistad, paciencia y pláticas que convirtió el trabajo en momentos de aprendizaje.

Y a esas personas que hacen posible todo día a día, mi mamá, mi papá, mi familia, mis amigos y **Evelyn** mi cómplice en la vida.

A la Universidad Autónoma de Yucatán y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo brindado.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
3.1 Enfermedad de Chagas	3
3.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
3.3 Patología de la enfermedad de Chagas.....	5
3.4 Tratamiento para la enfermedad de Chagas.	7
3.5 Respuesta inmune durante la fase aguda de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
3.5.1 Procesamiento y presentación antigénica.	9
3.5.2 Respuesta inmune humoral.....	12
3.5.3 Respuesta inmune celular.	12
3.6 Vacunas contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3.7 Vacunas compuestas de péptidos	15
3.8 Desarrollo de una vacuna terapéutica formulada con péptidos inmunogénicos derivados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
IV. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos específicos	23
V. HIPÓTESIS.....	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25

6.1 Tipo de estudio.	25
6.2 Diseño experimental.	25
6.3 Definición de las variables	26
6.4 Infección experimental con <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa H1) de los ratones BALB/c.....	27
6.5 Preparación de las combinaciones de péptidos para la inmunización de los ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i>	27
6.5.1 Péptidos.....	27
6.5.2 Preparación de las formulaciones de péptidos.	29
6.6 Determinación del efecto terapéutico de las diferentes combinaciones de péptidos en el desarrollo de la fase aguda de la infección por <i>T. cruzi</i> en ratones BALB/c.	30
6.6.1 Parasitemia y supervivencia	30
6.6.2 Células inflamatorias en el tejido cardíaco	32
6.6.3 Nidos de amastigotes en el tejido cardíaco	33
6.6.4 Carga parasitaria en tejido cardíaco	34
6.7 Determinación de la respuesta inmune inducida por el tratamiento con las diferentes combinaciones de péptidos en los ratones BALB/c infectados.	35
6.7.1 Cuantificación de la proporción de linfocitos T (CD8 ⁺ o CD4 ⁺) productores de INF- γ o IL-4 por citometría de flujo.	35
6.7.2 Determinación de los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a específicos a los péptidos en suero de ratones BALB/c infectados e inmunizados.	38
6.8 Análisis estadístico.	40

VII. RESULTADOS	41
7.1 Determinación del efecto terapéutico de las diferentes combinaciones de péptidos en el desarrollo de la fase aguda de la infección por <i>T. cruzi</i> en ratones BALB/c	41
7.1.1 Parasitemia y supervivencia	41
7.1.2 Células inflamatorias en el tejido cardíaco	43
7.1.3 Nidos de amastigotes en el tejido cardíaco	45
7.1.4 Carga parasitaria en tejido cardíaco	47
7.2 Determinación de la respuesta inmune inducida por el tratamiento con las diferentes combinaciones de péptidos en los ratones BALB/c infectados.	49
7.2.1 Cuantificación de la proporción de linfocitos T (CD8 ⁺ o CD4 ⁺) productores de INF- γ o IL-4 por citometría de flujo.	49
7.2.2 Determinación de los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a específicos a los péptidos en suero de ratones BALB/c infectados e inmunizados.	53
VIII. DISCUSIÓN	55
IX. CONCLUSIONES	61
X. RECOMENDACIONES.....	62
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis Americana es causada por el protozoo intracelular *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) el cual es transmitido por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae.¹ Una alternativa para el tratamiento de la enfermedad es el desarrollo de una vacuna contra la infección por *T. cruzi*.

Una combinación de 10 péptidos identificados a través del análisis *in silico* del proteoma de *T. cruzi* demostró un efecto terapéutico en ratones BALB/c. Sin embargo, estos péptidos presentaron diferente potencial para inducir la producción de INF- γ por células de bazo de ratones infectados, lo que sugiere que participan de manera diferente en la activación de la respuesta inmune durante la infección.

Para determinar si los péptidos con menor inmunogenicidad son requeridos en la formulación de 10 péptidos que ha demostrado un efecto terapéutico en ratones BALB/c, se formularon 4 combinaciones de 10, 7, 5 y 3 péptidos con base en los niveles de INF- γ inducidos por cada péptido. Ratones infectados fueron inmunizados 2 veces, con intervalo de una semana. Se evaluó la parasitemia, la sobrevivencia y en el día 50 post-infección, los ratones fueron sacrificados para evaluación del daño cardíaco y la respuesta inmune inducida por la inmunización con los péptidos.

La eliminación de los péptidos menos inmunogénicos de las formulaciones terapéuticas provocó un incremento de las células inflamatorias, los nidos de amastigotes y la carga parasitaria en el tejido cardíaco en los ratones infectados y tratados. Además, se demostró que a mayor número de péptidos contenidos en la formulación el efecto terapéutico tiende a ser mayor. Esto confirma que aun los péptidos con menor inmunogenicidad son necesarios en la formulación de péptidos para lograr un efecto terapéutico en ratones BALB/c.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis Americana es causada por el protozoo intracelular *T. cruzi*, el cual es transmitido por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae. En la actualidad no existe una terapia eficaz para el control de esta enfermedad.¹ Por lo cual, una alternativa para el tratamiento de la enfermedad es el desarrollo de una vacuna contra la infección por *T. cruzi*.

A través del análisis *in silico* del proteoma de *T. cruzi*, se identificaron péptidos con el potencial de unión al MHC (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*) clase I que demostraron ser excelentes candidatos para el desarrollo de una vacuna terapéutica contra este parásito en ratones BALB/c. En su validación *in vitro* a través de la estimulación con cada uno de los péptidos a las células de bazo de ratones BALB/c infectados, éstos presentaron diferente potencial para inducir la producción de INF- γ (interferón-gamma),² lo que sugiere que participan de manera diferente en la activación de la respuesta inmune durante la infección.

Debido a que la inmunogenicidad es un importante factor que determina si el complejo péptido-MHC puede ser reconocido por la clona de linfocito T específica para activar una respuesta inmune específica.³ Por lo tanto, los péptidos con baja inmunogenicidad podrían desarrollar una interferencia en la activación de la respuesta inmune.⁴

Por lo cual, en el presente trabajo se determinó si los péptidos con menor inmunogenicidad son requeridos en la formulación de una vacuna terapéutica compuesta de 10 péptidos que ha demostrado un efecto protector en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.

III. ANTECEDENTES

3.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis Americana fue descrita en 1909 por el médico Brasileño Carlos Chagas, es causada por el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*. Este parásito es transmitido a los mamíferos principalmente por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, que sólo existen en el continente americano.¹

Según las últimas estimaciones realizadas por la OMS (Organización Mundial de la Salud), basadas en datos del 2010, casi 6 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* en los 21 países de América Latina, de los cuales dos terceras partes son países pertenecientes al Cono Sur. Los países con más casos estimados en valores absolutos serían Argentina, Brasil y México, seguido de Bolivia. De manera global, el 13% de toda la población latinoamericana está en condiciones de riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas.⁵

En México, en el periodo comprendido de 2000 a 2014 se han registrado poco más de 7 000 casos, los estados con mayor incidencia fueron Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco.⁶ El estado de Yucatán es considerada como área endémica y se han reportado tasas de seroprevalencia de 3.7% en la población general.^{7, 8}

3.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

La enfermedad de Chagas se puede transmitir al ser humano por mecanismos vectoriales y no vectoriales como las transfusiones de sangre o trasplantes de órganos y debido a la transmisión del parásito de la madre al hijo (forma congénita). En ocasiones, puede ser contraída por la ingestión de alimentos contaminados y mediante accidentes en los laboratorios que trabajan con parásitos vivos.^{9 10}

La principal manera de transmisión de la enfermedad es por la vía vectorial. Esta inicia cuando el triatomino infectado, se alimenta de la sangre del mamífero y libera en sus heces tripomastigotes metacíclicos cerca del sitio de la picadura. Debido a la rascadura del área de la picadura, los tripomastigotes contenidos en las heces son inoculados en el hospedero a través de la herida ocasionada por la picadura del insecto. Dentro del hospedero, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células cercanas al lugar de la infección, donde se diferencian a amastigotes. Estos se multiplican por fisión binaria y después de sucesivas divisiones ocupan el citoplasma celular, se diferencian y se liberan a la circulación sanguínea como tripomastigotes sanguíneos (BFT, del inglés *Blood-Form Trypomastigotes*) (Figura 1) para infectar otras células del hospedero.¹¹

Otro triatomino ingiere los BFT durante su alimentación con la sangre del hospedero infectado. Una vez ingeridos, la mayoría de los tripomastigotes se lisan en el estómago del insecto. Por lo tanto, el tripomastigote para sobrevivir se diferencia en su forma epimastigote y migra al intestino medio donde prolifera. En la región posterior del intestino y el recto, el epimastigote se desprende de la superficie intestinal y se diferencia en tripomastigote metacíclico (forma infecciosa para los mamíferos, incluyendo el humano) que luego se liberan junto con las heces al momento de su alimentación (Figura 1).^{12, 13}

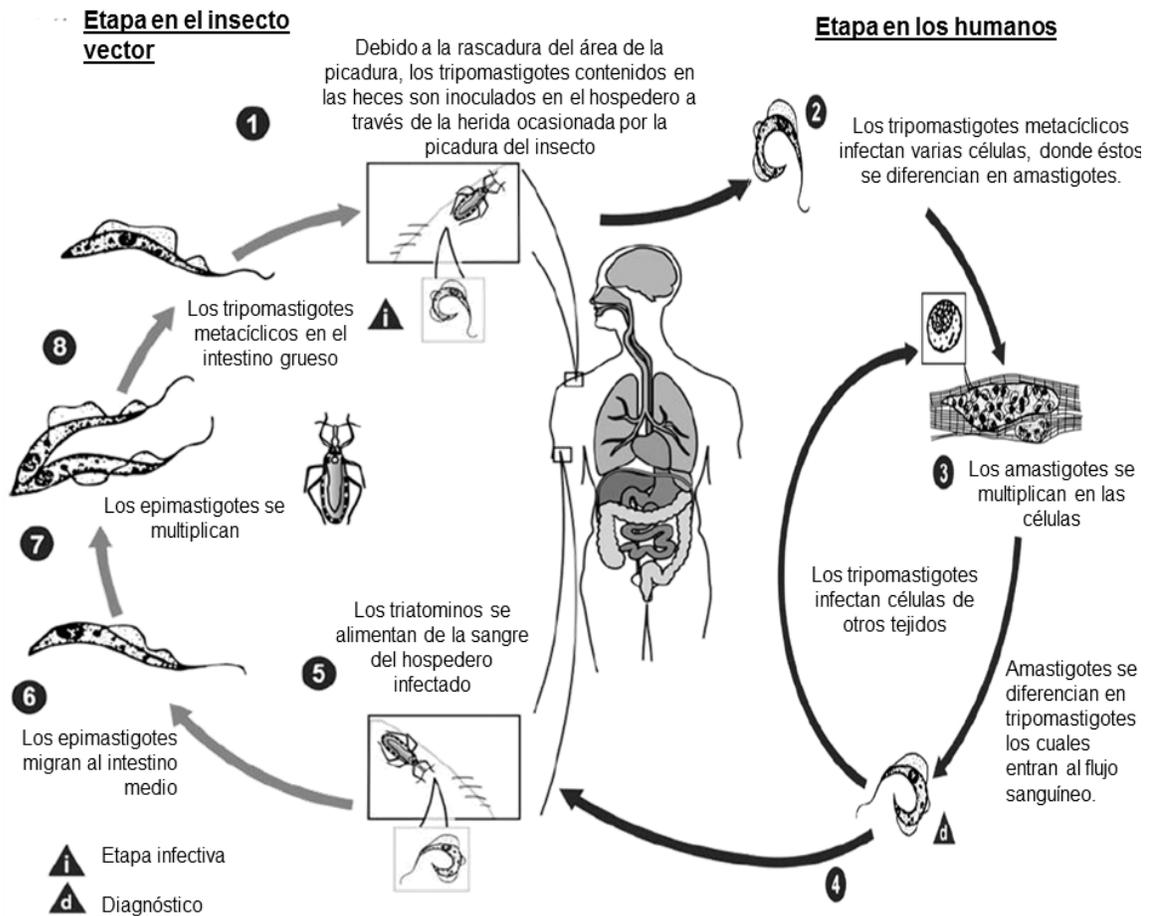


Figura 1. Ciclo de transmisión vectorial. Se presentan las diferentes etapas de desarrollo de *Trypanosoma cruzi* involucradas en el insecto y en el mamífero hospedero.¹⁴

3.3 Patología de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas tiene dos fases:

En el humano, la fase aguda usualmente es subclínica debido a que la carga de parásitos es bastante baja y tiene una duración entre 2-3 semanas, ocasionalmente hasta 4 meses. Aproximadamente, el 75% de los individuos

infectados presentan signos y/o síntomas relacionados con la forma de infección con del parásito, como el signo de Romaña o el chagoma.¹⁵ La muerte ocurre (<5–10% de casos sintomáticos) como resultado de una severa miocarditis y/o meningoencefalitis. El curso clínico en la mayoría de los casos es hacia una aparente recuperación espontánea, aun si la infección no es tratada con medicamentos tripanocidas.⁹ En esta fase, la respuesta inmune inducida por la infección en el humano y el modelo murino (BALB/c), no es capaz de eliminar las células infectadas con los amastigotes, lo que conlleva a la progresión de la enfermedad a la fase crónica.

En la fase crónica se observan dos formas de la enfermedad: una forma indeterminada (también llamada forma asintomática) y una forma sintomática.⁷

La forma indeterminada se caracteriza por la ausencia de síntomas clínicos y de alteraciones ante un examen de tórax, esófago, colon y electrocardiograma. Los pacientes se caracterizan por la presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, como evidencia de la activación del sistema inmune por la infección. También, tiene una duración de entre 10 a 30 años, esto dependerá de la susceptibilidad del hospedero (condiciones de salud y nutrición), la virulencia de la cepa y la respuesta inmune desarrollada por el hospedero para el control de las células infectadas. Estas condiciones probablemente determinan por qué algunos individuos sufren una lesión orgánica (30-40%), mientras otros individuos permanecen asintomáticos y nunca desarrollan manifestaciones clínicas relacionadas con la enfermedad de Chagas.¹⁶

Para la forma crónica sintomática se observan cambios patológicos evidentes en aproximadamente el 30-40% de los pacientes, esta puede ocurrir 30 años después de la infección inicial.¹⁷

En general, la forma cardíaca es la manifestación más grave y frecuente de la enfermedad de Chagas. Se caracteriza por la presencia de anomalías del sistema circulatorio, bradiarritmia, taquiarritmia, aneurismas apicales, insuficiencia cardíaca, tromboembolismo lo que conlleva a una repentina muerte del paciente. Otras manifestaciones están relacionadas a la forma digestiva, la cual presenta disfunciones gastrointestinales, principalmente mega-esófago, mega-colon, o ambas.¹⁷

3.4 Tratamiento para la enfermedad de Chagas.

Para el tratamiento de la infección por *T. cruzi* existen dos compuestos nitroheterocíclicos, el nifurtimox (NFX) y el benznidazol (BNZ).¹⁸ En México, estos medicamentos no pertenecen a la lista de medicamentos básicos esenciales del sector salud, lo que hace que sea difícil para las personas infectadas y diagnosticadas de recibir la terapia necesaria en el tiempo adecuado.¹⁹

El BZN es relativamente eficaz para la infección en la fase aguda, la infección congénita, la reactivación de la infección y en la fase crónica temprana. Sin embargo, su eficacia durante la fase crónica es controversial. Tanto para BNZ como para NFX su eficacia disminuye conforme a la evolución clínica de la enfermedad y el resultado del tratamiento depende de comenzar la terapia tan pronto como el diagnóstico se realice.²⁰

Otro medicamento alternativo para el tratamiento de la enfermedad de Chagas es el alopurinol, estudios han demostrado que este carece de efectividad en la fase aguda,²¹ y en los pacientes en fase crónica tiene un efecto similar al BNZ y NFX, pero con menos efectos secundarios.²²

Por otra parte, el itraconazol es un fármaco que inhibe la síntesis del ergosterol en el parásito.²³ Este ha demostrado ser efectivo en modelos animales en fase aguda de la infección, pero ineficaz en la fase crónica.²⁴ Estudios en humanos en fase crónica han demostrado una actividad curativa significativa. Sin embargo, se ha encontrado que su eficacia depende del genotipo de *T. cruzi* implicado en la infección del paciente, donde los genotipos DTU (DTU, del inglés *Discrete Typing Unit*) IIb (TcI), DTU IIc (TcV), DTU IIe (TcVI) son susceptibles, pero TcI (el más frecuente en México) es resistente al itraconazol.²⁵

Aunque existe tratamiento farmacológico para la enfermedad, este posee muchas complicaciones debido a su toxicidad y efectos adversos, posee largos períodos de tratamiento, costo elevado y su eficacia depende de la fase de la enfermedad en la que son administrados. Por lo tanto, una alternativa prometedora para el control de la infección en los pacientes, así como en la población en riesgo es el desarrollo de una vacuna contra la infección por *T. cruzi*.²⁶

3.5 Respuesta inmune durante la fase aguda de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Durante la infección de *T. cruzi*, las células de la respuesta inmune innata desempeñan un papel temprano para la eliminación del parásito y evitar su dispersión en los tejidos del hospedero durante la fase aguda de la infección.²⁷ El control de la fase aguda comienza por la activación de las células de la respuesta innata, como linfocitos asesinos naturales (NK, del inglés *Natural Killer*), neutrófilos y macrófagos.

Los NK son importantes productores de INF- γ y del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor- α*), los cuales permiten la activación de la respuesta inmune responsable del control de la parasitemia en modelos animales.²⁷ También, la producción de IL-12 principalmente por los macrófagos, estimula la síntesis de INF- γ por los linfocitos T y linfocitos NK, lo que contribuye en el control de la fase aguda.²⁸

3.5.1 Procesamiento y presentación antigénica.

Después de la infección con *T. cruzi*, los macrófagos y/o células dendríticas migran al sitio de infección donde fagocitan a los parásitos o bien estas células pueden ser infectadas por el parásito. Estas células realizan la función de una células presentadoras de antígeno (CPA), por lo cual internalizan, procesan y presentan los antígenos de *T. cruzi* a otras células inmunes para iniciar la respuesta inmune, este proceso es conocido como procesamiento y presentación antigénica. Este proceso inmune es importante porque permite la selección de los péptidos con la capacidad de unión al MHC para inducir una respuesta inmune mediante la activación de los linfocitos T péptido-específicos que permite el control de la infección.²⁹

La CPA puede procesar y presentar el antígeno a través del MHC a los linfocitos T, mediante dos vías:

- La vía mediante el MHC clase I que activa a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL, del inglés *Cytotoxic T Lymphocyte*),
- La vía del MHC clase II que estimula los linfocitos T CD4⁺ colaboradores (Th, del inglés *Cell T helper*).³⁰

Para el procesamiento y presentación del antígeno en el contexto del MHC clase I, los péptidos que se unen al MHC clase I se producen cuando las

proteínas endógenas son procesadas en el proteosoma de la CPA, los péptidos generados de la proteólisis son llamados epítopes (el epítope es un péptido derivado de una proteína antigénica del patógeno, el cual, se une a la molécula del MHC), luego son traslocados dentro del retículo endoplasmático (RE) mediante el transportador asociado con el procesamiento antigénico (TAP, del inglés *Transporter associated with Antigen Processing*). La unión de la molécula de MHC clase I con el péptido es facilitado por la TAP, la molécula de MHC clase I se une a péptidos de 8-15 aminoácidos a través de interacciones con los residuos de anclaje del extremo N- y C- terminal del péptido, mientras que la región central es más flexible. El complejo del péptido unido a la molécula MHC clase I es transportado al aparato de Golgi para finalmente ser presentado en la membrana plasmática (Figura 2a).³¹

El complejo péptido-MHC clase I es reconocido por los linfocitos T CD8⁺ a través del receptor de linfocito (TCR, por sus siglas en inglés T-cell receptors) lo que provoca la proliferación y activación de los linfocitos T. Con la activación estos linfocitos se movilizan hacia el sitio de la infección para la eliminación de las células infectadas (como las células infectadas por *Trypanosoma cruzi*) mediante el reconocimiento de su célula blanco la cual expresa en su superficie el péptido específico asociado al MHC clase I.³²

La presentación antigénica mediante el MHC clase II, inicia con la captación del el antígeno por las CPA, luego este es degradado en el endosoma por la actividad proteolítica lo que genera péptidos que se unirán al MHC clase II. En el RE la molécula de MHC clase II es sintetizada y transportada hacia el endosoma donde se asocia al péptido. El complejo péptido-MHC clase II son expresados en la membrana plasmática para ser reconocido por los linfocitos CD4⁺ (Figura 2b).³¹

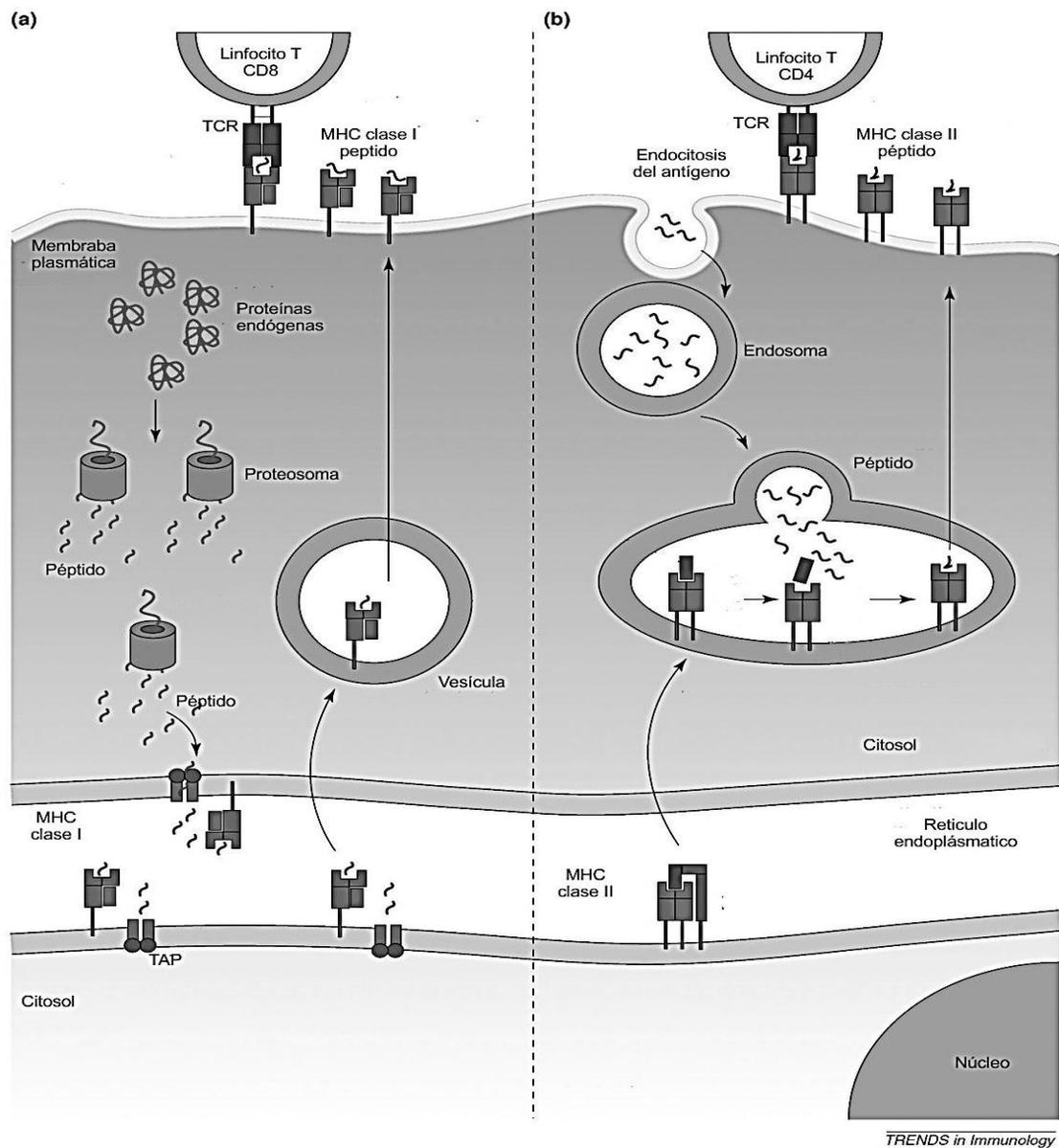


Figura 2. Vías por las que los péptidos se presentan en la superficie de las células presentadoras de antígeno para la unión de células T. (a) La vía del MHC clase I y. (b) la vía del MHC clase II.³³

3.5.2 Respuesta inmune humoral.

Después del procesamiento y presentación del antígeno, los macrófagos y células dendríticas continúan con la producción de citocinas, las cuales permiten la activación de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T, así como de linfocitos B para control de la parasitemia en modelos animales.²⁷

Los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos en contra de las proteínas antigénicas, los cuales permiten la activación de mecanismos para la eliminación del parásito. Las células plasmáticas secretan principalmente anticuerpo IgG1, sin embargo, estos favorecen al control de la infección pero no eliminan al parásito. Por lo cual, ante la presencia de INF- γ , las células plasmáticas cambian la producción del subtipo de IgG hacia anticuerpos IgG2a. Esta clase de IgG posee el potencial de provocar la eliminación del parásito a través de la opsonización de células infectadas o parásitos, las cuales son fagocitadas por macrófagos o neutrófilos.

3.5.3 Respuesta inmune celular.

El INF- γ junto con la IL-12 (producidos principalmente durante la presentación antigénica por los macrófagos o células dendríticas) favorecen la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en linfocitos tipo Th₁ que se caracterizan por la producción principalmente de INF- γ .²⁸ El INF- γ desempeña un papel crucial en el control de la infección por *Trypanosoma cruzi* experimental en modelos murinos. Esto fue demostrado mediante el empleo de animales donde se inactivaron (KO, del inglés Knockout) los genes del INF- γ y del receptor de INF- γ , éstos presentaron altos niveles de parasitemia, mortalidad e infiltrados celulares en el tejido cardíaco.³⁴ También, el INF- γ induce en los macrófagos la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS, del inglés *inducible Nitric Oxide Synthase*), lo que permite la destrucción de los parásitos que son fagocitados o que infectan estas células.²⁷

Los linfocitos Th₁ son importantes para el control de la infección por su capacidad de provocar que las células plasmáticas produzcan anticuerpos (IgG2a) que activan el complemento para provocar la lisis de las células infectadas. Además, contribuyen con diferentes citocinas para potenciar los mecanismo efectores de los linfocitos T citotóxicos. A diferencia los linfocitos Th₂ se caracterizan por la producción de interleucina-4 (IL-4), no contribuyen con el control de la infección lo que favorece la progresión de la enfermedad debido a la persistencia del parásito en el hospedero.³⁵

Linfocitos T citotóxicos son importante para el control de la infección, debido a que éstos eliminan a las células infectadas por el parásito, mediante sus mecanismos efectores como la producción de perforinas, granzimas B y a través de la vía del ligando Fas/Fas..³⁶

La importancia de los linfocitos T CD8⁺ para el control de la infección se demostró en un modelo experimental con ratones KO de linfocitos CD8⁺, estos animales presentaron parasitemias elevadas que condujeron a mayores tasas de mortalidad.³⁷ También, Laucella *et al.*³⁸ demostraron que la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ productores de INF- γ específicos a los péptidos de *Trypanosoma cruzi*, se correlaciona con la severidad de la infección, siendo significativamente menores en pacientes con la enfermedad severa en comparación con pacientes asintomáticos.³⁸ Esto sugiere que la activación de linfocitos T CD8⁺ productores de INF- γ es crítica para el control y la sobrevivencia del hospedero.

3.6 Vacunas contra *Trypanosoma cruzi*

La infección posee una fase aguda limitada que ocurre desapercibida en los pacientes, debido al desarrollo de una respuesta inmune capaz de controlarla. Sin embargo, la respuesta inmune falla en la erradicación total del parásito y el paciente permanece infectado por el resto de su vida lo que conlleva al desarrollo de la fase crónica de la enfermedad. Debido a la ausencia de tratamiento en la fase crónica, el desarrollo de una vacuna terapéutica constituye una alternativa prometedora para el control de la infección.

Durante muchos años, diferentes estrategias de vacunación han sido desarrolladas; desde el empleo de parásitos inactivados o fracciones subcelulares, vacunas de parásitos atenuados, las cuales resultaron ser eficaces en el control de una infección aguda. Sin embargo, no son lo suficientemente capaces en activar una respuesta inmune para el control de la infección en la fase crónica.³⁹

También, han sido propuestas proteínas recombinantes como antígenos candidatos, entre ellos se pueden citar a la proteína cruzipaina (Cz), las glicoproteínas (gp) gp-90, gp-82, gp-56, la familia de las transilidasas (Ts), proteína Tc24, proteínas de superficie de amastigotes (ASP, del inglés *Amastigote Surface Protein*), proteínas flagelares, proteínas de la superficie de tripomastigotes-1 (TSA-1, del inglés *Trypomastigote Surface Antigen*), mucinas asociadas a proteínas de superficie (MASPs, del inglés *mucin-associated surface proteins*), entre otros. Estas vacunas resultaron ser eficaces para el establecimiento de una respuesta humoral contra el parásito, la cual no es capaz de eliminar las células infectadas lo que permite la progresión de la enfermedad debido a la persistencia del parásito en el paciente.^{40, 41} Sin embargo, se están realizando estrategias de inmunización con estas proteínas recombinantes en combinación de adyuvantes que permitan modular la respuesta inmune que mejore el efecto de estas vacunas.

Por otra parte, las vacunas de ADN han demostrado inducir una respuesta inmune protectora tipo Th₁ asociada con diferentes niveles de citoquinas (IL-2, IL-12; TNF- α , INF- γ) y de actividad citotóxica por los linfocitos CD8⁺, la respuesta inmune correlaciona con el grado de control de la infección en modelos murinos. Estos antígenos candidatos incluyen proteínas de la familia Trans-sialidasas, antígeno pequeño de superficie de tripomastigotes (TSSA, del inglés *Trypomastigote Small Surface Antigen*), proteína de membrana del cinetoplasto-11 (KMP, del inglés *Kinetoplastid Membrane Protein*), proteína reguladora del complemento (CRP, del inglés *Complement Regulatory Protein*), proteína del bastón flagelar (PFR del inglés *Paraflagellar Rod Protein*), Cz, TSA-1, Tc-24, Ts-1 y otros.⁴⁰⁻⁴²

Estas últimas estrategias de vacunación han demostrado la inducción de una protección parcial, pero ninguna ha conferido una protección total frente a una infección por *Trypanosoma cruzi*. Esto se debe al fallo en la eliminación de las células infectas lo que provoca la persistencia del parásito en el hospedero y el desarrollo de la fase crónica de la enfermedad.

3.7 Vacunas compuestas de péptidos

En 1974, Zinkernagel *et al.*⁴³ descubrieron que los linfocitos T CD8⁺ reconocen péptidos restringidos a las moléculas del MHC clase I, los cuales correspondían a secuencias lineales de aminoácidos generados por la degradación proteolítica de las proteínas antigénicas y presentadas en contexto de la molécula de MHC clase I.⁴³ Esto demostraba que aún una sola proteína contenía varios péptidos antigénicos, pero que no todos eran necesarios para la inducción de una respuesta inmune protectora. De este modo, se crea el interés por las vacunas compuestas de péptidos capaces de activar una respuesta inmune protectora frente a un patógeno infeccioso. Los estudios de Falk *et al.*⁴⁴ determinaron que estos péptidos con afinidad al MHC clase I presentaban aminoácidos

específicos que permitían la unión del péptido a la hendidura del MHC clase I.⁴⁴ Estas investigaciones han establecido las bases que permitieron la identificación de péptidos con la capacidad de inducir una respuesta inmune mediada por los linfocitos T CD8⁺.

Las vacunas compuestas de péptidos se caracterizan por inducir una respuesta inmune mediante la unión del péptido al MHC clase I en las CPA, este complejo es reconocido por una clona de linfocitos T CD8⁺, la cual se activa y por medio de sus mecanismos efectores permite la eliminación del patógeno intracelular. Por lo tanto, la unión del péptido al MHC es un paso esencial para inducir una respuesta inmune, pero aún no está claramente establecido como ocurre este proceso.⁴⁵ Sin embargo, se han propuesto diferentes mecanismos de como ocurre la unión del péptido al MHC de las CPA.⁴⁶

Uno de los probables mecanismos establece que las células CPA presentan en su superficie péptidos de baja afinidad unidos al MHC, los cuales podrían ser desplazados por los péptidos inmunogénicos utilizados como antígenos debido a que poseen una mayor afinidad al MHC. (Figura 3a)⁴⁶ Otros establecen que la captación de los péptidos es un paso importante en su unión al MHC, aunque este paso no está claramente descrito, probablemente es captado por CPA mediante la macropinocitosis de los péptidos del medio extracelular (Figura 3b).⁴⁶ El péptido podría escapar del endosoma hacia el citoplasma debido a sus características químicas (Figura 3d)⁴⁷. En el citoplasma de la CPA, el péptido podría intersectar el MHC clase I cuando es transportado hacia la membrana plasmática a través del transporte vesicular (Figura 3c) o ser procesados por el proteosoma y luego ser transportados al RE (Figura 3e). También los péptidos podrían ser transportados directamente al RE por las TAP (Figura 3f). En el RE los péptidos se unen al MHC clase I (Figura 3g) y son transportados a la superficie para activar a los linfocitos T CD8 específico al péptido (Figura 3h).⁴⁵

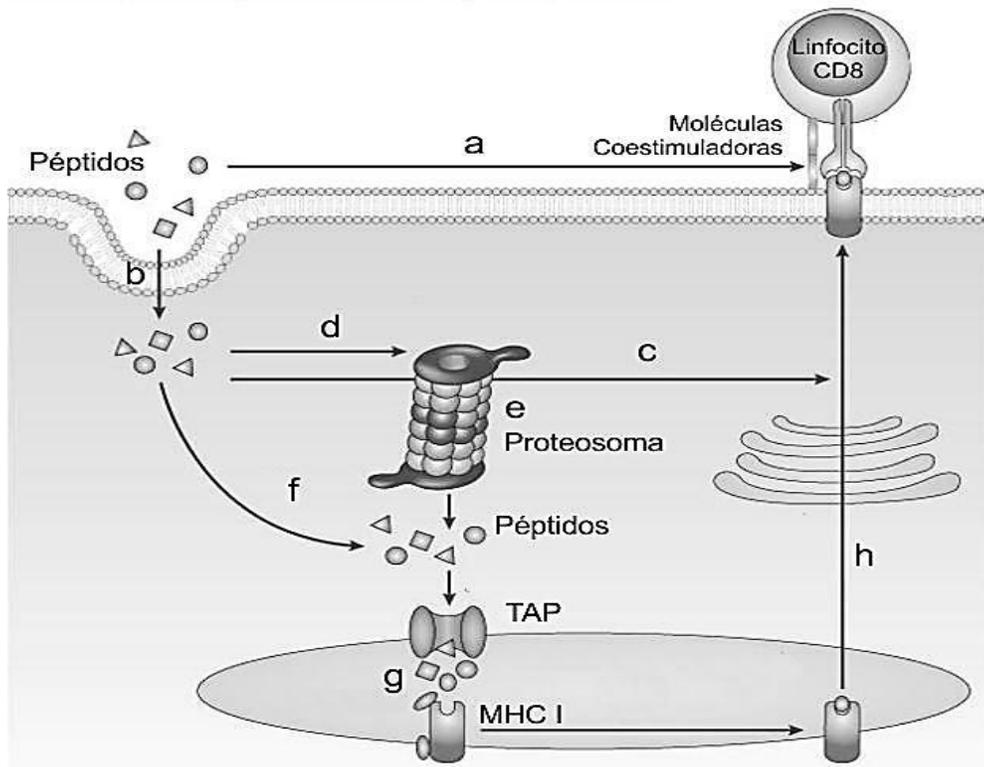


Figura 3. Captación y presentación de los péptidos con afinidad al MHC clase I utilizados como una estrategia de vacunación.⁴⁵

El uso de péptidos como antígenos para vacunas ha demostrado que el uso de un solo péptido no es suficiente para establecer una respuesta inmune capaz de controlar la infección.⁴⁸ Por lo cual, la combinación de diferentes péptidos derivados del patógeno permitirían la formación de múltiples complejos péptido-MHC que induciría una respuesta inmune compuesta por diferentes clones de linfocitos T que permitan el control de la infección.⁴⁹ Por otra parte, las vacunas de péptidos poseen ventajas como el no presentar el riesgo de reversión de la virulencia del patógeno como en las vacunas de parásitos vivos o atenuados, tiene un proceso fácil de elaboración y conservación. Además, pueden ser diseñadas para incluir péptidos de diferentes proteínas antigénicas.⁴⁵

Sin embargo, su principal desventaja es que el complejo péptido-MHC active clonas de linfocitos T en ausencia de moléculas coestimuladoras y citocinas inflamatorias lo que induciría una tolerancia inmunológica hacia los péptidos.⁵⁰ Para evitar esto, las vacunas compuestas de péptidos son administradas en combinación de adyuvantes con la capacidad de activar a CPA de manera eficaz y para establecer un proceso de inflamación que permita la activación de una respuesta inmune capaz de controlar la infección.

En el caso de la infección por *Trypanosoma cruzi*, el empleo de adyuvantes que permitan la activación de las CPA que favorezcan una respuesta inmune tipo Th₁.⁵¹ Los adyuvantes como los ligandos de los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés *Toll Like Receptor*) han demostrado su capacidad de inducir este tipo de una respuesta inmune.⁵² En particular, el Monofosforil Lípido A (MLA) es un agonista del TLR-4 que estimula la producción de citocinas tipo Th1 (IL-2 e INF- γ),⁵³ Este adyuvante posee la capacidad de inducir en las CPA un aumento en su superficie de moléculas coestimuladoras como CD80⁺ y CD86⁺, lo que contribuye a una mejor presentación del antígeno a los linfocitos T CD8⁺ para la inducción de una respuesta inmune eficaz y protectora.⁵⁴ Otros estudios, han demostrado que el MLA mejora la eficacia de vacunas utilizadas para la infección por *Trypanosoma cruzi* en ratones.^{2, 55}

3.8 Desarrollo de una vacuna terapéutica formulada con péptidos inmunogénicos derivados de *Trypanosoma cruzi*.

Diversos estudios, han demostrado la capacidad de inducir una respuesta inmune específica contra *T. cruzi* con la inmunización de péptidos inmunogénicos en ratones que provoca un efecto terapéutico.⁵⁶⁻⁵⁹ Por lo cual, la identificación de péptidos inmunogénicos constituye una estrategia prometedora para el desarrollo de una vacuna para la enfermedad de Chagas.

Recientemente, Teh-Poot *et al.*² identificaron 10 péptidos inmunogénicos a partir del el análisis *in silico* del proteoma de *Trypanosoma cruzi* a través de programas inmunoinformáticos basado en la predicción de péptidos con unión al MHC clase I.² Las predicciones de péptidos con unión al MHC clase I se realizaron para los alelos H-2K^d y H-2D^d de los ratones BALB/c, debido a que estos constituyen un modelo murino para la evaluación de candidatos a vacuna. En el primer paso del análisis, los resultados del análisis del proteoma en los programas RankPep y NetMHC, permitió la selección de 58 péptidos para el alelo H-2D^d y 92 para H-2K^d. Previamente se eliminaron los péptidos presentes en proteínas de las familias TS, MASP y mucinas.²

En el siguiente paso del análisis, los resultados de los péptidos con los programas inmunoinformáticos (SYFPEITHI, BIMAS-HLA, ProPred-I, MAPPP, ComPred, SVMHC, Predep IEBD y BLAST) permitió la selección de 14 péptidos para el alelo H-2D^d y 12 para H-2K^d (Cuadro 1), los cuales no poseen similitud con proteínas de ratón o humano, pero si presentan similitud con proteínas de otros cinetoplástidos. Los péptidos P8, P16 y P23 tienen similitud, con proteínas de *Trypanosoma brucei brucei*, *T. brucei gambiense* y *T. congolense*. Los péptidos P14, P25, P17 tienen similitud con proteínas de *Leishmania donovani*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. major* y *L. braziliensis*. Esto sugiere que los péptidos tienen el potencial para inducir una inmunidad cruzada en contra de otros cinetoplástidos.²

Cuadro 1. Péptidos inmunogénicos derivados de *Trypanosoma cruzi*.²

ID	Péptido	Pos ^a	Secuencia ID ^b Tc00.	Proteína	Similitud ^d
P6	FGPDRSVVF	123	1047053511885.10	P.H. ^c conservada (pseudogen)	
P8	SGPTRIVVGF	1254	1047053504131.140	P.H. ^c conservada	✓
P14	GGPERIAVTL	580	1047053511367.170	Proteína de clasificación vacuolar-35	✓
P15	KYLTVENAL	158	1047053507681.200	Serina carboxi peptidasa S28, putativa	
P16	SYIERITGL	111	1047053506469.100	P.H. ^c conservada	✓
P17	SYVTIPTSI	14	1047053444777.10	Proteína de resistencia a medicamentos, putativa	✓
P23*	RYLAVVTNI	210	1047053507519.190	Proteína quinasa, putativa	✓
		210	1047053508479.10	Proteína quinasa, putativa	
P24*	IYLPLQSAL	243	1047053508799.280	P.H. ^c conservada	
		41	1047053508801.10	P.H. ^c conservada	
		118	1047053509431.10	P.H. ^c conservada	
		189	1047053509713.10	P.H. ^c conservada	
		189	1047053509713.20	P.H. ^c conservada	
		254	1047053510069.20	P.H. ^c conservada	
		254	1047053508799.270	P.H. ^c conservada	
P25*	SYIGLGSAL	159	1047053508799.290	P.H. ^c conservada	✓
		23	1047053509431.10	P.H. ^c conservada	
		94	1047053509713.10	P.H. ^c conservada	
		159	1047053510069.20	P.H. ^c conservada	
		148	1047053508799.280	P.H. ^c conservada	
		159	1047053508799.270	P.H. ^c conservada	
P26*	SYGCICSSL	31	1047053508799.290	P.H. ^c conservada	
		31	1047053508799.270	P.H. ^c conservada	
		31	1047053510069.20	P.H. ^c conservada	

- a. Posición del primer aminoácido del péptido en la proteína
- b. Número de identificación del gen que corresponde el péptido predicho.
- c. P.H. = proteína hipotética Las proteínas hipotéticas no poseen ninguna similitud con proteínas previamente caracterizadas, por lo cual no hay evidencia de que estas se expresen en el parásito
- d. Péptido conservados en proteínas de otros cinetoplastidos (*Trypanosoma*, *Leishmania*)
- *) Péptido presente en más de 1 proteína de *Trypanosoma cruzi*.

Para la validación de los análisis inmunoinformáticos, las células de bazo de ratones infectados fueron estimuladas *in vitro* con cada uno de péptidos por separado. Diez de los 26 péptidos presentaron la capacidad de inducir la producción de IFN- γ provocado por la reactivación de los linfocitos T.² Lo que sugiere que las CPA reconocen y procesan de manera adecuada las proteínas que contienen los péptidos y los linfocitos T reconocen el complejo péptido-MHC expresado por las CPA, lo cual confirma el potencial inmunogénico de estos péptidos.²

Los 10 péptidos confirmados están presentes en 16 proteínas (Cuadro. 1), de las cuales, 4 corresponden a proteínas putativas y 12 a proteínas hipotéticas conservadas.² El P14 está presente en la proteína de clasificación vacuolar-35, el P15 en la proteína serina carboxi-peptidasa S28, el P17 en la proteína de resistencia a fármacos y el P23 presente en dos proteínas, ambas, proteínas con función de quinasa.²

En la evaluación del efecto protector de la formulación de 10 péptidos inmunogénicos en combinación con MLA como una vacuna terapéutica en ratones BALB/c.² El grupo control presentó parasitemias elevadas que conducían a mayores tasas de mortalidad. A diferencia, el grupo inmunizado con la formulación de péptidos resultó con parasitemias bajas y con un 85% de sobrevivencia. También, mostró una reducción de la densidad de células inflamatorias y en la presencia del parásito en el tejido cardíaco.²

Los estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran el potencial de estos péptidos como antígenos para el desarrollo de una vacuna. Sin embargo, los péptidos demostraron diferente capacidad de activar una respuesta inmune *in vitro* durante la evaluación de su inmunogenicidad. Lo que sugiere que cuando los animales son inmunizados con la combinación de los múltiples antígenos, los linfocitos T desarrollan una respuesta inmune específica hacia uno o algunos péptidos, los cuales presenta una mayor inmunogenicidad.⁶⁰

La inmunogenicidad es un importante factor que determina si el complejo péptido-MHC puede ser reconocido por la clona de linfocito T específica para activar una respuesta inmune específica. Esto depende de elementos relacionados con el procesamiento antigénico, la estructura del antígeno, la abundancia del antígeno y su capacidad de unirse en el MHC, así como también la frecuencia de la clona específica y la afinidad del TCR de los linfocitos T durante el reconocimiento del complejo péptido-MHC.³

Debido a que la inmunogenicidad está estrechamente relacionada a la capacidad que tienen los péptidos para unirse al MHC. Se ha establecido que los péptidos con alta afinidad de unión al MHC provocan una óptima activación de la respuesta inmune, aquellos con mediana afinidad inducen una respuesta menos óptima. Finalmente, los péptidos con baja afinidad podrían desarrollar una interferencia inmune en la activación de los linfocitos T.⁴ Con respecto a lo anterior, diversos estudios han demostrado la presencia de péptidos con baja inmunogenicidad que interfieren en la activación de los linfocitos T.^{61, 62} En el estudio de Haribhai D *et al.*⁶³ se confirmó que la presencia de antígenos con baja inmunogenicidad en el momento de la iniciación de la respuesta inmune resulta en el fracaso de la activación y el desarrollo normal de sus funciones efectoras de los linfocitos T.⁶³

Debido a que en su validación, los péptidos presentaron diferente potencial inmunogénico.² En el presente trabajo se evaluó el efecto terapéutico de diferentes combinación elaboradas con base en la inmunogenicidad de los péptidos, para establecer si los péptidos con menor inmunogenicidad son requeridos en la formulación de una vacuna terapéutica compuesta de 10 péptidos que ha demostrado un efecto protector en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto terapéutico y respuesta inmune de las diferentes combinaciones de péptidos derivados de *Trypanosoma cruzi* en ratones BALB/c infectados.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto terapéutico de las diferentes combinaciones de péptidos, de acuerdo a su inmunogenicidad, en la fase aguda de la infección por *T. cruzi* en ratones BALB/c.
2. Determinar la respuesta inmune inducida por las diferentes combinaciones de péptidos en los ratones BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi*.

V. HIPÓTESIS

La eliminación de los péptidos de inmunogenicidad en las diferentes combinaciones, no provoca cambios en el efecto terapéutico, ni en la respuesta inmune de los ratones BALB/c infectados e inmunizados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio.

Estudio experimental de laboratorio

6.2 Diseño experimental.

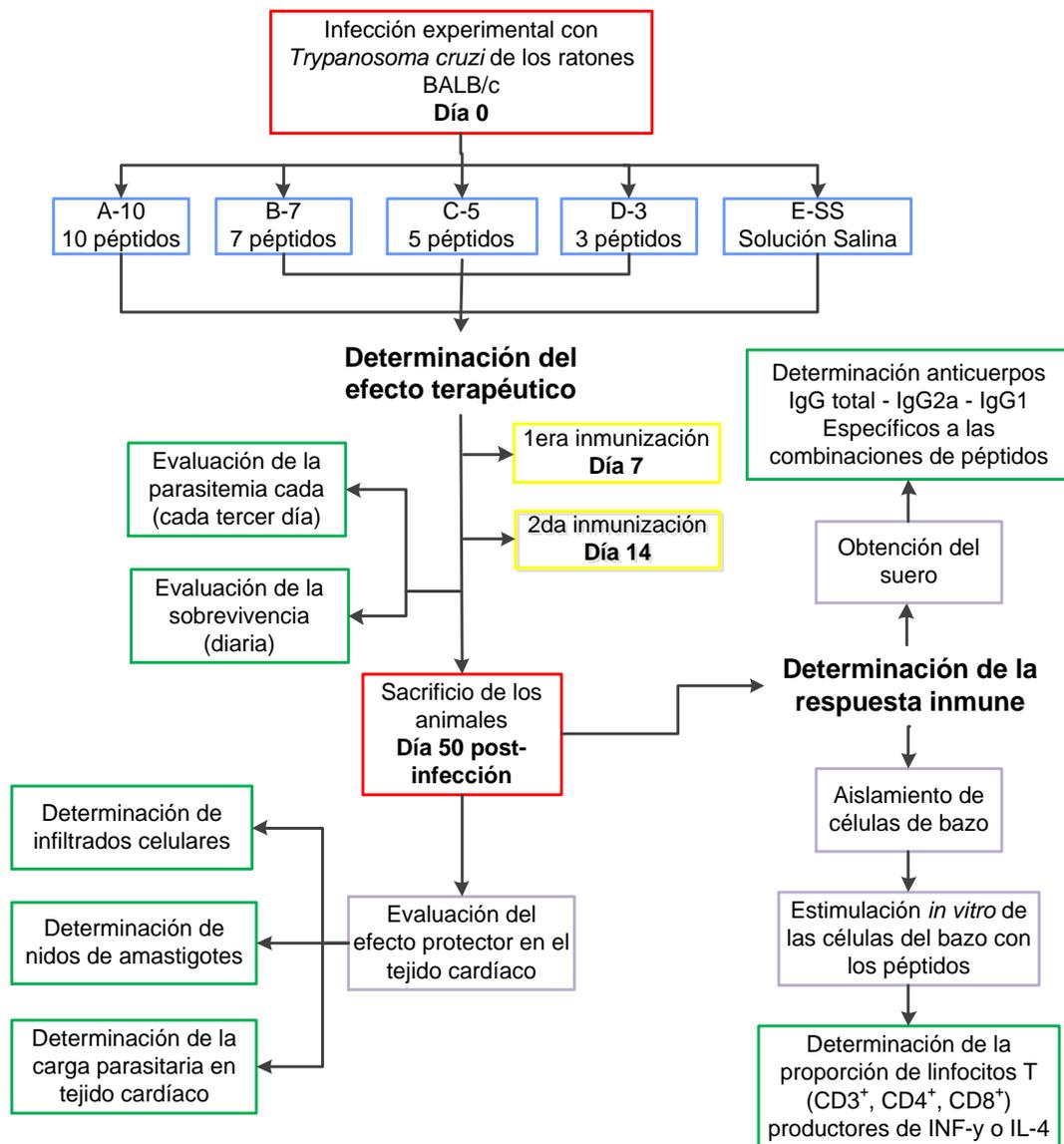


Figura 4. Evaluación del efecto terapéutico y la respuesta inmune inducida en ratones BALB/c infectados e inmunizados con las combinaciones de péptidos.

6.3 Definición de las variables

Cuadro 2. Definición de las variables y escalas de medición

Variable	Definición	Tipo de variable	Escala	Unidades de medida
Inmunización	La inmunización de los animales con los grupos de péptidos (véase cuadro 4)	Independiente cualitativa	Continua	Combinación de péptidos / ratón
Infección	La infección de los animales con 500 parásitos	Independiente Cuantitativa	Continua	Parásitos / ratón
Parasitemia	Concentración de parásitos en una muestra de sangre del ratón	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Parásitos /mL
Sobrevivencia	Porcentaje de ratones vivos al día 50 post-infección	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Porcentaje (%)
Nidos de amastigotes	Número de amastigotes por 20 campos a un objetivo de 40x	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Amastigotes/ campo
Células infiltradas	Células inflamatorias infiltradas en tejido cardíaco analizado por histopatología	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Células infiltradas / mm ²
ADN del parásito en tejido cardíaco	Número de parásitos en el tejido cardíaco determinado por q-PCR	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Parásitos /ng de ADN
Niveles de IFN-γ	Concentración de IFN-γ en el sobrenadante, después de la estimulación <i>in vitro</i> de las células del bazo con los cada uno de los péptidos.	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	pg /mL
Linfocitos TCD4⁺ - IFN-γ	Frecuencia de linfocitos TCD4 ⁺ productores de IFN-γ	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Porcentaje (%) de células
Linfocitos TCD8⁺ - IFN-γ	Frecuencia de linfocitos TCD8 ⁺ productores de IFN-γ	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Porcentaje (%) de células
Linfocitos TCD4⁺ - IL-4	Frecuencia de linfocitos TCD4 ⁺ productores de IL-4	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Porcentaje (%) de células
Linfocitos TCD8⁺ - IL-4	Frecuencia de linfocitos TCD8 ⁺ productores de IL-4	Dependiente Cuantitativa	Continua, razón	Porcentaje (%) de células

6.4 Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* (cepa H1) de los ratones BALB/c

Para evaluar el efecto protector (Figura 7), se realizó la infección experimental de ratones BALB/c hembras de 4-6 semanas de edad, mediante la inoculación por vía intraperitoneal de 500 tripomastigotes sanguíneos de la cepa H1. Esta cepa, aislada de un caso humano en Yucatán, ^{64, 65} fue mantenida mediante pases mensuales en ratones ICR.

Los animales comprados a la empresa BIOINVERT fueron manipulados de acuerdo a los lineamientos de bioética y se mantuvieron bajo condiciones de temperatura entre 18-26°C y humedad relativa del 40-70%, según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.5 Preparación de las combinaciones de péptidos para la inmunización de los ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.

6.5.1 Péptidos.

Los 10 péptidos candidatos (Cuadro 3), se sintetizaron por el laboratorio Peptide 2.0 Inc. (Chantilly, Virginia, USA). Los péptidos fueron disueltos en agua estéril a una concentración final de 5 mg/mL y conservados a -20°C.

Cuadro 3. Péptidos sintéticos, ordenados con base en los niveles de INF- γ producidos por células de bazo de ratones infectados y estimuladas por cada péptido, para la elaboración de formulaciones terapéuticas.^{***}

ID	Péptido	Proteína
P14	GGPERIAVTL	Proteína de clasificación vacuolar-35
P23*	RYLAVVTNI	Proteína quinasa, putativa
P16	SYIERITGL	P.H. ^c conservada
P6	FGPDRSVVF	P.H. ^c conservada (pseudogen)
P26*	SYGCICSSL	P.H. ^c conservada
P25*	SYIGLGSAI	P.H. ^c conservada
P8	SGPTRIVVGF	P.H. ^c conservada
P17	SYVTIPTS I	Proteína de resistencia a medicamentos, putativa
P15	KYLTVENAL	Serina carboxi peptidasa S28, putativa
P24*	IYLPLQSAL	P.H. ^c conservada

Los péptidos están ordenados de mayor a menor con base en los resultados de la producción de INF- γ en su validación *in vitro*.

***) Para mayor detalle de los péptidos véase el Cuadro 1

*) Péptido presente en más de 1 proteína de *Trypanosoma cruzi*.

c) P.H. = proteína hipotética

6.5.2 Preparación de las formulaciones de péptidos.

Con base en los niveles de INF- γ inducidos por cada péptido en su validación *in vitro*, se formularon 4 combinaciones de péptidos. La primera formulación (grupo A) está compuesta por los 10 péptidos que demostraron un efecto protector frente a una infección por el parásito. Para la siguiente formulación se eliminaron los 3 péptidos (P17, P15, P24) con menor producción INF- γ , por lo cual el grupo B está conformado de 7 péptidos, esto para evaluar si los péptidos eliminados son requeridos para mantener el efecto protector. Para el grupo C, se eliminaron los siguientes 2 péptidos (P25, P8). Finalmente, para el grupo D se eliminaron los 2 péptidos (P6, P26) con menor inmunogenicidad (Cuadro. 4).

Cuadro 4. Combinaciones terapéuticas de los péptidos con base en los niveles de INF- γ .

Grupo experimental	Péptidos									
	Producción de INF- γ									
	+ ← ————— → -									
A-10 (10 péptidos)	P14	P23	P16	P6	P26	P25	P8	P17	P15	P24
B-7 (7 péptidos)	P14	P23	P16	P6	P26	P25	P8			
C-5 (5 péptidos)	P14	P23	P16	P6	P26					
D-3 (3 péptidos)	P14	P23	P16							
E-SS (Solución Salina)	-									

Estos grupos permitieron establecer si los péptidos con menor inmunogenicidad son necesarios para inducir una respuesta inmune capaz de controlar la infección en ratones BALB/c infectados.

Para la evaluación del efecto terapéutico de las formulaciones de péptidos, grupos de 7 ratones BALB/c previamente infectados con *Trypanosoma cruzi* de la cepa H1, recibieron dos inmunizaciones en los días 7 y 14 post-infección (Figura 7).

Debido a que el uso de 50 µg de cada péptido en la formulación demostró un evidente efecto terapéutico,² el cual probablemente sea ocasionado principalmente por los péptidos con mayor inmunogenicidad. Se llevó a cabo una reducción de la concentración de cada péptido a 10 µg de cada péptido para la elaboración de las formulaciones terapéuticas. Esta reducción se llevó a cabo para poder determinar si los péptidos menos inmunogénicos son requeridos en la formulación compuesta de 10 péptidos que ha demostrado un efecto terapéutico en ratones BALB/c infectados.

Por lo tanto, la inmunización de los animales se realizó con 10µg de cada péptido/ratón, de acuerdo al Cuadro 4, en combinación con 10µg de Monofosforil Lípido A (MLA), como adyuvante. La administración de la formulación correspondiente se aplicó en el músculo tibialis anterior del ratón en un volumen final de 50µL por ratón. Al grupo control E-SS, se le administró solución salina (NaCl 0.89%).

6.6 Determinación del efecto terapéutico de las diferentes combinaciones de péptidos en el desarrollo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi* en ratones BALB/c.

6.6.1 Parasitemia y sobrevivencia

Para realizar el seguimiento del proceso infeccioso, se llevó a cabo el conteo de parásitos en una cámara de Neubauer (parasitemia) cada tercer día, con inicio a los 9 días posteriores a la infección hasta el día 48.

La metodología para realizar el conteo de parásitos por la cámara de Neubauer fue la siguiente: para cada uno de los ratones se preparó una solución de trabajo con 490 μL de solución fisiológica con EDTA al 0.05% y 10 μL de sangre periférica (dilución 1:50), la sangre se obtuvo de cada ratón mediante un pequeño corte en la parte distal de la cola, para posteriores tomas de sangre se removió la cicatriz en la parte distal de la cola donde se realizó el primer corte, con el fin de evitar el daño a la cola del ratón.⁶⁶ De la solución anterior se tomaron 10 μL de muestra que fueron colocados en la parte central de la cámara de Neubauer e inmediatamente se realizó el conteo de los parásitos que presentaron movilidad. El conteo se realizó en forma diagonal en los cuadrantes utilizados para el conteo de leucocitos (cuadrantes señalados con flechas en la Figura 8).⁶⁶

Se calculó el número de parásitos/mL utilizando siguiente fórmula:

$$\text{Parásitos/mL} = (\# \text{parásitos contados}) (\text{FD}) (10,000)$$

Dónde:

parásitos contados, es el número de parásitos contados en los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer, FD corresponde al factor de dilución de la muestra, en este caso es 50 y el valor de 10,000 es el factor de corrección de la cámara de Neubauer .⁶⁶

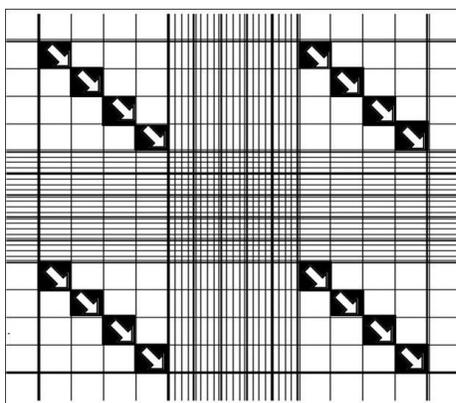


Figura 5. Cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de parásitos como se indica según las zonas oscuras y en dirección a las flechas (zona para el conteo de leucocitos).

La sobrevivencia se registró diariamente a partir de la infección hasta el día 50 post-infección. El porcentaje de sobrevivencia se calculó para cada grupo experimental con la siguiente fórmula:

$$\%Sobrevivencia = \frac{[(\# \text{ Ratonos vivos al final del experimento})]}{(\# \text{ Ratonos infectados})} \times 100$$

6.6.2 Células inflamatorias en el tejido cardíaco

En el día 50 post-infección, los animales experimentales sobrevivientes fueron sacrificados por dislocación cervical, para extraer de forma quirúrgica el corazón, el cual fue dividido en dos porciones. Una porción se colocó en formaldehído al 10% para los estudios histológicos y la otra parte se utilizó para la cuantificación de ADN del parásito presente en el tejido. Para determinar los infiltrados celulares y nidos de amastigotes. La parte del corazón conservada en formaldehído al 10% y fue enviada para su corte y tinción con hematoxilina-eosina para su análisis.^{67, 68}

Para la determinación de infiltrados celulares, los cortes histológicos fueron observados en el microscopio óptico *Nikon Eclipse E600*, donde se tomaron 5 fotografías en el objetivo 10x. Cada fotografía fue analizada como imagen binaria por medio del programa *Multispec 3.3* (Purdue University, IN, USA) para la obtención del número de pixeles correspondiente a los núcleos de las células y el tejido de cada fotografía. Los pixeles correspondientes a los núcleos de las células se dividieron entre el número de pixeles que corresponde a un solo núcleo, esto para calcular el número de células en cada fotografía.

Para estimar el número total de células en 1 mm^2 , los pixeles de las células (compuesto por la sumatoria de los pixeles del núcleo y de tejido) fue dividido entre el número de pixeles que corresponden a un 1 mm^2 . También, el valor de células obtenido de tejido de ratón sano (sin inflamación) se restó al número de células que corresponden a los diferentes grupos experimentales. De esta manera, se calculó el número de células infiltradas por 1 mm^2 de tejido cardíaco de los ratones experimentales.^{67, 68}

6.6.3 Nidos de amastigotes en el tejido cardíaco

Para la determinación de nidos de amastigotes, el corte histológico de cada ratón se dividió de manera aleatoria en 4 secciones y se contó entre las fibras musculares 5 campos por cada sección, acumulando un total de 20 campos por corte histológico, la lectura se realizó de derecha a izquierda, esto fue de igual forma para todos los cortes histológicos, se observaron a través del objetivo de 20x. Por cada campo observado se anotó el número de nidos presentes, al final se obtuvo el valor de los nidos de amastigotes en 20 campos del corte histológico.⁶⁴

6.6.4 Carga parasitaria en tejido cardíaco

Trypanosoma cruzi tiene la capacidad de infectar el tejido cardíaco y ocasionar daños severos que desencadenan la muerte en los ratones. Por lo cual, la cuantificación del parásito en el tejido nos permitió conocer el efecto protector de los grupos de péptidos utilizados como vacunas terapéuticas.

La metodología de PCR en tiempo real para la cuantificación del ADN del parásito presente en el tejido cardíaco fue realizada utilizando la descrita por Cummings y Tarleton.⁶⁹ Brevemente, para la extracción del ADN se tomaron 25 mg de tejido cardíaco de los ratones infectados mediante el estuche comercial DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN No. Catálogo 69504) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras de ADN fueron resuspendidas a una concentración de 25 ng/μL y se conservadas a -20°C.

Para la elaboración de la curva estándar de ADN del parásito y cuantificar la cantidad de ADN presente en el tejido cardíaco de los ratones. Los estándares de la curva se prepararon a partir de ADN de tejido cardíaco sano y de parásitos. El ADN del parásito fue obtenido de 10^7 parásitos (cepa H1), mantenidos en cultivo *in vitro*. El ADN de los parásitos se resuspendió a una concentración de 50,000 parásitos/μL. A partir de ésta, se prepararon los estándares de 10000, 1000, 100, 10, 1 parásitos. Todos los estándares se ajustaron a 25ng/μL con ADN de tejido sano.

Para la preparación de la PCR, se mezclaron 10 μL de SYBR® GreenTM (KAPA No. Catálogo KR0389), 50 ng de ADN (2 μL cada muestra o estándar, previamente preparado a 25ng/μL), 0.5 μL de primer TCZ-F (5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3'- SIGMA), 0.5 μL de primer TCZ-R (TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' - SIGMA) y 7 μL de agua grado-PCR (Quiagen). Después de la preparación, las muestras y estándares fueron analizadas por triplicado en el termociclador ECO- illumina. Las condiciones de amplificación se presentan en la figura 9.⁶⁹ Al finalizar, el software del

termociclador ECO- ilumina analizó los datos para calcular la cantidad de ADN equivalente al número de parásitos en las muestras, según los valores de la curva estándar.⁶⁹

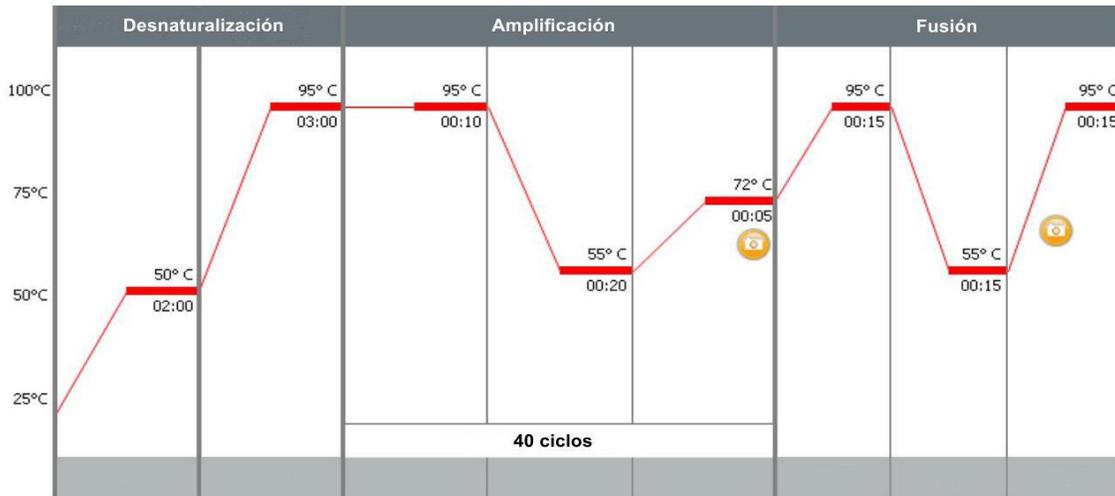


Figura 6. Condiciones de amplificación de la q PCR para cuantificación de la carga parasitaria en el tejido cardíaco de ratones BALB/c infectados e inmunizados con los diferentes grupos de péptidos.

6.7 Determinación de la respuesta inmune inducida por el tratamiento con las diferentes combinaciones de péptidos en los ratones BALB/c infectados.

6.7.1 Cuantificación de la proporción de linfocitos T (CD8⁺ o CD4⁺) productores de INF- γ o IL-4 por citometría de flujo.

En el día 50 post-infección, los animales experimentales sobrevivientes fueron sacrificados por eutanasia, con una sobredosis de 1mg pentobarbital sódico/g de peso del animal administrado por vía intraperitoneal, inmediatamente los bazo fueron removidos y macerados en 3 mL de medio RPMI 1640, luego las células se pasaron a través de un filtro estéril con poros de 100 μ m, seguido de una centrifugación a 200g por 10 min. Las células se resuspendieron e

incubaron para la hemólisis con 1 mL de la solución 0.16 M NH_4Cl - 0.17 M Tris HCl (pH 7.2) por 5 min a 37°C. A continuación, las células del bazo fueron lavadas 3 veces con 8 mL de RPMI 1640. Posterior a los lavados, las células se resuspendieron en 1 mL de RPMI 1640 suplementado con una concentración final de 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomina, 20 mM piruvato de sodio, 5 μM β -mercaptoetanol, 10 mM glutamina y 10% suero fetal bovino descomplementado y filtrado.⁷⁰ Con una dilución 1:10 de las células se determinó la viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano.⁷¹

Las mezclas de células del bazo de los ratones se cultivaron en una placa de 96 pozos a una densidad de 1×10^6 por pozo. Se estimularon con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada péptido por separado, por 24 h a 37°C con atmósfera de CO_2 al 5%. Las células no estimuladas se usarán como control negativo y como control positivo células estimuladas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Concanavalina A (ConA).⁷² Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de incubación se añadió a cada pozo de la placa de cultivo 1 μL de Brefeldina A (BD GolgiPlug™ protein transport inhibitor, Cat. No. 555028) y se incubó a 37°C.

Después la placa de cultivo se centrifugó a 300g por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y las células se suspendieron en 200 μL de amortiguador BD FACSTFlow™ (Catalog No. 342003) por pozo. En un tubo de citometría se mezclarán las tres réplicas de cada muestra para determinar los linfocitos CD4^+ o CD8^+ productores de $\text{INF-}\gamma$ y/o IL-4. Después se lavaron dos veces con amortiguador FACS, los lavados consistieron en agregar 5mL de amortiguador FACS y centrifugar a 300g por 10min a 4°C, se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas.

Para comenzar con la tinción extracelular, las células se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti- CD3^+ , anti- CD4^+ , anti- CD8^+ marcados con diferentes fluorocromos, Alexa fluor 647 (BD PharMingen No. de catálogo

557869), Ficoeritrina (PE-Cy7, BD PharMingen No. de catálogo 552775) y Proteína Clorofila Peridinina (PerCP 5.5, BD PharMingen No. de catálogo 551162) respectivamente. Las células se incubaron por 30 min a 4°C en oscuridad.^{70, 72} Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en paraformaldehído al 1% en amortiguador FACS y se incubaron por 10 min a 4°C.⁷³

Transcurrido el tiempo se lavaron 2 veces y se procedió con la tinción intracelular con el uso de un estuche comercial (BD, Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit, Cat. No. 554714) siguiendo las especificaciones del fabricante.⁷³

Brevemente, después de los lavados se añadió la solución de cytotfix/cytoperm y se incubará por 20 min a 4°C. Luego de dos lavados con la solución de perm/wash, las células se resuspendieron con los anticuerpos anti-INF- γ y anti-IL-4, marcados con diferentes fluorocromos Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Ficoeritrina-cianina 7 (PE-Cy7) respectivamente, diluido con la solución de perm/wash.⁷³ Después de dos lavados, las células se suspendieron con paraformaldehído al 1% en amortiguador FACS y se incubaron por 10 min a 4°C. Finalmente, se añadieron 400 μ L de amortiguador FACS para su análisis.⁷³

Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSVerse (BD), se colectaron 50,000 células por cada muestra. El análisis de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ e IL-4 se realizó con el programa FlowJo vX (TreeStar Software, Ashland, OR, USA). Como primer paso se evaluó la autofluorescencia de células sin teñir. Enseguida, se utilizó una gráfica de dot-plot de tamaño (forward scatter) contra granularidad (side scatter) para seleccionar la población de linfocitos. Posteriormente se seleccionó la población positiva a CD3 en los linfocitos y a través de un histograma de fluorescencia se identificaron las poblaciones positivas a CD4 y CD8.

Finalmente, se analizó la expresión de INF- γ e IL-4 de células CD4⁺ en una gráfica de dot-plot, se realizó el mismo procedimiento para las células CD8⁺. Con base en los resultados de las gráficas de dot-plot se determinó la frecuencia de las poblaciones de células CD4⁺ y CD8⁺ productoras de INF- γ e IL-4 específica para cada péptido.

6.7.2 Determinación de los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a específicos a los péptidos en suero de ratones BALB/c infectados e inmunizados.

Se obtuvo el suero de cada uno de los ratones mediante la extracción de 1 mL de sangre por punción cardíaca, previa anestesia con pentobarbital sódico (0.2mg/g), la sangre se dejó a temperatura ambiente hasta su coagulación y se centrifugó por 10 minutos a 750 x g para la obtención del suero.⁷⁴

En una placa de 96 pozos, se sensibilizó con 100 μ L por pozo de una solución con la mezcla de los péptidos correspondiente a las formulaciones de los grupos experimentales a una concentración de 0.08 μ g/mL, también se sensibilizó la placa con cada péptido por separado en amortiguador de carbonatos (Na₂CO₃ 0.01 M, NaHCO₃ 0.02 M, NaN₃ 3 mM) pH 9.6, la placa se dejó en incubación toda la noche a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y los pozos fueron lavados para eliminar el exceso de antígeno con 300 μ L de (PBST) amortiguador salino de fosfatos (PBS, NaH₂PO₄·H₂O 0.1 M, Na₂HPO₄·7H₂O 0.08 M, NaCl 1.55 M) pH 7.4 con monolaurato de sorbitán polioxietilénico 20 (Tween 20) al 0.05%. Para bloquear los sitios inespecíficos se utilizó albumina de suero bovino (BSA) al 1%, la placa se dejó en incubación a 37°C por 2h. Posterior al bloqueo se lavaron 5 veces con amortiguador PBST, este paso se realizó para eliminar los excesos de BSA que no se adhirieron a la placa.⁷⁵ Luego de los lavados se colocaron las muestras.

Para la detección de IgG totales las muestras correspondientes al ratón sano y los ratones de los grupos experimentales fueron diluidas 1:5 000, para IgG2a e IgG1 se diluyeron a 1:200 en PBST. Una vez preparadas las muestras, se añadieron 100 μ L a cada pozo y se dejó incubar 1 h a 37°C, posteriormente se realizaron 5 lavados con PBST.⁷⁵

Como anticuerpo de detección para IgG total se utilizó un anti-IgG acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich, No. Catálogo A5153), y para la detección de los subtipos IgG1 e IgG2a, se utilizó un anti-IgG1 (Sigma Aldrich, No. Catálogo SAB3701172) o anti-IgG2a (No. Catálogo SAB3701179), ambos acoplados a fosfatasa alcalina. Se añadió 100 μ L en cada pozo de una dilución 1:1000 del anticuerpo de detección e incubó por 1 h a 37°C. Después, se realizó 5 lavados con PBST y se adicionó 75 μ L de p-nitrophenyl phosphate (pNPP) 1mg/ml (Sigma Aldrich, No. Catálogo S0942-200TAB) se incubó 30 min a 37°C, la reacción fue detenida con 25 μ L de NaOH 3 N y la lectura se realizó a 405 nm en un lector de placas para ELISA.⁷⁵

6.8 Análisis estadístico.

Los resultados de parasitemia, células infiltradas, nidos de amastigotes y carga parasitaria del tejido cardíaco, se analizaron mediante un estadístico para definir si presentan una distribución normal. Como todos presentaron una distribución normal se empleó la prueba paramétrica ANOVA para la comparación entre los grupos tratados con las diferentes formulaciones, si este estadístico resultaba con significancia se continuo con el análisis a través de la prueba *post hoc* de Tukey. Los valores con $p < 0.05$ se tomaron como estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos de la sobrevivencia de los animales experimentales fueron analizados mediante una curva de sobrevivencia de Mantel-Cox, se tomaron los valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

Se realizó un análisis de regresión lineal para determinar la relación del número de péptidos contenido en la formulación con respecto a los resultados de las infiltradas, nidos de amastigotes y carga parasitaria del tejido cardíaco.

Todos los análisis se realizaron a través de programa GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA).

VII. RESULTADOS

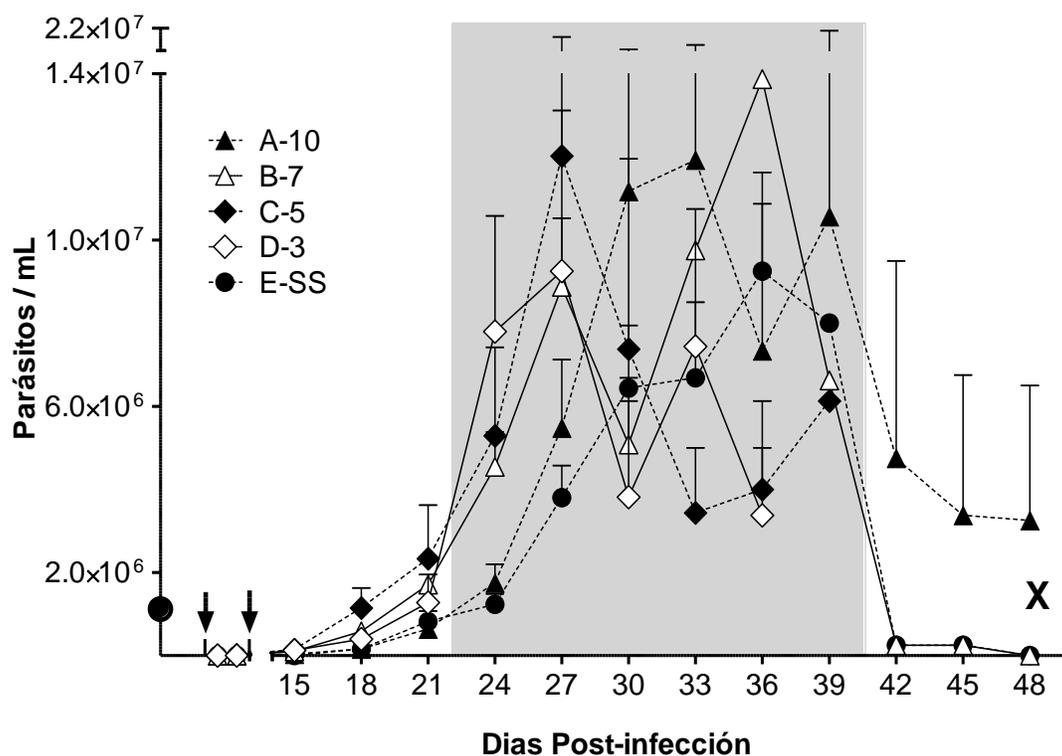
7.1 Determinación del efecto terapéutico de las diferentes combinaciones de péptidos en el desarrollo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi* en ratones BALB/c

7.1.1 Parasitemia y sobrevivencia

Para determinar si los péptidos con menor inmunogenicidad son necesarios en la formulación compuesta por los diez péptidos para mantener el efecto terapéutico en ratones BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi*, se evaluó el desarrollo de la parasitemia y la sobrevivencia de los animales infectados y tratados con las diferentes combinaciones de péptidos hasta el día 48 post-infección.

En la evaluación del desarrollo de la parasitemia todos los grupos tratados e infectados presentaron resultados similares (gráfica 1). Por lo cual, ningún grupo tratado con los péptidos presentó una disminución significativa de la parasitemia en comparación con el control E-SS. Además, en las mediciones de la parasitemia del día 24 y 27, los grupos tratados con péptidos presentaron mayor parasitemia que el control E-SS, esta relación no se conservó a lo largo del proceso infeccioso, posiblemente debido al comienzo de la mortalidad de los animales. Sin embargo, el grupo A-10 presentó parásitos aun al final del proceso infeccioso.

Por lo cual, no se observó ningún efecto en la parasitemia por la eliminación de los péptidos menos inmunogénicos en las diferentes combinaciones.

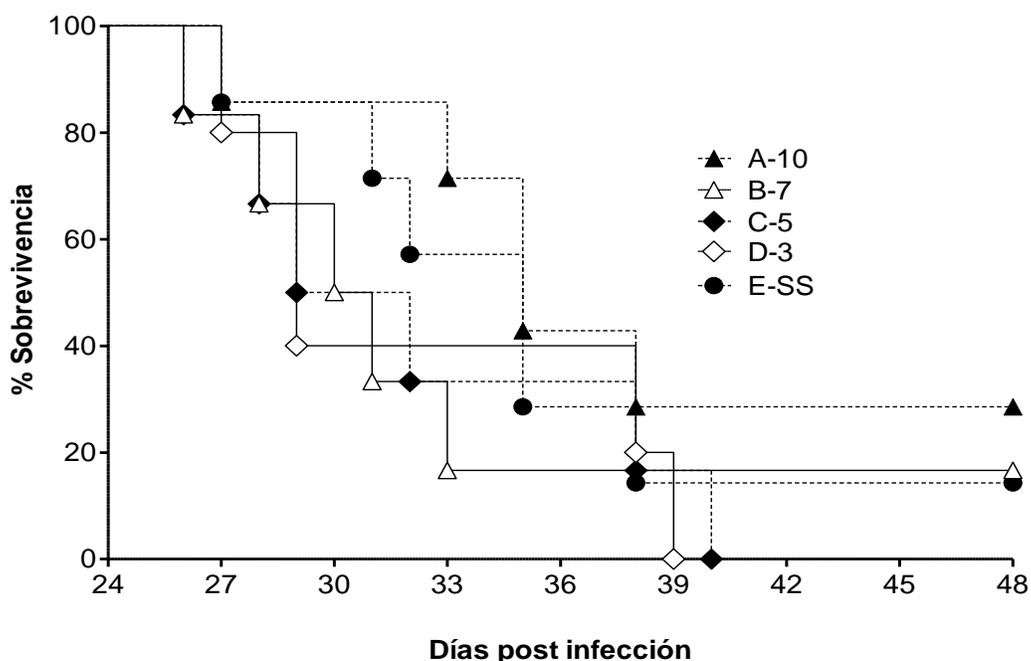


Grafica 1. Desarrollo de la parasitemia de los diferentes grupos experimentales infectados con *T. cruzi* e inmunizados con las diferentes combinaciones de péptidos. En la gráfica se presentan la media de los resultados para cada grupo con su error estándar correspondiente.

(↓) inmunizaciones (●) infección con *Trypanosoma cruzi* (X) Sacrificio

Con respecto a la sobrevivencia de los animales infectados e inmunizados con las diferentes combinaciones terapéuticas (gráfica 2), para el grupo A-10 fue de 29%, el grupo B-7 de 17%, el grupo C-5 de 0%, D-3 el 0% y el grupo E-SS de 14%. Ningún grupo tratado con las combinaciones de péptidos presentó un aumento significativo de la sobrevivencia en comparación con el grupo control E-SS. Además, los grupos C-5 y D-3 presentaron menor sobrevivencia que el control E-SS.

Sin embargo, el análisis de los grupos tratados con las combinaciones se observó que a mayor número de péptidos contenidos en la combinación la sobrevivencia tiende a ser mayor. Esto sugiere que los péptidos con menor inmunogenicidad participan en el desarrollo del efecto terapéutico. Por lo cual, los 10 péptidos son requeridos para la formulación de la vacuna terapéutica.

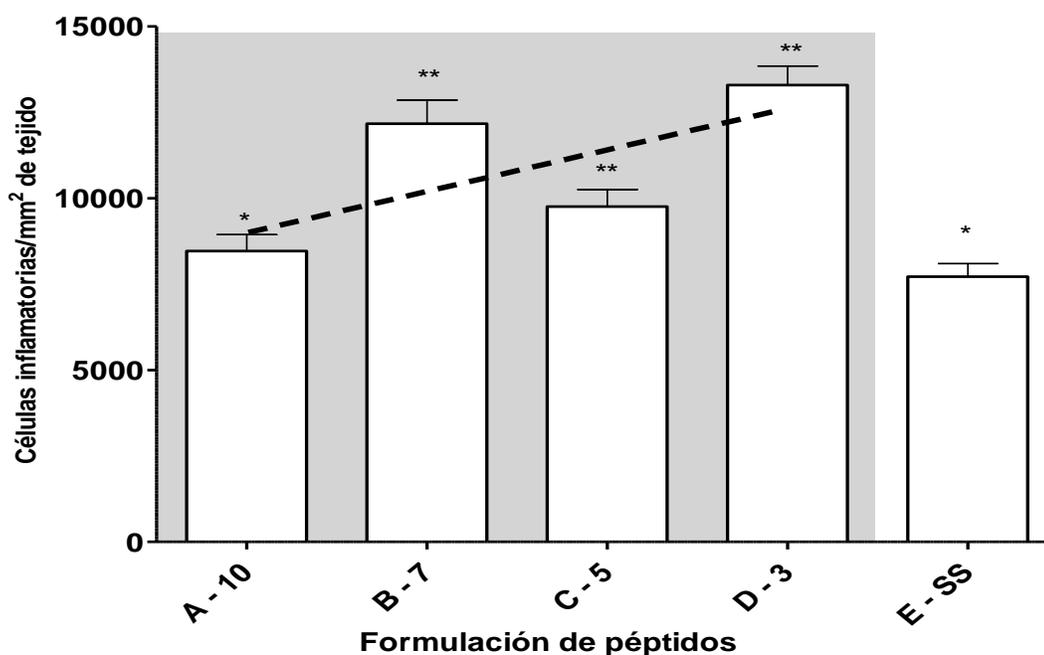


Grafica 2. Curva de sobrevivencia de los ratones BALB/c de los diferentes grupos experimentales previamente inmunizados frente a una infección con *T. cruzi*. Se muestran los decesos de cada grupo experimental durante el proceso infeccioso.

7.1.2 Células inflamatorias en el tejido cardíaco

Debido a que el corazón es uno de los principales órganos afectados por el parásito, se evaluó el daño ocasionado por éste al tejido cardíaco a través de la medición de las células inflamatorias, los nidos de amastigotes y la carga parasitaria en el tejido de los ratones infectados.

En el análisis de la densidad de células infiltradas por mm^2 de tejido cardíaco de los animales, los resultados (gráfica 3) fueron para el grupo A-10 de 8 461 células inflamatorias/ mm^2 , para el grupo B-7 de 12 169, para el grupo C-5 de 9 754, para el grupo D-3 de 13 293 y el grupo E-SS de 7 714. Por lo tanto, ningún grupo presentó la disminución de las células inflamatorias en con respecto al grupo control E-SS. Además, el control E-SS presentó una disminución ($p < 0.0001$) de las células inflamatorias en el tejido cardíaco con respecto los grupos B-7, C-5 y D-3.



Grafica 3. Células inflamatorias en el tejido cardíaco. Se muestra la cuantificación de las células inflamatorias/ mm^2 presentes en el tejido cardíaco mediante el análisis de fotografías por el programa MultiSpecW32. Se realizó una prueba ANOVA y una *post hoc* de Tukey para la comparación entre grupos. Diferencia significativa entre * y ** ($p < 0.0001$). En la gráfica se presentan la media de los resultados por cada grupo con su error estándar correspondiente. La línea (----) representa el análisis de regresión lineal ($p < 0.0001$) de las combinaciones terapéuticas con respecto a la presencia de células inflamatorias en el tejido cardíaco.

En el análisis de los resultados de los grupos tratados con las diferentes combinaciones, el grupo tratado con la combinación A-10 produjo en el tejido cardíaco de los animales una disminución ($p < 0.0001$) de la densidad de células infiltradas en comparación a las otras combinaciones terapéuticas a las que se les eliminaron los péptidos menos inmunogénicos.

A pesar de que ninguna combinación presentó una disminución significativa de las células inflamatorias en comparación con el grupo control E-SS. En el análisis de regresión con la densidad de células inflamatorias y el número de péptidos contenidos en la combinación ($p < 0.0001$), se observó que la inflamación del tejido cardíaco aumenta debido a la disminución del número de péptidos contenidos en las combinaciones terapéuticas.

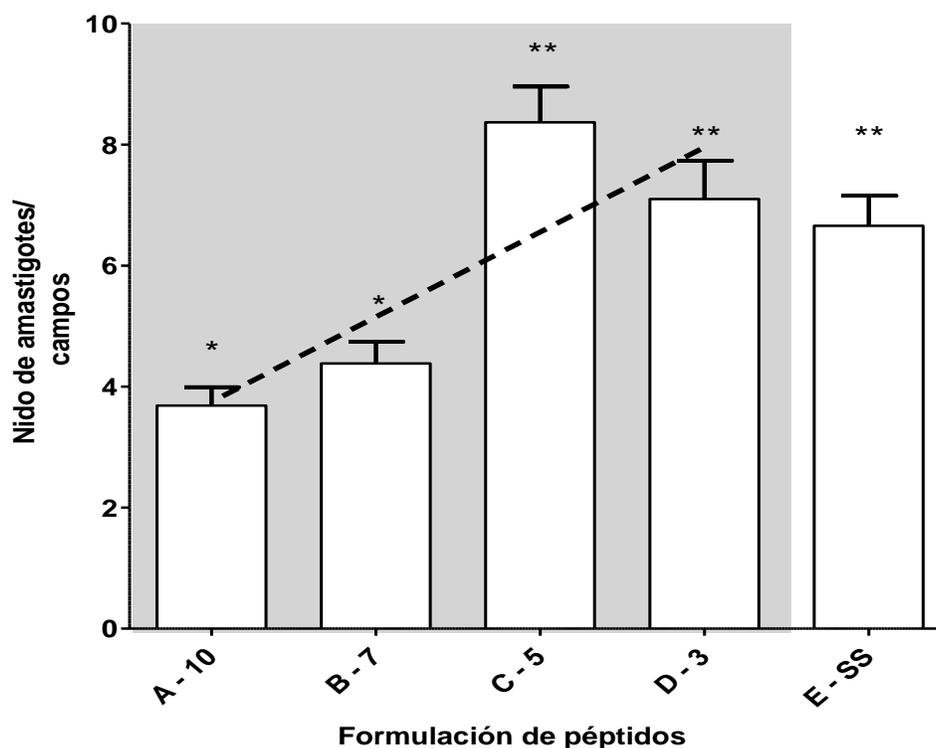
La eliminación de los péptidos menos inmunogénicos en las combinaciones terapéuticas provoca el aumento de la inflamación del tejido cardíaco. Por lo tanto, los 10 péptidos son necesarios en la formulación la vacuna terapéutica para el desarrollo del efecto terapéutico en los ratones BALB/c infectados.

7.1.3 Nidos de amastigotes en el tejido cardíaco

En la evaluación de los nidos de amastigotes presentes en el tejido cardíaco de los animales tratados (gráfica 4), el grupo A-10 presentó "4" nidos de amastigotes/campo, el grupo B-7 "4", el grupo C-5 "8", el grupo D-3 "7" y el grupo E-SS "7".

Los grupos inmunizados con las combinaciones A-10 y B-7 presentaron en el tejido cardíaco un número significativamente menor de nidos de amastigotes ($p < 0.0001$) en comparación con los grupos tratados con las combinaciones C-5, D-3 y el grupo E-SS.

De manera interesante, aun la eliminación de los péptidos P17, P15, P24 (combinación B-7) permitió la protección del tejido cardíaco de la formación de nidos de amastigotes durante la fase aguda de la infección en comparación con la combinación A-10.



Grafica 4. Nidos de amastigotes presentes en tejido cardíaco. Se muestra la determinación de los nidos de amastigotes/campo presentes en el tejido cardíaco. Se realizó una prueba ANOVA y una *post hoc* de Tukey para la comparación entre grupos. Diferencia significativa entre * y ** ($p < 0.0001$). En la gráfica se presentan la media de los resultados por cada grupo con su error estándar correspondiente. La línea (----) representa el análisis de regresión lineal ($p < 0.0001$) de las combinaciones terapéuticas con respecto al número de amastigotes en el tejido cardíaco.

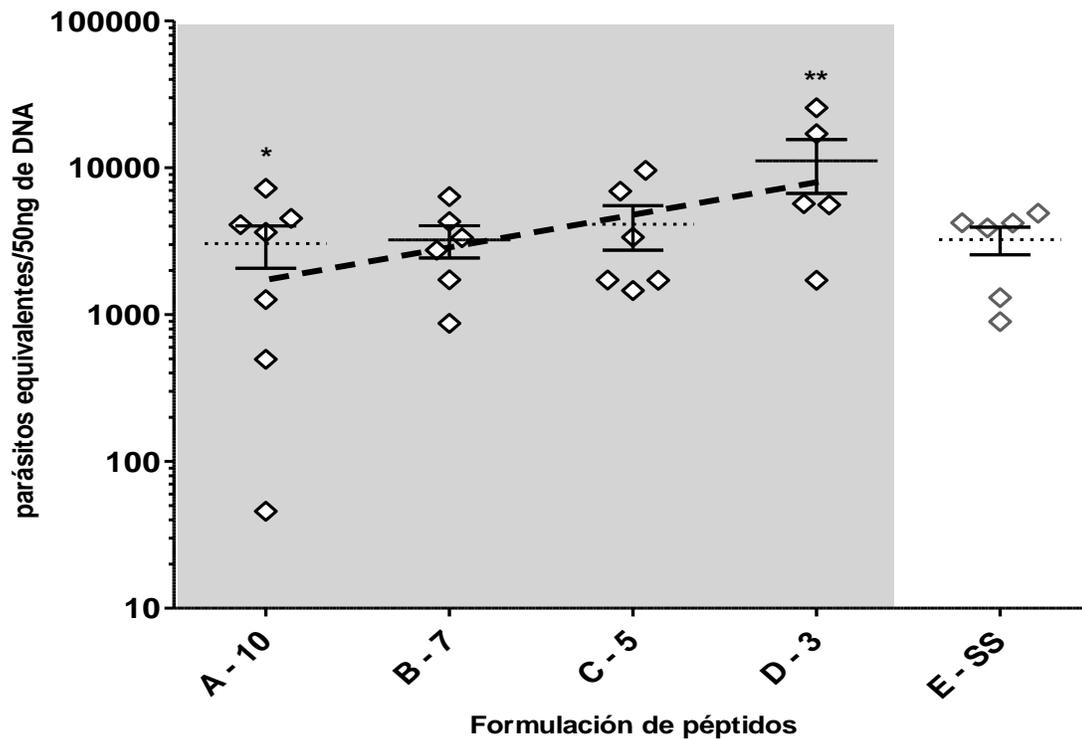
A pesar de que solo las combinaciones A-10 y B-7 presentaron una disminución significativa de las células inflamatorias en comparación con el grupo control E-SS. El análisis de regresión con los nidos de amastigotes en el tejido cardíaco y el número de péptidos de las combinaciones ($P < 0.0001$), permitió establecer que el número de los nidos de amastigotes aumenta debido a la disminución del número de péptidos en las combinaciones terapéuticas.

También, la eliminación de los péptidos menos inmunogénicos de las combinaciones provoca el aumento de la presencia de los nidos de amastigotes en el tejido cardíaco. Por lo tanto, los 10 péptidos son necesarios en la formulación la vacuna terapéutica para el desarrollo del efecto terapéutico en los ratones BALB/c infectados.

7.1.4 Carga parasitaria en tejido cardíaco

En la determinación de la carga parasitaria del tejido cardíaco, los resultados (gráfica 5) fueron, para el grupo A-10 de 3 046 parásitos en 50ng de ADN de muestra, para el grupo B-7 de 3 230, para el grupo C-5 de 4 671, para el grupo D-3 de 11 146 y para el grupo E-SS de 3 243.

Ningún grupo tratado con los péptidos presentó una diferencia significativa con respecto al grupo control E-SS. Sin embargo, el grupo tratado con la formulación A-10 produjo la disminución ($p = 0.037$) de la carga parasitaria solamente con respecto a la combinación D-3.



Grafica 5. Carga parasitaria presente en los tejido cardíaco de los ratones BALB/c de los diferentes grupos experimentales previamente inmunizados frente a una infección con *T. cruzi*. Se muestran la carga parasitaria (parásitos equivalentes en 50ng de ADN) correspondiente a cada grupo. Se realizó una prueba ANOVA y una *post hoc* de Tukey para la comparación entre grupos. Diferencia significativa entre * y ** ($p=0.037$). En la gráfica se presentan la media de los resultados por cada grupo con su error estándar correspondiente. La línea (---) representa el análisis de regresión lineal ($p<0.039$) de las combinaciones terapéuticas con respecto a los parásitos presentes en el tejido cardíaco.

A pesar de que ninguna combinación presentó una disminución significativa de la carga parasitaria en comparación con el grupo control E-SS. En el análisis de regresión de la carga parasitaria del tejido cardíaco y el número de péptidos de la combinación ($p=0.039$), permitió establecer que la carga parasitaria en el tejido cardíaco aumenta debido a la disminución del número de péptidos contenidos en las combinaciones terapéuticas.

Finalmente, la eliminación de los péptidos menos inmunogénicos de la combinaciones provoca el aumento de la carga parasitaria en el tejido cardíaco. Por lo tanto, los 10 péptidos son necesarios en la formulación la vacuna terapéutica para el desarrollo del efecto terapéutico en los ratones BALB/c infectados.

7.2 Determinación de la respuesta inmune inducida por el tratamiento con las diferentes combinaciones de péptidos en los ratones BALB/c infectados.

7.2.1 Cuantificación de la proporción de linfocitos T (CD8⁺ o CD4⁺) productores de INF- γ o IL-4 por citometría de flujo.

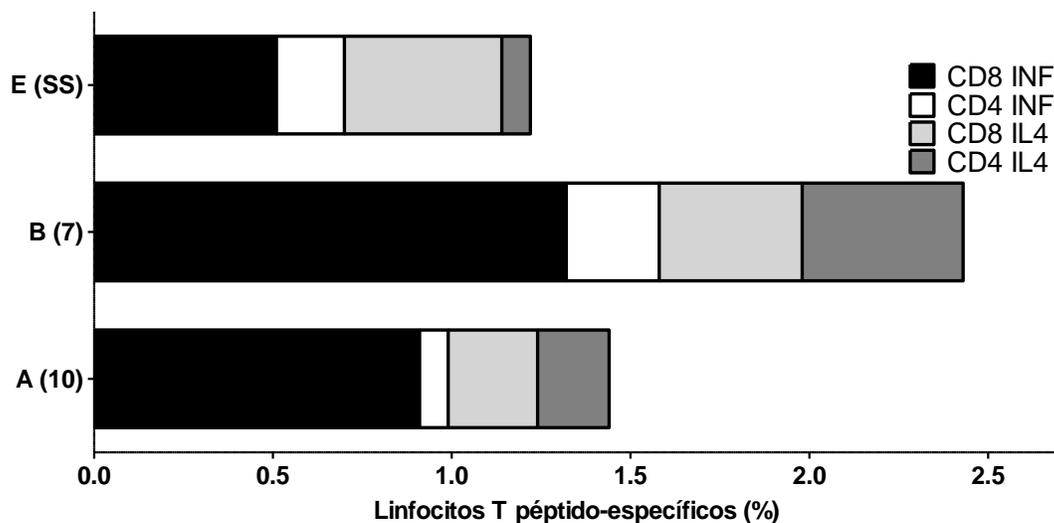
Con el objetivo de conocer el tipo de respuesta inmune desarrollada en los animales infectados e inmunizados con las diferentes combinaciones de péptidos, se determinaron las frecuencias de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ productores de INF- γ o IL-4 específicos a los péptidos.

Debido a la elevada mortalidad de los animales de los diferentes grupos experimentales, los resultados presentados a continuación corresponden únicamente a los ratones sobrevivientes del estudio, 2 ratones del grupo A-10, 1 del grupo B-7 y 1 del grupo E-SS.

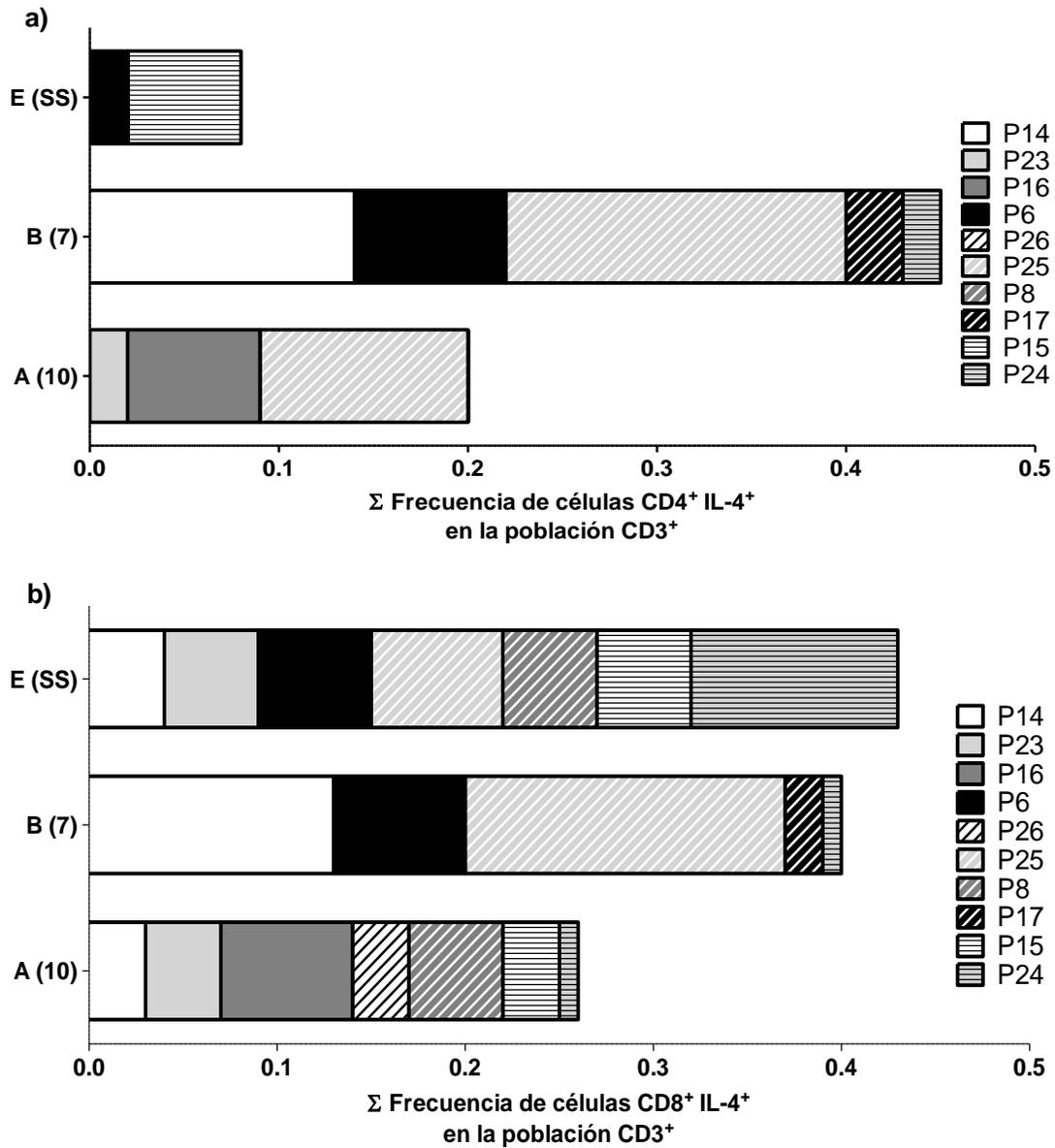
En la evaluación de la respuesta inmune desarrollada por la inmunización de las diferentes combinaciones en los animales infectados, las células de bazo de los animales tratados con la combinación A-10 como la B-7, presentaron la mayor frecuencia de los linfocitos T productores de INF- γ específicos a los péptidos en comparación a los linfocitos T productores de IL-4 (Grafica 6). De los cuales, la frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ productores de INF- γ predomina para ambos grupos.

En el análisis de la contribución de cada péptido en la reactivación de los linfocitos T productores de IL-4 (Gráfica 7) o INF- γ (Gráfica 8) presentes en las células de bazo de los animales inmunizados e infectados, se observó que todos los péptidos poseen la capacidad de provocar la reactivación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ productores de INF- γ . Sin embargo, los péptidos presentaron diferente capacidad para provocar la reactivación de los linfocitos T CD8⁺ productores de INF- γ en cada formulación.

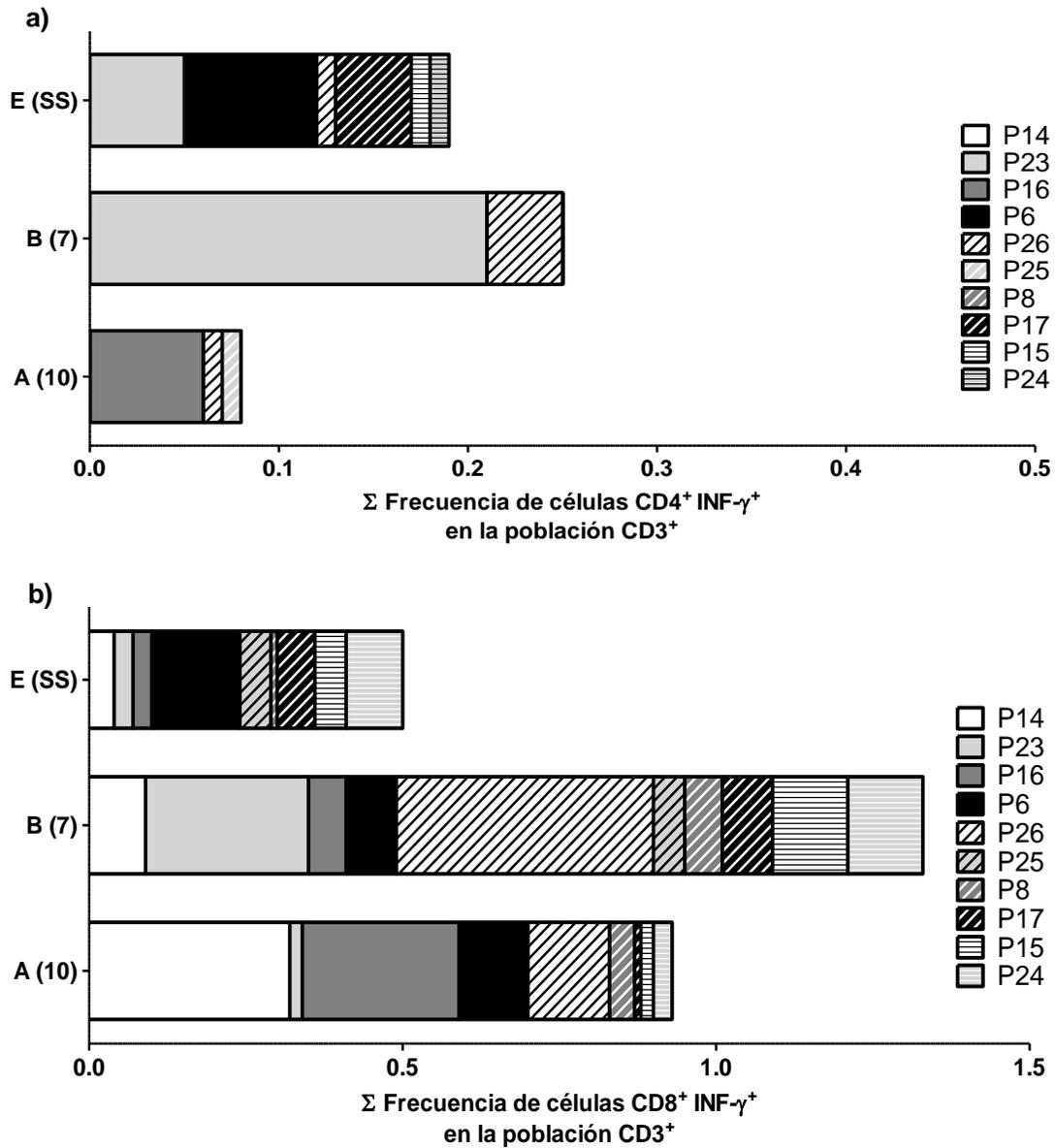
Estos resultados sugieren que la respuesta inmune desarrollada por la inmunización con las combinaciones de péptidos corresponde a una respuesta inmune tipo Th₁ caracterizada por la presencia predominante de linfocitos T CD8⁺ productores INF- γ . Por lo tanto, todos los péptidos utilizados en las formulaciones participan en la activación de una respuesta inmune celular durante la infección por *T. cruzi* en los ratones BALB/c.



Gráfica 6. Evaluación de la respuesta celular producida por los péptidos en ratones BALB/c inmunizados y/o infectados. Sumatoria de la frecuencia de linfocitos T productores de IL-4 o INF- γ en las células de bazo de los ratones inmunizados con la combinación de péptidos y el grupo control, después de su estimulación *in vitro* con los péptidos



Gráfica 7. Evaluación de la respuesta inmune protectora de los linfocitos T péptido-específicos productores de IL-4. Sumatoria de la frecuencia de (a) linfocitos T CD4⁺ y (b) CD8⁺ productoras INF- γ en las células de bazo de los ratones inmunizados con la combinación de péptidos y el grupo control, después de su estimulación *in vitro* con los péptidos. Con respecto al grupo A se grafican la media (n=2) de la frecuencia de linfocitos T productores de INF- γ para cada péptido, para el grupo B y E el valor corresponde a un solo ratón.



Gráfica 8. Evaluación de la respuesta inmune protectora de los linfocitos T péptido-específicos productores de INF-γ. Sumatoria de la frecuencia de (a) linfocitos T CD4⁺ y (b) CD8⁺ productoras INF-γ en las células de bazo de los ratones inmunizados con la combinación de péptidos y el grupo control, después de su estimulación *in vitro* con los péptidos. Con respecto al grupo A se grafican la media (n=2) de la frecuencia de linfocitos T productores de INF-γ para cada péptido, para el grupo B y E el valor corresponde a un solo ratón.

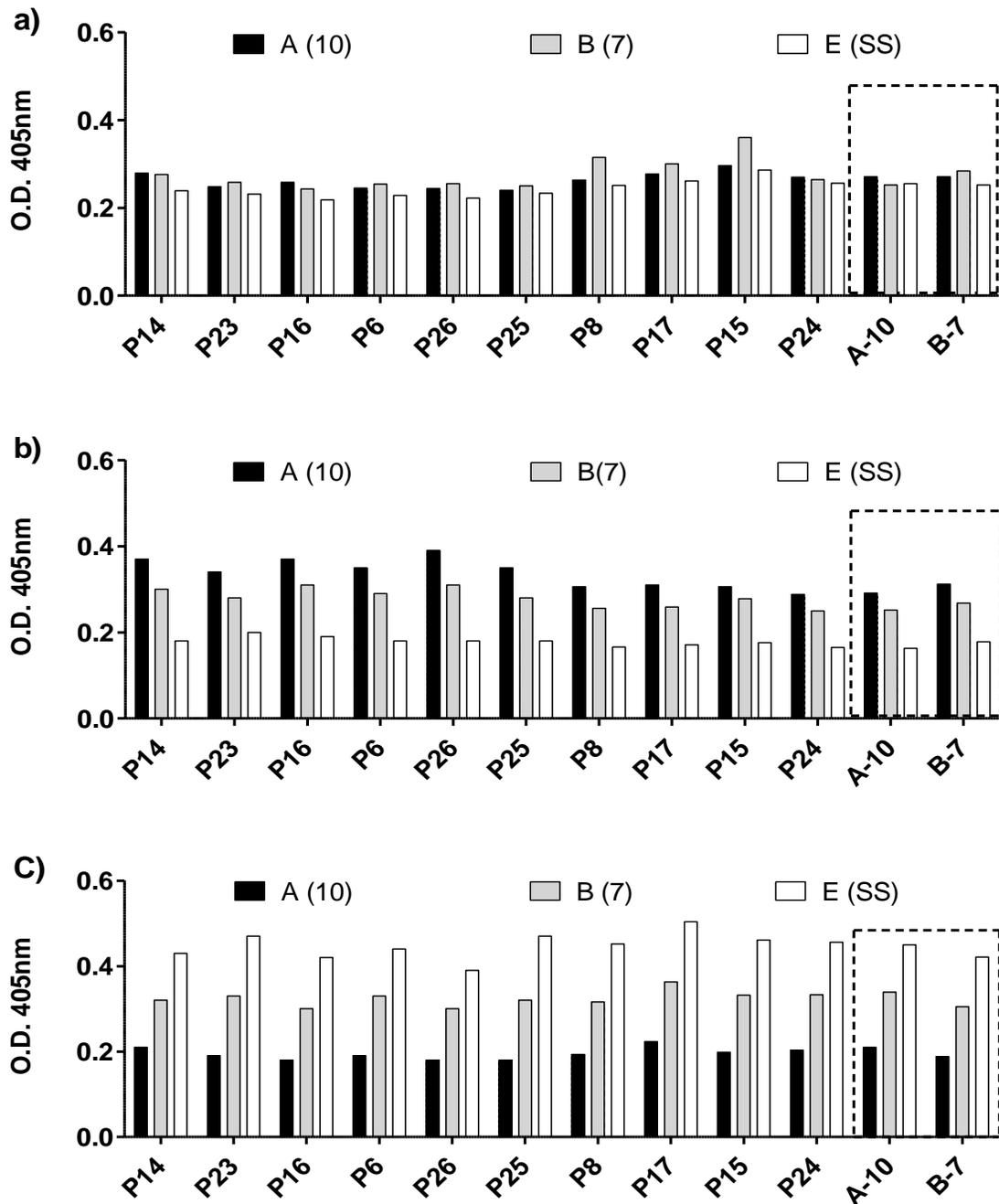
7.2.2 Determinación de los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a específicos a los péptidos en suero de ratones BALB/c infectados e inmunizados.

Para evaluar la polarización de la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización de los animales con las diferentes formulaciones de péptidos se determinaron los niveles de IgG total y los subtipos IgG1 e IgG2 específicos para cada péptido.

En la determinación de los anticuerpos específicos a la mezcla de los péptidos de A-10 y B-7, todos los animales presentaron niveles de IgG totales (gráfica 9a), así como de los subtipos IgG1 (gráfica 9b) e IgG2a (gráfica 9c).

Para establecer si todos los péptidos contribuyen en la respuesta inmune humoral, se realizó la determinación de los anticuerpos específicos para cada péptido. Como resultado se obtuvo que todos los animales presentaron niveles de IgG totales (gráfica 9a), IgG1 (gráfica 9b) e IgG2a (gráfica 9c) específicos para cada uno de los diez péptidos. Sin embargo, el ratón del grupo E-SS presentó los mayores niveles de IgG2a que IgG1 específicos para cada uno de los diez péptidos. Los animales tratados con la combinación A-10, presentaron menores niveles de IgG2a que IgG1 para todos los péptidos. Para la combinación B-7, los niveles de IgG2a fueron similares a IgG1 en todos los casos.

Por lo tanto, los 10 péptidos participan en la activación de una respuesta inmune humoral inducida en los animales infectados e inmunizados.



Gráfica 9. Evaluación de la respuesta humoral péptido-específica desarrollada en ratones BALB/c inmunizados y/o infectados. La grafica corresponde a los resultados de la determinación de los anticuerpos (a) IgG total, (b) IgG1 e (c) IgG2a para los grupos experimentales. Se grafican la media para el grupo A (n=2), para el grupo B y E el valor corresponde a un solo ratón.

VIII. DISCUSIÓN

En los pacientes chagásicos con la fase aguda de la enfermedad el tratamiento farmacológico con benznidazol o nifurtimox ha demostrado inducir el control de la parasitemia y disminuir la miocarditis. Sin embargo, estos fármacos no poseen eficacia para el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad y provocan severos efectos adversos en los pacientes tratados.^{76, 77} Además, varios estudios han demostrado que cerca del 60-70% de los pacientes chagásicos permanecen seropositivos y mantienen el parásitos durante toda la vida, sin desarrollar una forma sintomática de la enfermedad.^{40, 78}

Por lo cual, el desarrollo de una vacuna terapéutica para el tratamiento de los pacientes chagásicos podría prevenir las complicaciones cardíacas en los más de 40, 000 casos nuevos de la enfermedad de Chagas en América Latina y prevenir las 10'000 muertes ocasionadas anualmente. También, permitiría reducir la frecuencia y la gravedad de la enfermedad clínica y de esta manera mejorar la salud de los pacientes.⁷⁹

En un estudio reciente se identificó diez péptidos derivados de *T. cruzi* como antígenos para el desarrollo de un vacuna terapéutica.² En la evaluación de la inmunogenicidad, los 10 péptidos presentaron diferente potencial para inducir la producción de INF- γ por las células de la bazo estimuladas con los péptidos de manera individual.² Esto sugiere que los 10 péptidos poseen diferente capacidad inmunogénica para la activación la respuesta inmune durante el proceso infeccioso.

Debido a que la inmunogenicidad es un importante factor que determina si el complejo péptido-MHC puede ser reconocido por la clona de linfocito T específica para la activación de una respuesta contra el patógeno. La formación del complejo depende de factores relacionados con la abundancia de la proteína precursora,⁸⁰ la eficiencia durante el procesamiento de la proteína para

obtención de los péptidos con unión al MHC por la CPA, así como la estabilidad del complejo péptido-MHC durante su presentación a los linfocitos T.^{81, 82}

Por lo tanto, en el primer objetivo se determinó el efecto terapéutico de las diferentes combinaciones elaboradas con base en la inmunogenicidad de los 10 péptidos de una vacuna terapéutica en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.

En la evaluación del proceso infeccioso, las combinaciones A-10 y B-7 presentaron un efecto terapéutico parcial debido a que los resultados de la parasitemia, la inflamación y la carga parasitaria del daño al tejido cardíaco fue similar en comparación con grupo control. Por el contrario, las combinaciones C-5 y D-3 se observó un aumento de la severidad del proceso infeccioso y el daño al tejido cardíaco, con respecto al control. Estos resultados contrastan con estudios previos que utilizan vacunas terapéuticas en ratones infectados con *T. cruzi*, en los cuales, la inmunización de los animales con diferentes antígenos inducen un efecto terapéutico.⁸³⁻⁸⁵ Además, los resultados del efecto terapéutico de la combinación de A-10 presentó un efecto discordante al estudio previo.² Esto probablemente ocurrió por la disminución de la dosis de los péptidos en las formulaciones terapéuticas, lo que provocó la disminución del péptido en el sitio de la inmunización afecte la formación del complejo péptido-MHC durante la presentación antigénica por las CPA's,^{80, 86} afectando la activación de la respuesta inmune asociada al efecto terapéutico, demostrado en el estudio previo.²

El aumento de la severidad de la infección en los animales tratados con las combinación C-5 y D-3, sugiere que estas combinaciones podrían estar activando en conjunto con la infección una exacerbada respuesta inmune inflamatoria durante la infección,^{58, 87} la cual puede estar implicada en el aumento del daño al tejido cardíaco y la mortalidad de los animales.

Continuando con el primer objetivo, se llevó a cabo el análisis de los resultados del efecto terapéutico de los grupos tratados con las diferentes combinaciones para establecer si los péptidos aun con menor inmunogenicidad son requeridos en la formulación de las vacunas terapéuticas.

En el efecto terapéutico, se observó que la eliminación de los péptidos menos inmunogénicos de las diferentes formulaciones no provocó ningún cambio en la parasitemia. Con respecto a la sobrevivencia de los ratones tratados con las formulaciones, esta mostró una tendencia a disminuir como efecto de la eliminación de los péptidos menos inmunogénicos de las formulaciones. En cuanto a la evaluación del daño al tejido cardíaco, tanto la inflamación, los nidos de amastigotes y la carga parasitaria, presentaron un aumento como efecto de la eliminación de los péptidos menos inmunogénicos de las combinaciones terapéuticas. Similar a otros estudios, donde se ha observado que los péptidos aun con menor inmunogenicidad tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune asociada con el efector protector frente a un patógeno.^{88, 89} Por lo tanto, estos resultados sugieren que los péptidos aun con menor inmunogenicidad, si participan de manera importante en la activación de una respuesta inmune necesaria para lograr un efecto terapéutico de la vacuna en los animales tratados.

Por otra parte, en el análisis de regresión de los resultados del efecto terapéutico se demostró que la presencia de células inflamatorias, nidos amastigotes y del parásito en el tejido cardíaco aumentaron como efecto de la disminución de los péptidos contenidos en la formulación terapéutica. Otros estudios, también han validado que el número de antígenos contenidos en la formulación afecta directamente en el efecto terapéutico de la vacuna.⁹⁰⁻⁹² Lo que sugiere que si se aumenta el número de péptidos en la formulación de la vacuna, esto mejoraría su efecto terapéutico.

Los resultados del efecto terapéutico, nos indican que las combinaciones compuestas de más péptidos inmunogénicos, derivados de diferentes proteínas de *T. cruzi*, permiten un mejor control de la infección, debido a que inducen una respuesta inmune dirigida hacia diferentes componentes del parásito, en comparación con las vacunas que utilizan un único antígeno o péptido.⁹³⁻⁹⁵ Por lo cual, es importante continuar con la evaluación del efecto terapéutico de una vacuna formulada con los diez péptidos (A-10) en combinación con otros péptidos inmunogénicos o antígenos que han demostrado activar una respuesta inmune protectora, como TS-1 y Tc24.^{84, 96}

Por otra parte, con los animales que sobrevivieron a la fase aguda de la infección se continuó con el segundo objetivo, el cual consistió en la determinación *in vitro* de la respuesta inmune inducida por la inmunización con los péptidos en los ratones BALB/c infectados, esto para establecer si los péptidos aun con menor inmunogenicidad participan en la activación de la respuesta inmune que permite el efecto terapéutico de la vacuna.

En las células de bazo de los ratones estimuladas *in vitro* con cada uno de los diez péptido, se observó la reactivación principalmente de linfocitos T CD8⁺ productores de INF- γ , esto sugiere que los péptidos tienen la capacidad de unirse al MHC clase I de la CPA, lo que provoca la activación específica de clonas de linfocitos T CD8⁺ durante la inmunización o la infección de los animales. Sin embargo, cada péptido presentó una capacidad diferente para la reactivación de los linfocitos T CD8⁺ productores de INF- γ , lo que propone que los diez péptidos contribuyen de manera diferente en la activación de una respuesta inmune en el efecto terapéutico en los ratones tratados con las formulaciones.

Además, la estimulación de las células de bazo con cada uno de los 10 péptidos produjo la activación, tanto de linfocitos T CD4⁺ y como CD8⁺ productores de INF- γ . Ambas subpoblaciones de linfocitos T están relacionadas

con el control de la de la infección por *T cruzi*,^{97, 98} lo que sugiere que los diez péptidos participan en la activación de la respuesta inmune contra el parásito.

En la determinación de los niveles de anticuerpos específicos de los péptidos, se observó que todos los animales presentaron niveles de IgG totales, IgG1 e IgG2a específicos para cada uno de los diez péptidos. Esto sugiere que las CPA's presentan cada péptido en el contexto del MHC clase II a las clonas específicas de linfocitos T CD4⁺, los cuales interaccionan con linfocitos B que previamente han reconocido los péptidos, lo que induce el cambio de isotipo a IgG1 o IgG2a específicos de los péptidos.

De manera interesante, el ratón del grupo E-SS presentó mayores niveles de IgG2a que IgG1 específicos de los péptidos, ésta relación se asocia con el control de la infección.^{13, 99} A diferencia, los animales tratados con las formulaciones A-10 y B-7 presentaron menores niveles de IgG2a que IgG1, pero mostraron un menor daño del tejido cardíaco y mayor sobrevivencia. Esto podría deberse a que los animales tratados con las formulaciones presentaron una mayor frecuencia de linfocitos T productores de INF- γ , esta citocina induce que las células plasmáticas produzcan anticuerpos con una mayor afinidad, lo que mejora su capacidad de activar mecanismos inmunes para la eliminación del parásito.^{100, 101} Además, este fenómeno también fue observado en el estudio donde niveles bajos de anticuerpos específicos de Cruzipaina (Cz) redujo dramáticamente la infección de *T. cruzi* en comparación a los sueros con niveles elevados de anticuerpos específicos a Cz,¹⁰² lo que sugiere que los anticuerpos inducidos por la inmunización con las formulaciones induce la producción de IgG con mejor eficiencia en el control de la infección.

Finalmente, en los animales tratados con la formulación de 10 péptidos se observó la presencia de anticuerpos (IgG2a, IgG1), linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ productores de INF- γ específicos para los diez péptido, lo que sugiere que los diez péptidos podrían estar provocando un efecto sinérgico en la activación de

la respuesta inmune para el desarrollo del efecto terapéutico. A diferencia de otros estudios,^{103, 104} donde el empleo de formulaciones con varios antígenos provocó un efecto inhibitorio o competitivo de estos para la inducción de la respuesta inmune específica al patógeno resultando en el desarrollo de una ineficiente respuesta inmune.

Por otra parte, los péptidos P15, P17, P24, P25, P26 están contenidos en proteínas asociadas con el transporte a través de la membrana durante la diferenciación del parásito.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Por lo cual, a pesar de que estos péptidos poseen una baja inmunogenicidad su necesidad en la formulación terapéutica podría deberse a que la respuesta inmune específica a estos péptidos está dirigida a dañar procesos metabólicos importantes del parásito.

Los resultados de la respuesta inmune demuestran que los diez péptidos participan en el efecto terapéutico frente a una infección de por *T. cruzi* en ratones BALB/c. Sin embargo, estos péptidos fueron predichos y validados para el MHC clase I de ratones BALB/C (alelo H-2D^d).² Por lo tanto, es importante continuar con los estudios para evaluar si estos péptidos poseen la capacidad de unirse a los diferentes MHC clase I expresados por los humanos (HLA- A, B, C). Así como también, establecer si son capaces de activar una respuesta inmune específica durante la infección en pacientes con la enfermedad de Chagas, como otros péptidos.^{56-58, 109} Esto para continuar con el desarrollo de una vacuna terapéutica contra la enfermedad.

Por lo tanto, la eliminación de los péptidos menos inmunogénicos de la formulación podría estar induciendo una reducción de la eficiencia de la respuesta inmune desarrollada hacia el parásito, lo cual estaría produciendo la disminución del efecto terapéutico. Lo que sugiere que los 10 péptidos con son necesarios en la formulación para lograr el efecto terapéutico de la combinación.

IX. CONCLUSIONES

- Los resultados de la evaluación del efecto terapéutico y la respuesta inmune sugieren que los péptidos menos inmunogénicos son requeridos en las formulaciones elaboradas a partir de una vacuna terapéutica compuesta de 10 péptidos en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*. Asimismo, se demostró que a mayor número de péptidos contenidos en la formulación el efecto terapéutico tiende a ser mayor.

X. RECOMENDACIONES

- Debido a que se demostró que a mayor número de péptidos contenidos en la formulación el efecto terapéutico tiende a ser mayor, se podría continuar con la identificación de nuevos péptidos inmunogénicos para administrarlos junto con la formulación de los diez péptidos para determinar si el efecto terapéutico podría mejorar.
- Los diez péptidos fueron predichos para el MHC de ratones BALB/c, se debería determinar si estos péptidos poseen la capacidad de unirse a los diferentes subtipos de HLA clase I de células humanas, y evaluar si activan una respuesta inmune específica en los pacientes con la enfermedad de Chagas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Chagas disease: control and elimination. <http://www.who.int/tdr/en/> (Consultado 19 de noviembre del 2016).
2. Teh-Poot, C.; Tzec-Arjona, E.; Martinez-Vega, P., *et al.* From genome screening to creation of vaccine against *Trypanosoma cruzi* by use of immunoinformatics. *J Infect Dis.* **2015**, *211*:258-266.
3. Sant, A. J.; Chaves, F. A.; Jenks, S. A., *et al.* The relationship between immunodominance, DM editing, and the kinetic stability of MHC class II:peptide complexes. *Immunol Rev.* **2005**, *207*:261-278.
4. Sercarz, E. E.; Maverakis, E. Recognition and function in a degenerate immune system. *Mol Immunol.* **2004**, *40*:1003-1008.
5. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* **2015**, *90*:33-43.
6. Salazar-Schettino, P. M.; Bucio-Torres, M. I.; Cabrera-Bravo, M., *et al.* Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM.* **2016**, *59*:6-16.
7. Carabarin-Lima, A.; Gonzalez-Vazquez, M. C.; Rodriguez-Morales, O., *et al.* Chagas disease (American Trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta Trop.* **2013**, *127*:126-135.
8. Cruz-Reyes, A.; Pickering-Lopez, J. M. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2006**, *101*:345-354.
9. Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet.* **2010**, *375*:1388-1402.
10. Malik, L. H.; Singh, G. D.; Amsterdam, E. A. Chagas heart disease: an update. *Am J Med.* **2015**, *128*:e12517-12519.
11. Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S., *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*:1301-1310.

12. de Souza, W.; de Carvalho, T. M.; Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, *2010*:1-18.
13. Machado, F. S.; Dutra, W. O.; Esper, L., *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol.* **2012**, *34*:753-770.
14. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas disease). <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> (Consultado Noviembre 2014).
15. Salazar, P.; Bucio, M.; Cabrera, M., *et al.* Presentacion de dos casos de Enfermedad de Chagas aguda en México. *Gaceta Médica de México.* **2011**, *147*:63-69.
16. Marin-Neto, J. A.; Rassi, A., Jr. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. *Rev Esp Cardiol.* **2009**, *62*:1211-1216.
17. Coura, J. R.; Borges-Pereira, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* **2010**, *115*:5-13.
18. Jannin, J.; Villa, L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2007**, *102 Suppl 1*:95-97.
19. Manne, J. M.; Snively, C. S.; Ramsey, J. M., *et al.* Barriers to treatment access for Chagas disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* **2013**, *7*:e2488.
20. Guedes, P. M.; Silva, G. K.; Gutierrez, F. R., *et al.* Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2011**, *9*:609-620.
21. Lauria-Pires, L.; de Castro, C. N.; Emanuel, A., *et al.* Ineffectiveness of allopurinol in patients in the acute phase of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* **1988**, *21*:79.
22. Gallerano, R. R.; Sosa, R. R. Interventional study in the natural evolution of Chagas disease. Evaluation of specific antiparasitic treatment. Retrospective-prospective study of antiparasitic therapy. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* **2000**, *57*:135-162.
23. Apt, W.; Zulantay, I. Update on the treatment of Chagas' disease. *Rev Med Chil.* **2011**, *139*:247-257.

24. Araujo, M. S.; Martins-Filho, O. A.; Pereira, M. E., *et al.* A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. *J Antimicrob Chemother.* **2000**, *45*:819-824.
25. Coronado, X.; Zulantay, I.; Rozas, M., *et al.* Dissimilar distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in humans after chemotherapy with allopurinol and itraconazole. *J Antimicrob Chemother.* **2006**, *58*:216-219.
26. Lee, B. Y.; Bacon, K. M.; Connor, D. L., *et al.* The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) vaccine in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis.* **2010**, *4*:e916.
27. Kayama, H.; Takeda, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* **2010**, *12*:511-517.
28. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. *Cellular and molecular immunology*, 6ta ed.; Elsevier: Philadelphia, 2010; pp 566.
29. Guermonprez, P.; Valladeau, J.; Zitvogel, L., *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* **2002**, *20*:621-667.
30. Burster, T. Processing and regulation mechanisms within antigen presenting cells: A possibility for therapeutic modulation. *Curr Pharm Des.* **2013**, *19*:1029-1042.
31. Blum, J. S.; Wearsch, P. A.; Cresswell, P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol.* **2013**, *31*:443-473.
32. Matsumoto, M.; Komatsu, S.; Tsuchimoto, M., *et al.* Considerations for non-clinical safety studies of therapeutic peptide vaccines. *Regul Toxicol Pharmacol.* **2014**, *70*:254-260.
33. Halling-Brown, M.; Sansom, C. E.; Davies, M., *et al.* Are bacterial vaccine antigens T-cell epitope depleted? *Trends Immunol.* **2008**, *29*:374-379.
34. Holscher, C.; Kohler, G.; Muller, U., *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun.* **1998**, *66*:1208-1215.

35. Kumar, S.; Tarleton, R. L. Antigen-specific Th₁ but not Th₂ cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* **2001**, *166*:4596-4603.
36. Miyahira, Y. *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8⁺ T cell immunity--an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int.* **2008**, *57*:38-48.
37. Tarleton, R. L. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* **1990**, *144*:717-724.
38. Laucella, S. A.; Postan, M.; Martin, D., *et al.* Frequency of interferon-gamma producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis.* **2004**, *189*:909-918.
39. Garg, N.; Bhatia, V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Rev. Vaccines.* **2005**, *4*:867-880.
40. Vazquez-Chagoyan, J. C.; Gupta, S.; Garg, N. J. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Adv. Parasitol.* **2011**, *75*:121-146.
41. Cazorla, S. I.; Frank, F. M.; Malchiodi, E. L. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Rev. Vaccines.* **2009**, *8*:921-935.
42. Bhatia, V.; Wen, J.; Zacks, M., *et al.*, American Trypanosomiasis. En *Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases*, Barret, A.; Stanberry, L., Eds.; Academic: Londres, 2009; pp 1423–1450.
43. Zinkernagel, R. M.; Doherty, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature.* **1974**, *248*:701-702.
44. Falk, K.; Rotzschke, O.; Rammensee, H. G. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* **1990**, *348*:248-251.

45. Purcell, A. W.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov.* **2007**, *6*:404-414.
46. Levitt, J. M.; Howell, D. D.; Rodgers, J. R., *et al.* Exogenous peptides enter the endoplasmic reticulum of TAP-deficient cells and induce the maturation of nascent MHC class I molecules. *Eur J Immunol.* **2001**, *31*:1181-1190.
47. Herce, H. D.; Garcia, A. E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2007**, *104*:20805-20810.
48. Zwaveling, S.; Ferreira Mota, S. C.; Nouta, J., *et al.* Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol.* **2002**, *169*:350-358.
49. Waeckerle-Men, Y.; Uetz-von Allmen, E.; Fopp, M., *et al.* Dendritic cell-based multi-epitope immunotherapy of hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* **2006**, *55*:1524-1533.
50. Heath, W. R.; Carbone, F. R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* **2001**, *19*:47-64.
51. Basso, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med.* **2013**, *3*:1-10.
52. Gnjatic, S.; Sawhney, N. B.; Bhardwaj, N. Toll-like receptor agonists: are they good adjuvants? *Cancer J.* **2010**, *16*:382-391.
53. Puggioni, F.; Durham, S. R.; Francis, J. N. Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th₁ responses. *Allergy.* **2005**, *60*:678-684.
54. Koyoc Mis, G. Evaluacion preliminar del efecto inmunoestimulador de los adyuvantes CpG-ODN, Imiquimod y Lípido A (MLA) sobre la actividad funcional de macrófagos derivados de monocitos humanos. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, 2014.
55. Martinez Campos, T. V. Incremento de la proteccion conferida por la adiccion de los adyuvantes monofosforil lipido A y CpG iligodeoxinucleotidos a una

vacuna recombinante contra *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, 2013.

56. Maranon, C.; Egui, A.; Carrilero, B., *et al.* Identification of HLA-A *02:01-restricted CTL epitopes in *Trypanosoma cruzi* heat shock protein-70 recognized by Chagas disease patients. *Microbes Infect.* **2011**, *13*:1025-1032.

57. Egui, A.; Thomas, M.; Morell, M., *et al.* *Trypanosoma cruzi* paraflagellar rod proteins 2 and 3 contain immunodominant CD8⁺ T-cell epitopes that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients. *Mol Immunol.* **2012**, *52*:289-298.

58. Serna, C.; Lara, J. A.; Rodrigues, S. P., *et al.* A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease. *Vaccine.* **2014**, *32*:3525-3532.

59. Mendes, T. A.; Reis Cunha, J. L.; de Almeida Lourdes, R., *et al.* Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. *PLoS Negl Trop Dis.* **2013**, *7*:e2524.

60. Yamada, A.; Sasada, T.; Noguchi, M., *et al.* Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer Sci.* **2013**, *104*:15-21.

61. De Magistris, M. T.; Alexander, J.; Coggeshall, M., *et al.* Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell.* **1992**, *68*:625-634.

62. Plebanski, M.; Lee, E. A.; Hannan, C. M., *et al.* Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming. *Nat Med.* **1999**, *5*:565-571.

63. Haribhai, D.; Edwards, B.; Williams, M. L., *et al.* Functional reprogramming of the primary immune response by T cell receptor antagonism. *J Exp Med.* **2004**, *200*:1371-1382.

64. Dumonteil, E.; Escobedo-Ortegon, J.; Reyes-Rodriguez, N., *et al.* Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infect Immun.* **2004**, *72*:46-53.

65. García-Escalante, M.; Ehrenberg-Enríquez, J.; Puerto, F. Estudio del perfil antigénico de *Trypanosoma cruzi* a través de la reactividad de sueros hiperinmunes obtenidos de conejos. *Rev. Biomed.* **1996**, *7*:133-145.
66. Laboratorio-de-Parasitología, Técnicas en Parasitología. En *Quick Parasit Protocol*, Laboratorio de Parasitología: Mérida, Yucatán.
67. Zapata-Estrella, H.; Hummel-Newell, C.; Sanchez-Burgos, G., *et al.* Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunol Lett.* **2006**, *103*:186-191.
68. Quijano-Hernandez, I. A.; Bolio-Gonzalez, M. E.; Rodriguez-Buenfil, J. C., *et al.* Therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Ann N Y Acad Sci.* **2008**, *1149*:343-346.
69. Cummings, K. L.; Tarleton, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* **2003**, *129*:53-59.
70. Rosado-Vallado, M.; Mut-Martin, M.; Garcia-Miss, M., *et al.* Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against *Leishmania mexicana*. *Vaccine.* **2005**, *23*:5372-5379.
71. Coligan, J. E. Current protocols in immunology. En *Appendix 3B Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*, John Wiley and Sons: New York, 1992.
72. Herrera-Najera, C.; Pina-Aguilar, R.; Xacur-Garcia, F., *et al.* Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. *Proteomics.* **2009**, *9*:1293-1301.
73. BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit. <http://www.bdbiosciences.com> (Consultado Noviembre 2014).
74. Laboratorio-de-Parasitología, Técnicas proteómicas. En *Quick Parasit Protocol*, Mérida, Yucatán.
75. Sanchez-Burgos, G.; Ramos-Castaneda, J.; Cedillo-Rivera, R., *et al.* Immunogenicity of novel Dengue virus epitopes identified by bioinformatic analysis. *Virus Res.* **2010**, *153*:113-120.

76. Caldas, I. S.; Talvani, A.; Caldas, S., *et al.* Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res.* **2008**, *103*:413-421.
77. Bern, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* **2011**, *364*:2527-2534.
78. Cunha-Neto, E.; Chevillard, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*:683230.
79. Lescure, F. X.; Le Loup, G.; Freilij, H., *et al.* Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis.* **2010**, *10*:556-570.
80. Calis, J. J.; Maybeno, M.; Greenbaum, J. A., *et al.* Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol.* **2013**, *9*:e1003266.
81. Lazarski, C. A.; Chaves, F. A.; Jenks, S. A., *et al.* The kinetic stability of MHC class II:peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance. *Immunity.* **2005**, *23*:29-40.
82. Crowe, S. R.; Turner, S. J.; Miller, S. C., *et al.* Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8⁺ T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections. *J Exp Med.* **2003**, *198*:399-410.
83. Sanchez-Burgos, G.; Mezquita-Vega, R. G.; Escobedo-Ortegon, J., *et al.* Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **2007**, *50*:333-341.
84. Martinez-Campos, V.; Martinez-Vega, P.; Ramirez-Sierra, M. J., *et al.* Expression, purification, immunogenicity, and protective efficacy of a recombinant Tc24 antigen as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine.* **2015**, *33*:4505-4512.
85. Quijano-Hernandez, I.; Dumonteil, E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin.* **2011**, *7*:1184-1191.

86. La Gruta, N. L.; Kedzierska, K.; Pang, K., *et al.* A virus-specific CD8⁺ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006**, *103*:994-999.
87. Junqueira, C.; Caetano, B.; Bartholomeu, D. C., *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* **2010**, *12*:e29.
88. Cazorla, S. I.; Matos, M. N.; Cerny, N., *et al.* Oral multicomponent DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella* elicited immunoprotection against American trypanosomiasis. *J Infect Dis.* **2015**, *211*:698-707.
89. Orr, M. T.; Ireton, G. C.; Beebe, E. A., *et al.* Immune subdominant antigens as vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* **2014**, *193*:2911-2918.
90. Garg, N.; Tarleton, R. L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* **2002**, *70*:5547-5555.
91. Speake, C.; Pichugin, A.; Sahu, T., *et al.* Identification of novel pre-erythrocytic malaria antigen candidates for combination vaccines with circumsporozoite protein. *PLoS One.* **2016**, *11*:e0159449.
92. Limbach, K.; Aguiar, J.; Gowda, K., *et al.* Identification of two new protective pre-erythrocytic malaria vaccine antigen candidates. *Malar J.* **2011**, *10*:65.
93. Bae, J.; Smith, R.; Daley, J., *et al.* Myeloma-specific multiple peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: a potential therapeutic application in multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Clin Cancer Res.* **2012**, *18*:4850-4860.
94. Mahajan, B.; Berzofsky, J. A.; Boykins, R. A., *et al.* Multiple antigen peptide vaccines against *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* **2010**, *78*:4613-4624.
95. Pishraft Sabet, L.; Taheri, T.; Memarnejadian, A., *et al.* Immunogenicity of multi-epitope DNA and peptide vaccine candidates based on Core, E2, NS3 and NS5B HCV epitopes in BALB/c mice. *Hepat Mon.* **2014**, *14*:e22215.

96. Limon-Flores, A. Y.; Cervera-Cetina, R.; Tzec-Arjona, J. L., *et al.* Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Vaccine*. **2010**, *28*:7414-7419.
97. Padilla, A. M.; Bustamante, J. M.; Tarleton, R. L. CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol*. **2009**, *21*:385-390.
98. Rodrigues, M. M.; Ribeiro, M.; Boscardin, S. B. CD4 Th₁ but not Th₂ clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett*. **2000**, *73*:43-50.
99. Umekita, L. F.; Mota, I. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz J Med Biol Res*. **2000**, *33*:253-258.
100. Holland, G. P.; Holland, N.; Steward, M. W. Interferon-gamma potentiates antibody affinity in mice with a genetically controlled defect in affinity maturation. *Clin Exp Immunol*. **1990**, *82*:221-226.
101. Acosta-Rodriguez, E. V.; Merino, M. C.; Montes, C. L., *et al.* Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2007**, *18*:73-83.
102. Cazorla, S. I.; Frank, F. M.; Becker, P. D., *et al.* Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis*. **2010**, *202*:136-144.
103. Wang, X.; Zhang, L.; Chi, Y., *et al.* The nature and combination of subunits used in epitope-based *Schistosoma japonicum* vaccine formulations affect their efficacy. *Parasit Vectors*. **2010**, *3*:109.
104. Fralish, B. H.; Tarleton, R. L. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. **2003**, *21*:3070-3080.
105. TriTrypDB: Kinetoplastid Genomics Resource. <http://tritrypdb.org> (Consultado Agosto 2016).
106. GeneDB. <http://www.genedb.org> (Consultado Agosto 2016).

107. TriTrypDB: Kinetoplastid Genomics Resource. <http://tritrypdb.org> (Consultado Marzo 2016).
108. Cazzulo, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem.* **2002**, 2:1261-1271.
109. Eickhoff, C. S.; Van Aartsen, D.; Terry, F. E., *et al.* An immunoinformatic approach for identification of *Trypanosoma cruzi* HLA-A2-restricted CD8⁺ T cell epitopes. *Hum Vaccin Immunother.* **2015**, 11:2322-2328.