

IPK

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Subdirección de Parasitología.

**ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD Y CAPACIDAD PROTECTORA DE
UNA BIBLIOTECA GENOMICA DE EXPRESION DE *Trypanosoma cruzi* EN
RATONES BALB/c.**

**Trabajo de tesis en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas.**

Autor Dr. Esteban Alberti Amador.

**Tutores Dr.C Armando Acosta Domínguez
Dr.C María E Sarmiento García San Miguel**

La Habana

2004

SÍNTESIS

Para contribuir al estudio de la respuesta inmune frente a la infección con *T.cruzi* y al desarrollo de vacunas de nueva generación, se construyó una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* en un vector de expresión en células eucariotas, con la cual se inmunizaron ratones machos de la línea isogénica BALB/c por la vía intramuscular. En este modelo experimental se estudió la expresión de antígenos del parásito por IFI en el sitio de inoculación, la respuesta inmune humoral específica por ELISA y Western Blot (WB), la respuesta de linfoproliferación específica, así como la protección inducida frente al reto con *T. cruzi* y *Leishmania amazonensis*. También se estudió la presencia de distintos marcadores de autoinmunidad, después de la inmunización con la biblioteca de expresión. Se evidenció la expresión de antígenos en el músculo esquelético de los ratones inmunizados con la genoteca, al enfrentarlos con sueros de pacientes afectados con la Enfermedad de Chagas. Se obtuvo una respuesta de anticuerpos significativa, detectada por ELISA en los sueros de los ratones inmunizados con la biblioteca y con antígenos solubles de *T.cruzi* en la sexta semana post-inmunización. En el estudio por Western Blot (WB) se evidenció el reconocimiento de múltiples bandas al enfrentar los sueros contra antígenos solubles de *T. cruzi*. Se observó estimulación de linfocitos en el grupo inmunizado con una dosis de la biblioteca y con los antígenos solubles. Fue puesta en evidencia la capacidad de los ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de controlar la infección aguda producida por los trypomastigotes de *T. cruzi*. La evolución de la lesiones en todos los grupos estudiados después del reto con *L. amazonensis* demostró la no existencia de protección cruzada. La vacunación no provocó la inducción de anticuerpos anti ADN de doble o simple cadena, anticuerpos antinucleares y contra músculo cardiaco. Se observó un aumento transitorio del Factor Reumatoideo IgG en los ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T.cruzi*. Nuestros hallazgos sugieren que la inducción de respuestas autoinmunes frente al ADN utilizado en la inmunización es poco probable.

CAPITULO I.- INTRODUCCIÓN	6
I.1 INTRODUCCIÓN	6
I.2 HIPÓTESIS:	11
I.3 OBJETIVOS.....	11
I.4 NOVEDAD CIENTÍFICA	12
I.5 EL VALOR TEÓRICO	12
I.6 EL VALOR PRÁCTICO	13
CAPITULO II.- INFORMACIÓN PREVIA.....	14
II.1 TRIPANOSOMIASIS AMERICANA.....	14
II.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	14
II.3 EPIDEMIOLOGÍA	15
II.4 CICLO DE VIDA <i>TRIPANOSOMA CRUZI</i>	15
II.5 PATOLOGÍA	16
II.6 PATOGÉNESIS	18
II.7 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	19
II.8 DIAGNÓSTICO	22
II.10 INMUNIDAD EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	26
II.11 VACUNAS CONTRA <i>TRIPANOSOMA CRUZI</i>	29
II.12 VACUNAS DE ADN.	30
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	44
III.1 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA DE EXPRESIÓN	44
III.2 ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD HUMORAL Y CELULAR POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN DE <i>T. CRUZI</i>	50
III.3 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE <i>T. CRUZI</i> EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LOS RATONES BALB/C INMUNIZADOS	54
III.4 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE EXPRESIÓN DE <i>T. CRUZI</i>	54
III.5 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/C CON LA BIBLIOTECA GENOMICA DE <i>T. CRUZI</i> AL RETO CON PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	55
III.6 DETERMINACIÓN DE RESPUESTAS AUTOINMUNES	55
III.7 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO.	58
CAPITULO IV.- RESULTADOS.....	60
IV.1 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA DE EXPRESIÓN	60
IV.2 ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD HUMORAL Y CELULAR DESARROLLADA POR LA ADMINISTRACIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE <i>T. CRUZI</i>	62
IV.3 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE <i>T. CRUZI</i> EN EL MÚSCULO DE LOS ANIMALES INMUNIZADOS	64
IV.4 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE EXPRESIÓN DE <i>T. CRUZI</i>	65
IV.5 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE EXPRESIÓN DE <i>T. CRUZI</i> AL RETO CON PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	66
IV.6 DETERMINACIÓN DE RESPUESTAS AUTOINMUNES	67

CAPITULO V.- DISCUSIÓN:	69
V.2 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA DE EXPRESIÓN DE <i>T. CRUZI</i>	69
V.3 ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD HUMORAL Y CELULAR DESARROLLADA POR LA ADMINISTRACIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE <i>T. CRUZI</i>	70
V.4 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS <i>T. CRUZI</i> EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LOS ANIMALES INMUNIZADOS.	73
V.5 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE EXPRESIÓN DE <i>T. CRUZI</i>	74
V.6 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE EXPRESIÓN DE <i>T. CRUZI</i> FRENTE AL RETO CON PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	75
V.7 DETERMINACIÓN DE RESPUESTAS AUTOINMUNES	76
CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	81
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	82
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS RELACIONADAS CON EL TEMA:	95
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS RELACIONADAS INDIRECTAMENTE CON EL TEMA	97

ABREVIATURAS :

AD : Aglutinación directa.

ADN : Acido Desoxiribonucleico.

ARN : Acido Ribonucleico.

BGE: Biblioteca genómica de expresión

CMH : Complejo mayor de histocompatibilidad .

CMV : Citomegalovirus.

CPA : células presentadoras de antígenos.

E. coli: *Echerichia coli*.

ELISA : Ensayo Inmunoenzimatico sobre fase sólida.

HAI : Hemaglutinación indirecta.

IFI : Inmunofluorescencia indirecta.

IgG : Inmunoglobulina G.

LTC : Linfocitos T citotóxicos.

L.amazonensis: *Leishmania amazonensis*

MIF : Prueba de inhibición de la migración de los macrófagos.

NK : Células asesinas.

OMS : Organización Mundial de la Salud.

pc DNA 3 : Vector de expresión en células eucariota.

SNC : Sistema Nervioso Central.

SSTF: Solución Salina Tamponada.

T. cruzi : *Trypanosoma cruzi*.

TBE : Tampón Tris Borato- EDTA.

TE : Tampón Tris- EDTA.

WB: Western Blot.

CAPITULO I.- INTRODUCCIÓN

I.1 introducción

Tripanosomiasis es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades causadas por protozoos del género *Trypanosoma* y está clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales de mayor importancia (Khaw y Panosian 1995, Chiari *et al* 1996), lo que puede ser explicado por la falta de programas encaminados al control de vectores, educación a la población expuesta, diagnóstico oportuno, tratamiento eficaz y realidades sociales de los afectados que incluyen pobreza e insalubridad (Llanio 1988, Caprón *et al* 1994, Abbas 1995, Días *et al* 2002, Saez *et al* 2003).

La tripanosomiasis americana es una parasitosis que fue descrita por primera vez en 1909, en la parte central de Brasil, por Carlos Chagas, por lo que también es conocida como Enfermedad de Chagas (Kenneth 1982, Kirchhoff 1990, Rey 1991, Pérez- Duque *et al* 1995, Prata 1995,). Se estima que en las regiones endémicas de América Central y América del Sur están infectados entre 18 y 20 millones de personas, de ellos aproximadamente 33% pueden desarrollar la enfermedad crónica (Rojas de Arias 1992, Schrevel 1996, Días *et al* 2002). La incidencia de la infección es de 1 millón de casos por año y la mortalidad es de 45 000 muertes anualmente (Wilson 1991, Moncayo 1993, Rizzo *et al* 2003)

Trypanosoma cruzi tiene un ciclo de vida complejo (Heyneman y Mc Kerrow 1991, Asin y Giojalas 1995) y existen, al menos, tres formas morfológicamente distintas: la infectante, constituida por tripomastigotes sanguíneos o metacíclicos, los epimastigotes (fundamentalmente en el insecto vector transmisor y en medio de cultivo) y los amastigotes, que habitan dentro de la célula (Hernández *et al* 1991, García 1995). Todos los tejidos pueden ser invadidos, pero los más afectados son aquellos ricos en células del sistema retículo-endotelial (Tomlinson *et al* 1995, Bonay y Fresno 1995, Vergara *et al* 1995, Vera-Cruz *et al* 2003).

Las vías de transmisión pueden ser el insecto transmisor infectado (hospedero intermediario activo), la transfusión de sangre contaminada y la transmisión vertical de la madre al feto por vía transplacentaria (Wilson 1991). Resulta menos frecuente la transmisión por accidentes, por vía oral o por la leche materna (Aznar *et al* 1995).

La infección por este parásito atraviesa por tres fases: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda comienza entre la primera y tercera semana después de la infección inicial; la parasitemia es elevada pero los signos clínicos son por lo general inaparentes (Paiva *et al* 2003). En la etapa indeterminada disminuye la parasitemia haciéndose muy difícil su detección y el nivel de anticuerpos específicos se incrementa (Rodríguez 1995). Las secuelas crónicas más trascendentales de esta enfermedad son: el daño del miocárdico y del tubo digestivo, que ocurren durante la fase crónica de la enfermedad las cuales adquieren carácter irreversible y mortal (Caprón *et al* 1994, Frank *et al* 2003, Pérez-Fuentes *et al* 2003).

Las medidas de control de la Tripanosomiasis americana se basan en la interrupción de las principales vías de transmisión (Moncayo 1992): la transmisión del parásito por el insecto vector, el diagnóstico y tratamiento de los casos humanos y animales, la utilización de hemoderivados contaminados mediante el tamizaje en bancos de sangre y la profilaxis mediante la vacunación (Chiari *et al* 1996, Frank *et al* 2003, Pérez-Fuentes *et al* 2003). El control del vector trasmisor de la enfermedad se hace difícil su alto costo, unido al desarrollo de resistencia a los insecticidas y el potencial contaminante de estos. El diagnóstico y tratamiento de la enfermedad tiene dificultades intrínsecas, asociadas a la baja sensibilidad y especificidad de los métodos de diagnóstico en uso y a la alta toxicidad de los medicamentos existentes (Chiari *et al* 1996, Behrend *et al* 2002, Antunez *et al* 2002, Pitcovsky *et al* 2002).

La persistencia de los parásitos en los hospederos humanos dan lugar a reacciones inmunitarias crónicas que pueden lesionar los tejidos, así como ocasionar alteraciones en la regulación inmune (Moncayo 1992, Gomes *et al* 1995). Hay pocas alternativas terapéuticas para el tratamiento y el control, mediante la vacunación, de la Enfermedad de Chagas, muchos antiparasitarios son tóxicos, relativamente ineficaces o ambas cosas (Brener y Krettli 1990, Sepúlveda y Cassels 1996, Cancado 2002, Villar *et al* 2002).

Son muchos los problemas por resolver para obtener un inmunógeno lo suficientemente eficiente, que provoque una respuesta protectora (Teixeira 1979, Basombrio 1990, Gruppi *et al* 1995, Schnapp *et al* 2002).

Entre las estrategias vacunales de nueva generación se encuentra la inmunización con ácidos nucleicos, dicha estrategia ofrece la perspectiva de promisorios resultados en el control de enfermedades parasitarias debido a su capacidad de estimular respuestas de células T auxiliaadoras tipo 1 (TH 1) (Davis *et al* 1993, Ulmer *et al* 1993, Ouyang *et al* 2003, Harumal *et al* 2003).

Los vectores más utilizados en este tipo de inmunización son los plásmidos, los cuales son moléculas pequeñas de ADN, de doble cadena, circulares y extracromosomales, que existen en el interior de las bacterias y se replican de manera autónoma en la célula hospedera. Es posible insertar en ellos mediante manipulación genética, fragmentos de ADN, que codifican antígenos de interés vacunal (Ulmer *et al* 1993, Davis *et al* 1993, Harumal *et al* 2003, Ouyang *et al* 2003, Liu *et al* 2003).

En general, las construcciones genéticas utilizadas para este tipo de inmunización, contienen un promotor funcional en células eucariotas, el gen de interés que codifica un producto de importancia vacunal, orígenes de replicación para *Escherichia coli* y para células superiores, además de un gen de resistencia a antibióticos (Fynan *et al* 1993, Shabaan *et al* 2003).

Esta tecnología se ha empleado experimentalmente para inducir una respuesta inmune contra agentes virales como la Hepatitis B (Davis *et al* 1994), la Influenza (Montgomery *et al* 1993) y la infección por el virus HIV-1 (Coney *et al* 1994); bacterias como el *Mycobacterium tuberculosis* (Lowrie *et al* 1994) y el *Mycoplasma pulmonis* (Barry *et al* 1995); así como en parásitos intracelulares, entre ellos *Leishmania major* (Xu y Liew 1994) y *Plasmodium yoelli*, (Hoffman *et al* 1994) con los cuales se obtuvo inmunidad protectora humoral y celular (Tang *et al* 1992, Danko y Wolf 1994, Waine y McManus 1995). Además, de la administración directa de plásmidos, con la que se han obtenido los mejores resultados, también se han usado vectores retrovirales recombinantes, ADN encapsulado en liposomas y ADN acoplado a proteínas transportadoras específicas, con resultados variables (Abbas 1995, Vogel y Sarver 1995, Cai *et al* 2001, Schabaan *et al* 2003).

Esta tecnología promete candidatos vacunales de fácil manipulación y bajo costo de producción, que combinen las ventajas de las vacunas de subunidades y la eficacia de las vacunas de vectores vivos (Gherardi *et al* 2001, Schrevel *et al* 1996, Rodríguez *et al* 2002). Todo esto permitiría la prevención de enfermedades virales y parasitarias sin correr los riesgos de las vacunas vivas, ya sea la reversión a la virulencia o el posible desencadenamiento de infecciones mortales en huéspedes inmunodeprimidos (WHO CTD 1996, Pérez-Duque *et al* 1995, Rodríguez *et al* 2002, Schabaan *et al* 2003). Entre las desventajas potenciales de este nuevo método se encuentran: la posible integración de los genes vacunales al genoma de la célula hospedera, lo que pudiera ocasionar la aparición de transformación neoplásica, y la inducción de estados de autoinmunidad debido a una expresión prolongada del ADN extraño con pérdida

de los mecanismos normales de reconocimiento por parte del sistema inmunitario. Después de profundos estudios experimentales, no se ha demostrado la ocurrencia de estos eventos (Messina *et al* 1995).

La identificación de los antígenos responsables del desencadenamiento de la respuesta protectora constituye el elemento de mayor importancia para el desarrollo de vacunas. En el caso de *T. cruzi*, los antígenos involucrados en la protección no han sido identificados en forma precisa, lo cual constituye uno de los obstáculos más importantes para el desarrollo de vacunas contra este parásito (Garg *et al* 2002, Schnapp *et al* 2002, Ouaisi *et al* 2002). Recientemente, se ha desarrollado la tecnología de inmunización con bibliotecas de expresión (DNA, cDNA) como una herramienta metodológica encaminada a la identificación de los genes codificantes de los antígenos relacionados con la protección (Barry *et al* 1995, Feng *et al* 2002, Harumal *et al* 2003, Shabaan *et al* 2003).

Barry y colaboradores (Barry *et al* 1995) reportaron la inmunización con una biblioteca genómica de expresión de *Mycoplasma pulmonis* en ratones, con la que se logró la inducción de respuestas inmunes humorales y celulares, y el establecimiento de un estado de resistencia frente al reto con el microorganismo. Este inmunógeno (biblioteca genómica) consiste en la inserción de una mezcla de fragmentos diferentes del genoma del microorganismo dentro del plásmido seleccionado, obteniendo una construcción genética en la cual están teóricamente representados todos los genes del mismo, con la posibilidad de ser expresados en células superiores (Hoffman *et al* 1994, Barry *et al* 1995).

Después de la inmunización con fracciones de dichas bibliotecas se identificaron las que estaban asociadas con la inducción de estados de protección, lográndose después de ciclos sucesivos de inmunización la identificación de los genes codificantes de antígenos protectores (Hoffman *et al* 1994, Barry *et al* 1995).

En el caso particular de *T. cruzi* se ha inmunizado con genes que codifican para una o varias proteínas individuales, las cuales han sido consideradas como candidatas por su capacidad de estimular una respuesta protectora (Sepúlveda *et al* 2000, Fujimura *et al* 2001, Planelles *et al* 2001, Schnapp *et al* 2002, Garg *et al* 2002, Rodrigues *et al* 2002, Katae *et al* 2002).

Sin restarle importancia a las otras estrategias de control, la obtención de una vacuna eficaz contra *T. cruzi*, es una herramienta de gran impacto potencial para el control de la enfermedad en las condiciones actuales (Días *et al* 2002).

Teniendo en cuenta los elementos anteriores, con el presente trabajo nos propusimos aplicar la tecnología de inmunización con ácidos nucleicos al desarrollo de vacunas experimentales de nueva generación contra la Enfermedad de Chagas.

Para profundizar en el estudio de los mecanismos inmunológicos estimulados por las inmunizaciones con ácidos nucleicos se construyó una biblioteca genómica de *T. cruzi* en un vector de expresión en células eucariotas y se evaluó la expresión de antígenos del parásito en el músculo de los ratones BALB/c inmunizados así como se estudió la respuesta humoral y celular específica inducida por la inmunización con la biblioteca genómica y se determinó la presencia de algunos marcadores de autoinmunidad. Al mismo tiempo se evaluó la protección específica conferida en los animales inmunizados con ADN de *T. cruzi* así como la protección cruzada contra *L. amazonensis*.

Tres interrogantes constituyeron el problema científico de esta investigación.

- 1- ¿La inmunización de ratones con una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* será capaz de inducir la expresión de antígenos del parásito y una respuesta humoral y celular específica que pudiera ser detectables por técnicas como la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Inmunoensayo Enzimático (ELISA), Western blot y la linfoproliferación específica?
- 2- ¿Inducirá la administración de ácidos nucleicos de *T. cruzi* la producción de respuestas autoinmunes como las observadas en el curso de la infección natural?
- 3- ¿La inmunización con una biblioteca de expresión de *T. cruzi* inducirá respuesta protectora específica frente a la infección experimental?

Sobre la base de los elementos anteriormente expuestos se definió como hipótesis de este trabajo la siguiente:

I.2 hipótesis:

La inmunización con una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* es capaz de inducir una respuesta inmune protectora en el modelo murino ante el reto con este parásito sin provocar una respuesta inmunopatológica.

Para el desarrollo de este trabajo se definieron los siguientes objetivos.

I.3 objetivos

objetivo general:

Contribuir al desarrollo de vacunas de nueva generación útiles para el control de la Enfermedad de Chagas

objetivos específicos:

1. Construir una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* y demostrar la expresión de antígenos del parásito en ratones BALB/c inmunizados con esta genoteca.
2. Evaluar la inmunogenicidad humoral y celular específica en ratones BALB/c inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*
3. Determinar la protección homóloga y cruzada frente al reto con *T. cruzi* y *L. amazonensis* en ratones BALB/c inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*.
4. Evaluar la presencia de marcadores de autoinmunidad ratones BALB/c inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*.

Para el cumplimiento de los objetivos, se acometieron las siguientes tareas.

- Construir una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*, empleando como vector el plásmido pcDNA3.
- Determinar la expresión de antígenos de *T. cruzi* en el músculo de los ratones inmunizados por vía intramuscular con la biblioteca genómica de expresión.
- Evaluar la respuesta de anticuerpos específicos del isotipo IgG contra los antígenos de *T. cruzi* en los animales inmunizados, mediante las técnicas de ELISA y Western blot.
- Evaluar la respuesta linfoproliferativa de células T específicas contra los antígenos de *T. cruzi* en los animales inmunizados.
- Evaluar la protección inducida en animales inmunizados con la biblioteca genómica retándolos con una dosis letal de una cepa virulenta de *T. cruzi*.

- Evaluar la capacidad protectora cruzada de la administración de una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* frente al reto con promastigotes de *Leishmania amazonensis*.
- Determinar anticuerpos anti ADN de doble y simple cadena por ELISA en el suero de ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*.
- Determinar la presencia de anticuerpos antinucleares y antimúsculo cardíaco mediante inmunofluorescencia indirecta en el suero de ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*.
- Determinar la presencia de Factor Reumatoideo de tipo IgG en el suero de ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*.

I.4 novedad científica

- ❖ Se presenta el primer reporte a nivel internacional de inmunización con ácidos nucleicos de *T. cruzi*.
- ❖ Se realiza el primer reporte de inmunización con una biblioteca genómica de un protozoo.
- ❖ Se reporta por primera vez la expresión de antígenos parasitarios “in vivo” después de la inmunización con ADN genómico de un protozoo, lo que plantea la posibilidad del procesamiento del ARN por la célula muscular. Ello tiene relevancia científica, además de que pudiera tener aplicación en la producción de vacunas de ADN contra otros parásitos
- ❖ Se estudió la respuesta inmune específica inducida tras la administración de una biblioteca de expresión de *T. cruzi*.
- ❖ Se demostró la posibilidad de inducir protección frente a la infección aguda experimental con *T. cruzi* tras la inmunización con una biblioteca genómica del microorganismo.
- ❖ Se reporta por primera vez la producción transitoria del factor reumatoideo después de la inmunización con ácidos nucleicos.

I.5 El valor teórico

El valor teórico del presente trabajo radica en los aportes que brinda al conocimiento de los nuevos métodos de control basados en el desarrollo de vacunas experimentales para la Tripanosomiasis, lo cual trasciende a nivel internacional. Los resultados presentados en esta tesis han recibido, entre otros, premios de la Academia de Ciencias de Cuba, se han publicado en revistas nacionales e internacionales y se encuentran incluidos en diferentes Trabajos de Terminación de Residencia o Tesis de Maestría en Parasitología.

I.6 El valor práctico

Su valor práctico radica en que se desarrollaron herramientas metodológicas y conocimientos útiles para los trabajos futuros encaminados a la obtención de vacunas de ADN contra este parásito.

CAPITULO II.- INFORMACIÓN PREVIA

II.1 tripanosomiasis americana

Las tripanosomiasis humanas son producidas por protozoos flagelados que viven en la sangre y tejidos del hospedero humano y transmitidas por artrópodos hematófagos (Kirchoff 1990). La tripanosomiasis americana fue reportada por primera vez en 1909 por Carlos Chagas. Este investigador descubre la enfermedad en el estado brasileño de Minas Gerais y describe magistralmente los hechos etiológicos, clínicos, epidemiológicos y parasitológicos que le conciernen. Es con toda justicia que la tripanosomiasis americana tiene como epónimo Enfermedad de Chagas (Rey 1991, González 1996)

II.2 agente etiológico

Es producida por *Trypanosoma cruzi*, protozoo flagelado perteneciente al Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae; género Trypanosoma, subgénero Schizotrypanum, especie *Trypanosoma cruzi* (Plorde 1990, Cuyás y García 1995). Se adoptó el subgénero Schizotrypanum para designar a los parásitos que se multiplican intracelularmente en los vertebrados, por esto el nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Kenneth 1982, Beaver *et al* 1986, Cuyás y García 1995). Existen tres formas morfológicamente distintas: la infectante, constituida por tripomastigotes sanguíneos o metacíclicos, los epimastigotes; fundamentalmente en el insecto y en el medio de cultivo y amastigotes intracelulares (Cuyás y García 1995). Este último es redondeado u oval, mide aproximadamente de 1.5 a 4 micras, con el kinetoplasto en forma de bastoncito o bien esférico y se multiplica por división binaria. Forma nidos en el interior de las células similares morfológicamente a los de las formas amastigotas del género *Leishmania sp.*, por lo que se les llama nidos leishmanoides. El epimastigote posee un tamaño un poco menor que el tripomastigote, aspecto fusiforme y flagelos anteriores al núcleo. El tripomastigote es alargado, fusiforme y su tamaño es alrededor de 20 micras de longitud; con un núcleo grande cerca de la parte central. A lo largo de su cuerpo tiene una membrana ondulante bordeada por un flagelo que se inicia en el kinetoplasto y sale del parásito por su extremo anterior (Moncayo 1993). El kinetoplasto contiene el 20 % del ADN total del parásito presente en su mitocondria, localizada en la región subterminal de la parte posterior del protozoo. El tamaño notoriamente grande de este permite diferenciarlo del resto de las especies de tripanosomas (Moncayo 1993).

II.3 epidemiología

Esta enfermedad es una infección zoonótica y afecta tanto a animales domésticos y salvajes como al hombre (Asin y Giojalas 1995). La presencia de insectos vectores y de animales domésticos y salvajes que sirven de reservorios es un poco más amplia para esta enfermedad (Vergara *et al* 1995).

La Enfermedad de Chagas es transmitida por insectos hematófagos nocturnos de gran tamaño, que pertenecen al Orden *Hemiptera* y corresponden a tres géneros de la familia *Reduviidae* conocidos generalmente como reduvidos o triatomíneos. Los géneros transmisores de la enfermedad son: *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*. Las especies vectores varían en los diferentes países, donde son conocidos popularmente con diversos nombres según la región como: chinches besadores, vinchucas, pitos, barbeiros, chipos, entre otros. Estos insectos suelen habitar en las grietas de las casas rurales construidas de barro y vegetación, saliendo de noche a realizar su alimentación hematófaga de la que el hombre es víctima (Petri y Eisen 1989, Wilson 1991). Las vías de transmisión hacia el hombre pueden ser: el insecto transmisor infectado (hospedero intermediario activo), la transfusión de sangre contaminada, o a través de la placenta (Petri y Eisen 1989, Wilson 1991). Otros mecanismos de transmisión menos frecuentes son los trasplantes de órganos procedentes de donantes parasitados, los accidentes de laboratorio, por lactancia materna o por vía oral (ingestión de carne semicruda o sangre de animales parasitados y de bebidas contaminadas con materia fecal de triatóminos (Velasco *et al* 1994, Benenson 1997). Estudios realizados han evidenciado la presencia de canibalismo y transmisión directa de *T. cruzi* entre los Triatomíneos lo que juega también un papel importante en la transmisión de la infección chagásica (Gentillini 1982, García *et al* 1995). Las chinches pueden contraer la infección, además, absorbiendo las deyecciones infectadas de otras chinches (Petri y Eisen 1989). El reservorio lo constituyen los humanos y más de 150 especies de animales domésticos y salvajes que incluyen perros, gatos, roedores, marsupiales, quirópteros, carnívoros y primates, entre otros (Gentillini 1982).

II.4 ciclo de vida *Tripanosoma cruzi*

Los vectores se infectan al chupar la sangre del hombre o mamíferos (reservorios) con tripomastigotes sanguíneos circulantes. Pueden hacerlo en el estadio de larva, ninfa o imago. La digestión de sangre por los triatomíneos es un proceso relativamente lento, por el cual se tornan infectantes en un período de 10 a 30 días posterior a la picadura del huésped infectado. Permanecen así durante toda su vida que es de un año aproximadamente, aunque pueden llegar a dos años. Los parásitos pueden sobrevivir durante varios días después de la muerte de la chinche (Wilson 1991). En el intestino de los insectos se transforman en

epimastigotes, en el recto del insecto sufren otra transformación a tripomastigotes metacíclicos forma infectante para el huésped vertebrado y finalmente son eliminados con el líquido de las heces de la chinche (Heyneman y McKerrow 1991). La defecación de la chinche se produce en el momento de la picadura, mientras se alimenta, o muy poco después. Esto ocurre habitualmente de noche y ocasiona prurito (Tomlinson *et al* 1995).

El hombre, picado en el transcurso del sueño, se auto infecta al transportar inconscientemente con los dedos las deyecciones parasitadas del insecto hasta la mucosa bucal, nasal y ocular a través de las cuales penetran los parásitos, sin necesidad de tener excoriaciones, o hasta heridas de la piel o el propio sitio de la picadura que también puede ser contaminado (Krogstad 1994, Bonay y Fresno 199). Una vez en el huésped vertebrado entra a las células susceptibles en las cuales se liberan del flagelo y de la membrana ondulante, forman amastigotes replicándose intracelularmente como tales de una manera muy activa y constituyen racimos (nidos leishmanoides) que llevan a la rotura celular. Los amastigotes son liberados a la circulación, se alargan, forman flagelos y se convierten en tripomastigotes. Estos entran a otras células para repetir el ciclo o son ingeridos por el insecto vector (Anselme y Moleiro 1974).

Esta etapa descrita coincide con la fase aguda de la enfermedad y es la que asegura la transmisión de la enfermedad por la elevada parasitemia, pues el vector toma el parásito de la sangre durante sus comidas. La aparición de los parásitos en la sangre ocurre aproximadamente después de 7 a 14 días de la infección (período prepatente). Todos los tejidos pueden ser invadidos pero los más afectados son aquellos ricos en células del sistema retículoendotelial, teniendo predilección por los macrófagos en primer lugar y le siguen en orden de frecuencia el tejido muscular cardíaco, muscular estriado, músculo liso y menos frecuentemente, por tejido nervioso (Luquetti 1994).

II.5 patología

Fase Aguda

Se caracteriza por una intensa multiplicación parasitaria. Es común encontrar reacción inflamatoria de tejidos blandos en el sitio de entrada del parásito, formada por edema intersticial importante, parasitismo intracelular de macrófagos tisulares e infiltración linfocitaria con crecimiento de nódulos linfáticos regionales. Puede localizarse en la piel (Chagoma) o comprometer el párpado (signo de Mazza Romana) (García *et al* 1995, Benenson 1997).

Posteriormente, se produce diseminación linfática y hematógena de parásitos a otros ganglios linfáticos y órganos. Los histiocitos fijos, fibras musculares, células adiposas, células gliales y en general las células

del sistema retículoendotelial, sufren destrucción debido al crecimiento y multiplicación de los parásitos (Benenson 1997).

Cuando se afecta el corazón, la miocarditis aguda se caracteriza histológicamente por una infiltración celular intensa de células mononucleares, un proceso degenerativo variable de las fibras miocárdicas que pierden su estriación y el desarrollo de nidos de amastigotes. Encontramos además flacidez y dilatación cardiaca. La destrucción de células ganglionares y neuronales no sólo se produce en corazón, sino también en tubo digestivo, que originará dilatación e hipertrofia de ellos (Santos -Buch y Acosta 1985, Tomoyoshi y George 1995, Mello de Oliveira 1998).

En el Sistema Nervioso Central hay infiltración linfocitaria de leptomeninges con congestión, hemorragias perivasculares, proliferación glial y neurofagia. El foco inflamatorio se presenta en cerebro, cerebelo, núcleos basales, protuberancia anular y médula espinal. El índice de mortalidad en la fase aguda es bajo, cerca del 10 % (Lagrange *et al* 1992).

Fase Latente o Indeterminada

Después de la fase aguda ocurre una respuesta inmune que provoca disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Este período que va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica es llamado latente o indeterminado. En esta fase el paciente es asintomático, a pesar de que el parásito permanece en el organismo dando comienzo a lesiones que determinarán la progresión de la enfermedad (Lagrange *et al* 1992).

Fase Crónica

La fase crónica se caracteriza por una parasitemia mínima predominando el parasitismo tisular y lesiones típicas en corazón y tubo digestivo. Durante ella la patología más importante es la cardiopatía chagásica (Petri y Eisen 1989). Ocurre destrucción de las fibras miocárdicas acompañado de infiltración linfocitaria originado por la intensa multiplicación parasitaria en ellas (Lagrange *et al* 1992). Se desarrollan auto anticuerpos contra endocardio, vasos sanguíneos e intersticio de músculo estriado (EVI) (Santos-Busch 1998). Se observan los amastigotes intracelulares formando nidos. Se desarrolla hipertrofia, dilatación de cavidades, trombosis mural, adelgazamiento apical y el patognomónico aneurisma ventricular. más frecuente en el ápice del ventrículo izquierdo (Levinson y Jawetz 1998).

En la fase crónica de la cardiopatía chagásica, puede ocurrir la muerte súbita sin desarrollar insuficiencia cardiaca congestiva o constituirse la forma crónica progresiva donde sí aparece esta entidad. El primer

caso es frecuente; en ellos el corazón es pequeño, normal o ligeramente crecido. Hay diversos grados de miocarditis local o difusa y fibrosis intersticial que al extenderse, ocasiona aneurisma apical. En el segundo caso encontramos miocarditis con cardiomegalia acentuada, rara vez se encuentra lesión apical, aunque puede existir trombosis de diversos grados de organización. Es extraño encontrar fibras parasitadas que no estén rodeadas por inflamación (Lagrange *et al* 1992, Levinson y Jawetz 1998).

La inflamación se extiende hasta el pericardio (Pericarditis) y el endocardio (Endocarditis) y compromete el sistema de conducción afectándose fundamentalmente la rama derecha e izquierda anterior del Haz de His. Se desarrollan lesiones hipertróficas del tubo digestivo o megavísceras, especialmente megaesófago y megacolon. Ocurre una denervación o destrucción neuronal que trastorna el funcionamiento peristáltico de la musculatura, ocasionando hipertrofia muscular y aumento considerable de los órganos (Escobar 1990). En el transcurso del embarazo, provocado por la parasitemia materna, puede ocurrir infección trans placentaria y el feto desarrolla lesiones semejantes a las descritas. La enfermedad fetal representa la forma congénita de esta parasitosis (Escobar 1990).

II.6 patogénesis

Los infiltrados inflamatorios no siempre están relacionados con los nidos de amastigotes rotos, por lo que se postula que no es el parásito el responsable de la inflamación, sino sus productos. Cuando la respuesta inflamatoria es severa, la enfermedad puede ser letal, en caso contrario el paciente se recupera, hay una respuesta inmune específica y la parasitemia disminuye hasta niveles prácticamente no detectables en el período agudo. Pasada esta fase, los pacientes, en su mayoría, pasan a una etapa indeterminada de la que poco se conoce aún (Koberle 1974).

Ya desde este período agudo los infiltrados inflamatorios son predominantemente mononucleares, por lo que no puede descartarse la participación de mecanismos inmunológicos en la producción de daño (Ferrari *et al* 1995). Posteriormente, comienzan las manifestaciones de la enfermedad crónica. Los mega síndromes se pueden explicar por un proceso de denervación del sistema nervioso autónomo que lleva a una incoordinación motora y alteraciones de las fibras musculares. Se producen alteraciones en la contracción peristáltica que conllevan a trastornos funcionales de los órganos del tubo digestivo (Aznar *et al* 1995).

Los cambios patológicos en el corazón se han explicado por varias teorías, las cuales describiremos a continuación: Una teoría mecánica, basada en la invasión de las fibras cardíacas por los parásitos que provocan su destrucción; una teoría tóxica, dada por la acción de productos metabólicos tóxicos del

parásito o sustancias liberadas cuando ocurre la desintegración de éste; una alérgica, que sugiere la liberación de toxinas producidas por *T. cruzi* como causante del proceso inflamatorio y otra vascular que atribuye a un fenómeno isquémico la reducción del aporte sanguíneo al tejido miocárdico originado por lesiones vasculares, algunos investigadores sugieren la participación del factor isquémico en la patogénesis de la lesión apical (Velásquez 1990).

Además se plantea una teoría neurogénica, basada en las alteraciones que se producen en el sistema nervioso autónomo del corazón; una anóxica relacionada con los trastornos en la difusión de oxígeno en el espacio intersticial y además, otra inmunopatogénica (Siqueira y Menezes 1995). Esta última se asocia a la producción de auto anticuerpos reactivos contra muchos tejidos propios (Siqueira y Menezes 1995). Se plantea una patogénesis autoinmune no sólo para la miocarditis sino también para la neuropatía (Goldsmith 1991, Prata 1995). Se producen autoanticuerpos secundariamente a la estimulación policlonal de linfocitos por los parásitos (Goldsmith 1991)

Las características más sobresalientes del período crónico, escaso número de parásitos y calidad de los infiltrados celulares, continúan siendo las mejores evidencias para sustentar el mecanismo auto inmune como inductor de la Enfermedad de Chagas crónica. El fenómeno autoinmune también podría ser la consecuencia del daño originado inicialmente por la acción directa del parásito sobre las células del huésped (en este caso sería un epifenómeno que actuaría amplificando la injuria y perpetuando su mecanismo inductor) o de un desequilibrio en la red inmunoregulatoria (Prata 1995, Goldsmith 1991). Texeira y colaboradores plantean otra teoría acerca de la génesis de la respuesta autoinmune asociada a la Enfermedad de Chagas, basada en el hallazgo de la inserción de material genético de *T. cruzi* en el genoma de su hospedero. Esta inserción pudiera producir alteraciones en la regulación de la expresión genética del hospedero con la producción de alteraciones en la expresión antigénica y en el funcionamiento de las células del sistema inmune (Texeira *et al* 1994, Teixeira *et al* 2002)

II.7 manifestaciones clínicas

Se describen dos formas clínicas de la Enfermedad de Chagas, la aguda y la crónica, con una etapa indeterminada mediando a ambas; y la forma congénita de la infección (Goldsmith 1991, Siquiera y Menezes 1995). El período de incubación de la enfermedad es de 5 a 14 días después de la picadura, en caso de transfusión sanguínea será entre 30 y 40 días (Goldsmith 1991).

Período Agudo

Esta fase de la enfermedad pasa inadvertida la mayoría de las veces. Se detecta poco a cualquier edad, pero es en los niños menores de 10 años donde principalmente se realiza el diagnóstico y puede durar hasta tres meses (Aznar *et al* 1995). Durante ella existen gran cantidad de parásitos en los tejidos y en la sangre (Goldsmith 1991). Puede ser asintomático, presentar síntomas leves o poco característicos manifestando síntomas correspondientes a la sintomatología general provocada por cualquier entidad febril de otra causa, desarrollar un cuadro grave que conduzca a la muerte del paciente o presentar signos y síntomas dependientes del sitio de entrada de la infección. Es por ello que algunos autores clasifican la etapa aguda con puerta de entrada aparente y sin ella (Kelly *et al* 1995, Prata 1995).

Por el contrario, si la enfermedad se manifiesta con signos de puerta de entrada, su localización más frecuente es a nivel ocular y se conoce como signo de Mazza- Romaña o complejo oftalmo-ganglionar, manifestándose como edema bipalpebral unilateral o bilateral de tono púrpura, indoloro y duradero, acompañado de edema facial, conjuntivitis, queratitis y dacriocistitis. Este complejo se acompaña de linfadenopatía satélite preauricular o regionales uni o bilaterales (Goldsmith 1991, Kelly *et al* 1995, Prata 1995,). Los ganglios más comprometidos generalmente son los preauriculares, parotidianos, esternocleidomastoideos y submaxilares (Hoffand y Boyer 1985, Solana *et al* 1995)

Otra localización frecuente del signo de puerta de entrada es a nivel cutáneo si el patógeno entra a través de la piel y se constituye una lesión denominada Chagoma de inoculación que es producida en el mismo sitio de entrada del parásito (Prata 1995). Las adenopatías persisten durante largo tiempo, pero el signo de Mazza-Romaña y el Chagoma pueden desaparecer aproximadamente en dos meses (Prata 1995, Kelly *et al* 1995)

En la fase aguda ocurre en algunas ocasiones miocarditis aguda acompañada de anomalías radiológicas y electrocardiográficas (taquicardia sinusal, prolongación del intervalo P-R y Q-T, cambios de la onda T, bajo voltaje del complejo QRS, entre otros) y cuadros neurológicos como meningoencefalitis (Santos –Buch y Acosta 1985, Mello de Oliveira 1998).

Las complicaciones que se producen y que pueden llevar a la muerte son miocarditis y meningoencefalitis y se ven generalmente en niños (González *et al* 1995). Gran parte de las muertes se deben también a insuficiencia cardíaca. La fase aguda se resuelve en dos meses aproximadamente, para volverse asintomáticos y entrar en la etapa indeterminada, en su mayoría, o pasar a la fase crónica. Una parte se mantienen asintomáticos indefinidamente y otros entran en una forma subaguda, admitida por algunos

autores, que se caracteriza por: taquicardia, linfadenopatías generalizadas y hepatoesplenomegalia (González *et al* 1995)

Período latente o Indeterminado

Se inicia de 8 a 10 semanas después de la fase aguda. Puede durar meses, incluso años antes de manifestarse la enfermedad crónica, con un promedio de 10 y 20 años; aunque alrededor del 25 % permanece indefinidamente en esta etapa. Se caracteriza por seropositividad en pacientes asintomáticos con estudios electrocardiográficos y radiológicos aparentemente normales (Prata 1995, Kelly *et al* 1995, Hoffand y Boyer 1985, Solana *et al* 1995).

Período crónico forma cardíaca

Las manifestaciones cardíacas dependerán de las lesiones del corazón (localización y extensión de los infiltrados inflamatorios). Generalmente aparecen tardíamente muchos años después de la infección primaria y es común en la tercera y cuarta décadas de la vida (Hoffand y Boyer 1985, González 1995, Solana *et al* 1995).

Las manifestaciones cardíacas se limitan generalmente a cambios electrocardiográficos, con el inicio de los síntomas, la enfermedad se vuelve progresiva. Pueden ocurrir dos formas clínicas: la muerte súbita sin haber desarrollado insuficiencia cardíaca congestiva o la enfermedad progresa hasta el desarrollo de esta. En el primer caso son frecuentes las palpitaciones, mareos, diarreas, dolor precordial entre otras. La cardiomegalia es a predominio ventricular izquierdo que incluye a veces aneurisma apical y alteraciones electrocardiográficas diversas, desde contracciones prematuras hasta taquicardias ventriculares de carrera corta, bloqueo aurícula-ventricular y un síndrome similar al de Stokes Adams. Si se llega a la insuficiencia cardíaca congestiva, se observan las manifestaciones clínicas propias de este síndrome, dependiendo de la localización de las lesiones, si son a predominio derecho o izquierdo (González 1995, Solana *et al* 1995)

Forma digestiva

El megaesófago se caracteriza por una dilatación progresiva del esófago con manifestaciones que van desde trastornos de la motilidad hasta dificultad para el vaciamiento verdadero. Dentro de ellas podemos mencionar la disfagia, odinofagia, dolor retroesternal, regurgitación, tos, síntomas similares a los de la acalasia de esófago, sialorrea e hipertrofia de las glándulas salivales.

Forma del Sistema Nervioso Central (SNC)

Aún existe la discusión acerca de si el Sistema Nervioso Central se altera o no en la enfermedad de Chagas crónica. La sintomatología está dada por: paresias, convulsiones, cambios psiquiátricos, síntomas cerebelosos y pérdida de los reflejos tendinosos profundos en especial el aquileano. Pueden haber complicaciones graves como meningoencefalitis, que puede ser mortal (Santos-Buch y Acosta 1998).

Forma Congénita

Puede provocar el aborto, parto prematuro o una infección congénita caracterizada por hepatoesplenomegalia, anemia, daño neurológico progresivo, hemorragias cutáneas y alteraciones electrocardiográficas.

II.8 diagnóstico

Diagnóstico de laboratorio

La sospecha clínica de la enfermedad se debe confirmar por el laboratorio. Invariablemente hay anemia e hipermacroglubulinemia. Cuando existe compromiso neurológico, el líquido cefalorraquídeo (LCR) presenta pleocitosis mononuclear y aumento de la concentración de proteínas, lo que constituye un mejor índice de gravedad que el número de células. La presencia de IgM en LCR es casi patognomónico de Tripanosomiasis cerebral. Se pueden encontrar alteraciones radiológicas y electrocardiográficas en dependencia de los daños que se hallan producido en los sistemas (Prata 1995)

El diagnóstico parasitológico se puede establecer en todos los casos agudos (incluyendo las infecciones congénitas) hasta seis semanas después de la infección ya que la parasitemia es relativamente elevada (Fomsgaard 1995).

Para la detección de la enfermedad en el período agudo existen métodos parasitológicos directos, dentro de ellos encontramos: los métodos simples, los de concentración y los de concentración biológica. Entre los primeros se encuentran la gota fresca y los extendidos coloreados que pueden realizarse en el 100% de los casos. Entre los métodos de concentración se encuentran la gota gruesa, la biopsia, microhematocrito, el método de concentración de Strout y el de Bennet (Prata 1995). Entre los de concentración biológica: el Xenodiagnóstico, Hemocultivo y la inoculación en animales.

El diagnóstico indirecto se lleva a cabo mediante serología (conversión serológica o detección de anticuerpos en la fracción IgM en etapas iniciales). Las más usadas son: Inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, reacción de fijación del complemento (Reacción de Machado-Guerreiro), Factor EVI y ELISA (González 1996).

Diagnóstico de la fase crónica

Directo

Para realizar el diagnóstico directo en esta fase se utilizan los métodos de concentración biológica, pero no rutinariamente. Pueden ser empleados en el seguimiento de pacientes individuales, cuando se requiera confirmar parasitológicamente la infección. Se usan el Xenodiagnóstico, hemocultivo o inoculación en animales (González 1996)

Indirecto

El diagnóstico indirecto en esta fase se efectúa mediante serología (detección de anticuerpos en la fracción IgG). Lo común es encontrar un paciente positivo en una prueba y negativo en otra, es por ello que deben utilizarse dos técnicas adecuadamente evaluadas (por ejemplo; Ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA), Hemaglutinación indirecta (HAI), Aglutinación directa (AD), Prueba del Látex, Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Fijación del complemento (FC) y cuando los resultados son discordantes incluirse una tercera prueba (Roitt 1998). La IFI está indicada para estudios de recién nacidos con posible infección congénita, por la posibilidad de detectar tanto anticuerpos IgM como IgG, y para diferenciar transmisión pasiva de anticuerpos de infección intrauterina (González 1996). Recientemente la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha demostrado que puede detectar hasta un parásito por 10 mL de sangre (Prata 1995).

Los métodos inmunoenzimáticos han sido utilizados con mucha frecuencia en el diagnóstico de esta enfermedad y entre las moléculas más estudiadas se encuentran: las glicoproteínas GP 72 y GP 90, asociadas a la protección parcial del huésped contra la infección, GP 57/51 y GP 25, útiles como marcadores serológicos de la enfermedad y un grupo de proteínas importantes en la invasión de células hospederas (Souto *et al* 1990, Borst 1991, Kahn *et al* 1991, Ruef *et al* 1994, Hoft *et al* 1995, Lewicka *et al* 1995).

En este mismo sentido, se ha venido trabajando en el mejoramiento de la sensibilidad y especificidad de los sistemas (ELISA) para el diagnóstico de esta parasitosis incluyendo proteínas semipurificadas o fracciones específicas de estadios evolutivos del parásito, proteínas recombinantes y proteínas purificadas por métodos cromatográficos, entre otras (Altcheh *et al* 2003). Recientes trabajos han encontrado una elevada sensibilidad y especificidad (98 y 98.11% respectivamente) con el método de ELISA, incorporando una proteína purificada por cromatografía de afinidad (del inglés lectin-like glycoprotein, la LL GP-67kDa) (Marcipar *et al* 2003). Las proteínas purificadas por cromatografía de intercambio iónico o DEAE Sephacel, fueron eluidas con BSA lo que mejoró las estructuras internas de la proteína, al evitar

que a su paso por la columna indujeran cambios en la superficie del parásito. Estas proteínas demostraron su relevancia como antígenos para el diagnóstico (Holscher *et al* 2003). Turner y colaboradores utilizaron anticuerpos monoclonales que reconocen una proteína de 45 kDa de *T. cruzi*, y fueron utilizados para los estudios de adhesión de los tripomastigotes invasivos a los mioblastos (Turner *et al* 2002).

Los métodos inmunoenzimáticos se han utilizado en diversos estudios de seroprevalencia (Rizzo *et al* 2003, Saez-Alquezar *et al* 2003, Ferrer *et al* 2003, Perez-Fuentes *et al* 2003, Ferrer *et al* 2000) encontrándose altos índices de sensibilidad y especificidad, en el seguimiento serológico de pacientes, donde se hace necesario confirmar la cura de la enfermedad post tratamiento, sobre todo en pacientes con infección prolongada (Altcheh *et al* 2003). Otras moléculas antigénicas han sido evaluadas en la determinación de doble infección por *T. cruzi* y otras especies de *Leishmanias sp.*, mostrando altos porcentajes de positividad (Frank *et al* 2003). Similares resultados fueron alcanzados por otros autores utilizando un ELISA de tres proteínas recombinantes del parásito (B13, IF 8 y H49) donde encontraron una sensibilidad del 99,7% y una especificidad 98.6 % (Umezawa *et al* 2003). Sánchez-Guillen realizó estudios en bancos de sangre usando un antígeno autóctono recombinante (TBAR) aislado de *Triatoma barberi* de la misma localidad y halló una seroprevalencia elevada entre los donantes (Sanchez-Guillen *et al* 2002). En recientes trabajos, Meira y colaboradores (Meira *et al* 2002) para aumentar la sensibilidad y especificidad de sus sistemas, recomendaron el uso de antígenos recombinantes para el serodiagnóstico: la glicoproteína de superficie presente en el tripomastigote (CPR). Además, se han descrito nuevas moléculas del tripomastigote de *T. cruzi* las cuales permiten la discriminación entre linajes (Di Noia *et al* 2002). Otros sistemas se han desarrollado utilizando proteínas de tripomastigotes de *T. cruzi*, y contienen epítopes que son reconocidos por anticuerpos representativos de una infección activa (Altcheh *et al* 2003).

II.9 tratamiento

Tratamiento Preventivo

Una de las prioridades principales del control de la enfermedad es interrumpir la transmisión dentro del hogar combatiendo el vector intradomiciliario (Beaver *et al* 1986, Kenneth 1982, Cuyás y García 1995). Compuestos pertenecientes a casi todas las clases de insecticidas se han ensayado contra los triatomíneos. En algunos países se obtuvieron buenos resultados con una formulación en polvo mojado (PM) de BHC (llamado también HCH, lindano o Gammexane). La llegada de los piretroides sintéticos (Permetrina, Deltametrina, Lambdacihalotrina) significó un progreso importante para el control de la Enfermedad de Chagas (Beaver *et al* 1986).

La prevención de esta parasitosis no solamente debe estar dirigida a interrumpir la transmisión vectorial sino también la que se produce por transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transplacentaria o por accidentes de laboratorio (Beaver *et al* 1986). La prevención mediante la quimioprofilaxis no ha sido posible realizarla debido a que hasta el momento no existe un medicamento eficaz para la Enfermedad de Chagas (Beaver *et al* 1986, Kenneth 1982, Cuyás y García 1995).

Tratamiento antiparasitario

Actualmente se cuenta con dos medicamentos para el tratamiento de esta parasitosis. Los medicamentos tripanomicidas están indicados en la infección aguda del niño y del adulto, en la infección congénita confirmada y la crónica reciente. Los pacientes con enfermedad crónica no se benefician con este tratamiento. A pesar de todos los progresos efectuados, el tratamiento con estos fármacos tiene efectos colaterales y sigue sin ser totalmente eficaz, pues aún en pacientes que rápidamente revierten su serología, como ocurre en la fase aguda, pueden darse fracasos terapéuticos originados por resistencia a ellos (Cichutek 1994, Donnelly *et al* 1997).

En las fases aguda y crónica reciente se administra el nifurtimox a dosis diaria oral de 10 a 12 mg/kg de peso en pacientes de hasta 40 kg de peso y de 7,5 mg/kg/día en los que excedan este cifra. La recomendada para el benznidazol es de 7,5 mg/kg/día en pacientes de hasta 40 kg de peso y 5 mg/kg/día los que sobrepasen dicho peso. Los dos medicamentos se administran en dos o tres dosis diarias por 30 a 60 días. En la fase crónica se usa el nifurtimox de 8 a 10 mg/kg/día durante 60 a 90 días cada 8 horas y el benznidazol de 5 mg/kg/día por 60 días cada 8 o 12 horas. El tratamiento de la infección congénita se hace con nifurtimox (10 a 15 mg/kg/día) o benznidazol (10 mg/kg/día) comenzando con la mitad de la dosis en niños bajos de peso o pretérmino, si a las 72 horas no se evidencia leucopenia ni plaquetopenia, se pasa a la dosis total por los próximos 60 días (Beaver *et al* 1986, Kenneth 1982, Cuyás y García 1995).

Además del tratamiento antiparasitario, el médico establecerá una terapéutica adecuada para la sintomatología cardíaca. Los pacientes con visceromegalias del tubo digestivo se pueden tratar de manera efectiva excepto en los casos severos, éstos pueden aliviarse con medidas dietéticas según el órgano afectado. En el caso de megaesófago la dilatación neumática de la unión gastroesfágica resulta beneficiosa. Se han recomendado diversas operaciones cuando no responden al tratamiento conservador, la elección depende del grado de dilatación. Para el megaesófago, se realizan las miotomías a nivel del esfínter esofágico o las resecciones esofágicas parciales y para el megacolon, se sugiere la resección del segmento atónico (Beaver *et al* 1986).

II.10 inmunidad en la enfermedad de chagas

La infección por *T. cruzi* se puede diagnosticar por la detección de anticuerpos específicos dirigidos contra el parásito, esto pone de manifiesto su capacidad para estimular la respuesta inmunitaria.

La infección aguda ocurre una vez, aunque se viva en zonas con alto riesgo de reinfección, esto nos indica que el parásito estimula mecanismos de resistencia.

La lesión histopatológica en el período crónico está caracterizada por infiltrados mononucleares y aparente ausencia de parásitos, lo que sugiere que la patología es esencialmente inmunológica.

T. cruzi, similar a como ocurre con otros hemoparásitos, estimula un estado inmunitario que hace variar el curso de la enfermedad. Al inicio de la infección se puede constatar una parasitemia elevada con una duración de varias semanas, que luego decrece hasta hacerse prácticamente indetectable. Esto está vinculado con la respuesta inmune que desarrolla el huésped ante la infección. Durante la fase aguda de la enfermedad se han podido encontrar anticuerpos protectores y fijadores del complemento, específicos de la cepa, que contribuyen a la desaparición de las formas sanguíneas durante la fase aguda de la enfermedad. (Almeida *et al* 1991)

En esta parasitosis está presente el estado de premonición, aunque además la infección deja una fuerte inmunidad adquirida (Almeida *et al* 1991, Cuna y Cuna 1995, Rottenberg *et al* 1995, Metz *et al* 1993). Los anticuerpos específicos identificados son de tipo IgG e IgM, a los pocos días de producirse la infección los primeros en detectarse son del tipo IgM, para posteriormente ser sustituidos por los del tipo IgG, que se mantienen durante toda la vida pero con títulos más bajos que los alcanzados en el período agudo (Metz *et al* 1993).

Existen otros anticuerpos, cuya estimulación es variable, capaces de interferir con la viabilidad del parásito circulante y que están implicados en los mecanismos de resistencia. Se ha demostrado experimentalmente que solamente los sueros que poseen estos anticuerpos son capaces de proporcionar resistencia por transferencia pasiva. Ellos lisan al parásito por activación del complemento (anticuerpos líticos), estimulan su captación por los fagocitos (opsoninas), o median la acción citotóxica de células tales como monocitos, neutrófilos y eosinófilos (anticuerpos citotóxicos mediadores de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos); en conjunto, son los responsables del control relativo de la parasitemia que se establece al finalizar el período agudo de la infección (Almeida *et al* 1991, Cuna y Cuna 1995).

Estudios experimentales han demostrado que además de la inmunidad humoral, la celular tiene un papel predominante, especialmente con la participación activa de los macrófagos, aunque aún no se ha establecido el mecanismo por el cual lo efectúan. En la infección humana, la estimulación de dicha

respuesta se ha puesto en evidencia tanto en pruebas “in vivo” (pruebas cutáneas) como “in vitro” (transformación blástica). Se ha encontrado positiva la prueba de inhibición de la migración de los macrófagos (MIF). Pero estos estudios no permiten inferir el papel que esta respuesta tiene en el transcurso de la infección. Existen evidencias experimentales relacionadas con la participación de factores, tales como el interferón, las células “natural killer” (NK) y los macrófagos en los mecanismos de resistencia (Almeida *et al* 1991).

La citotoxicidad mediada por células T CD8⁺ constituye el mecanismo de eliminación de las formas intracelulares del parásito, aunque citocinas como el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral alfa liberadas por células T cooperadoras CD4⁺(TH1), son importantes para mantener estos mecanismos de resistencia a la infección (Silva *et al* 1995, Olivares y Fresno 1995)

Además, los macrófagos activados por los linfocitos T sensibilizados y en presencia de anticuerpos opsonizantes, actuarían captando y destruyendo al parásito por medio de los productos derivados del metabolismo oxidativo (peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, anión hidroxilo, anión superóxido), a los cuales son sumamente sensibles tanto el tripomastigote como el amastigote, ya que carecen de las enzimas necesarias para actuar sobre ellos y provocar su inactivación (Gomes *et al* 1995). El conocimiento actual es aún muy pobre acerca de la responsabilidad que le pertenece al mapa genético del huésped en la evolución de esta parasitosis, se ha comprobado experimentalmente que el hombre posee algunas variaciones individuales en lo que se refiere a la resistencia natural contra *T. cruzi* .

Se conoce que la respuesta inmune estimulada por la infección natural no es eficiente para eliminar el parásito y que la persistencia de éste brinda inmunidad concomitante al huésped. El equilibrio que alcanza esta relación huésped parásito, quizás se deba a que el parásito ha desarrollado estrategias evasivas a la respuesta inmune:

Mimetismo Antigénico

Esta noción surgió para explicar la existencia de inmunidad concomitante en algunas parasitosis. Esta designación se refiere a un tipo de inmunidad adquirida en la cual la infección parasitaria ya establecida persiste largo tiempo después de haberse desarrollado resistencia contra una reinfección por el mismo parásito. El parásito expresa en su superficie antígenos similares a los componentes del organismo parasitado, los que pueden desencadenar efectos auto inmunes que se manifiestan en las formas crónicas de la enfermedad (Ruiz *et al* 1995, Gazzinelli *et al* 1990).

Variación antigénica

T. cruzi hace un rápido reciclaje de sus antígenos superficiales y solubles. Cuando el huésped produce una respuesta inmune, el parásito evade esta respuesta al modificar su antigenicidad periódicamente. Este mecanismo denominado “camping” le permite liberarse de los anticuerpos que se adhieren a su superficie (Jacoby *et al* 1996).

La extensa diversidad antigénica de este parásito se ha podido identificar con la ayuda de los anticuerpos monoclonales o por interacción con células T (Ouassi *et al* 1990, Franco *et al* 1993, Jacoby *et al* 1996). Estos estudios han permitido afirmar que la variación antigénica es un mecanismo desarrollado por *T. cruzi* (Tambourgi *et al* 1995, Kipnis y da Silva 1989, Tomlinson y Raper 1998).

Fabulación

El parásito sintetiza enzimas (proteínas de membrana), similares al factor de desprendimiento celular (DCF) que escinden la porción Fc de la inmunoglobulina y estas serán incapaces de mediar la lisis por el complemento, impidiendo la actuación de este y además favorecen la lisis de los fagosomas, disminuyendo así la fagocitosis (Alcina y Fresno 1987, John 1990, Taverne 1989).

Bloqueo de destrucción intracelular

Este fenómeno caracteriza a las infecciones por parásitos intracelulares que se desarrollan dentro de los macrófagos durante una parte o todo su ciclo de vida, como es el caso de *T. cruzi*. Este último escapa al citoplasma y se reproduce exitosamente en él, porque a ese nivel los macrófagos no poseen mecanismos digestivos, escapando de esta manera de la acción de las enzimas lisosomales; esto sería mediado por una proteína de poro secretada por el tripomastigote (Petri y Eisen 1989)

Inmunosupresión

La inmunosupresión inespecífica es una característica universal de la infección parasitaria y se ha demostrado tanto en las respuestas mediadas por anticuerpos como en las mediadas por células. Los parásitos han aprendido a interactuar con el sistema inmune desequilibrándolo a su favor. Se produce interferencia de la respuesta inmunitaria del huésped por los antígenos liberados por el parásito, lo que logran de diferentes formas, por ejemplo, activando las células supresoras, que pueden ser linfocitos T, macrófagos o ambos, como es el caso de *T. cruzi*; entre otras (Petri y Eisen 1989)

Aislamiento anatómico

La localización, crecimiento y multiplicación intracelular de los amastigotes de *T. cruzi* les permite hacerse inaccesibles a los sistemas de inmunidad (Unterkircher *et al* 1993). Otro elemento importante a señalar relacionado con la Enfermedad de Chagas es que se caracteriza por ser una patología autoinmune crónica (Unterkircher *et al* 1993, Cossio *et al* 1974, Levin 1990) donde la infección por el parásito estimula el desarrollo de múltiples autoanticuerpos (Gruppi *et al* 1995, Ross y Sutherland 1997) lo cual detallamos con anterioridad. El juego entre respuesta inmune y evasión determina el control de la parasitosis, lo que preserva al huésped de la muerte y asegura la persistencia del parásito.

II.11 vacunas contra *Tripanosoma cruzi*.

La prevención mediante la quimioprofilaxis y las vacunas no es posible realizarlas debido a que no existen para la Enfermedad de Chagas (Cuyas y García 1995, Acosta 2001). Esto se ha visto dificultado por la cronicidad de la infección. El proceso de diferenciación de *T. cruzi* es uno de los factores que dificultan la selección de antígenos eficientes para la obtención de una inmunoprofilaxis práctica (Cuyas y García 1995)

Se han identificado diferentes moléculas antigénicas del parásito que podrían ser utilizados como inmunógenos protectores (Gruppi *et al* 1995, Basombrio 1990, Teixeira 1979). Adrews y colaboradores obtuvieron inmunoprotección usando parásitos muertos por métodos físicos o químicos (Adrews *et al* 1985). El uso de varias cepas de *T. cruzi*, cuya virulencia ha sido atenuada por varios pases en cultivo, por tratamiento con agentes farmacológicos o por radiación ionizante puede inducir resistencia adquirida a la fase aguda de la infección (Wrightsmán *et al* 1995, Araujo 1991).

Otra alternativa es la vacuna de antígenos purificados de *T. cruzi*. Se han probado experimentalmente algunas variantes entre ellas, la inmunización de ratones con bajas concentraciones de un antígeno purificado a partir de epimastigotes, acoplado a un adyuvante, indujo fuerte respuesta inmune humoral y celular y protegió del reto con una dosis letal del microorganismo (Wrightsmán *et al* 1995, Araujo 1991).

En los últimos años, el volumen de experimentos en busca de antígenos eficaces para el desarrollo de una inmunidad protectora contra *T. cruzi* va en aumento, particularmente con respecto a las glándulas salivales del vector (Valenzuela *et al* 1998). Esos estudios parten del supuesto de que los tejidos más adecuados del vector serían aquellos que más contacto establecen con el hospedero o con la sangre de este. En el caso de la Enfermedad de Chagas, las glándulas salivales de los vectores, pueden tener un atractivo especial, ya que son órganos que tienen un papel muy importante en la alimentación del insecto. La inactivación de

proteínas de las glándulas salivales inhibitoras de procesos tales como la coagulación de la sangre y la agregación plaquetaria, por anticuerpos del hospedero, pueden ser una forma eficaz de inmunoprofilaxis para el control del insecto y por tanto de la infección (Valenzuela *et al* 1998).

Más recientemente, algunos investigadores estudiaron la doble condición de la proteína cruzipain, la principal cisteino proteinasa de *T. cruzi* la cual, además de ser utilizada para el diagnóstico serológico de la enfermedad, induce protección tanto sistémica, como en mucosas (Schnapp *et al* 2002). Esta proteína es expresada en todas las formas de desarrollo del parásito, estimulando una fuerte respuesta humoral y celular tanto durante la infección en humanos, como en ratones BALB/c (Schnapp *et al* 2002). Además, hay nuevas evidencias relacionadas a proteínas asociadas con el ADN kinetoplastideo (kDNA), que están relacionadas con los procesos esenciales de la vida del parásito, y que pudieran utilizarse como diana en la preparación de drogas antiparasitarias o de vacunas (Zavala-Castro *et al* 2002). Se ha demostrado que la proteína, llamada Tc52, liberada por *T. cruzi* está relacionada con la familia de las thio- β -disulfide oxidoreductasas la cual es esencial en la virulencia y supervivencia del parásito e induce maduración de las células dendríticas, confiriendo protección contra la infección letal (Ouaissi *et al* 2002). También, se ha demostrado la eficacia de la inmunización con genes quiméricos frente al reto con este parásito (Planelles *et al* 2001). Garg y colaboradores (Garg *et al* 2002) indujeron protección contra el parásito por medio de la expresión de genes de interés vacunal transfectados en plásmidos

II.12 vacunas de ADN.

Antecedentes

En 1982, se reportó que el ADN del Virus de la Hepatitis B (VHB) inyectado a primates, era capaz de expresar proteínas y de infectar (Will *et al* 1982). En 1990 se administró ADN y ARNm en solución salina, directamente en el músculo esquelético de ratones. Esto resultó en la expresión de las proteínas codificadas por el ácido nucleico en una porción de las células (Wolf *et al* 1990)

Ya en 1992 surgió el concepto de que la inmunización genética era un método simple con el cual se podía generar respuesta inmune al demostrarse la presencia de anticuerpos contra la hormona de crecimiento y de la alfa 1-antitripsina humanas, después de introducir en orejas de ratones micropartículas de oro recubiertas por los plásmidos que codificaban para dichas proteínas, empleando el disparador de genes (Tang *et al* 1992).

Estudios realizados en 1993 arrojaron que la inyección intramuscular en modelo murino de un plásmido que codificaba para la Núcleo-proteína (NP) del virus de la Influenza humana, estimuló la producción de

anticuerpos específicos anti NP y LTC, restringida por moléculas del CPH-1, que protegió contra el reto de cepas homólogas y heterólogas del virus (Ulmer *et al* 1993).

Estos ensayos alentaron la aplicación de este método en la obtención de vacunas contra enfermedades que azotan al hombre y cuya cura efectiva no ha sido encontrada aún.

Inmunización con vectores de uso vacunal. Respuesta inmune protectora citotóxica mediada por linfocitos TCD8⁺ y auxiliadora mediada por linfocitos TCD4⁺

La inmunización con ADN consiste en la inoculación de vectores plasmídicos o virales que contengan genes que codifican antígenos de interés vacunal los cuales son directamente inyectados en el músculo o en la piel con el propósito de obtener una respuesta contra el producto génico expresado (Heyneman y Mc Kerrow 1991, Wolff *et al* 1992). Esta metodología fue descrita por primera vez en 1992, pero a pesar de ello, ha tenido un desarrollo acelerado en los últimos años (Wolff *et al* 1992, Shabaan *et al* 2003, Horumal *et al* 2003).

Este tipo de vacunas tienen la capacidad de estimular respuestas inmunes protectoras a nivel humoral y celular; estimulando tanto poblaciones de linfocitos TCD4⁺ cooperadores como citotóxicos TCD8⁺ después de una dosis única, sin emplear adyuvantes, de una forma duradera y persistiendo por largos períodos de tiempo en el huésped sin integrarse al genoma (Kim *et al* 1998, Smith 1994, Shabaan *et al* 2003, Ouyang *et al* 2003). La aparente persistencia de la expresión de antígenos de dichas vacunas parece permitir su uso en los recién nacidos de algunas especies, evadiendo los efectos destructores de los anticuerpos maternos y favoreciendo una respuesta celular específica tipo T, con el consiguiente establecimiento de una memoria inmunológica. Estas vacunas carecen de los riesgos que poseen las vacunas vivas atenuadas como reversión de la virulencia y producción de enfermedades en individuos inmunodeficientes (Smith 1994, Liu *et al* 2003).

Para lograr la inducción de una respuesta inmune se utilizan vectores que expresan la proteína foránea en las células superiores y que contienen características específicas en dependencia del propósito final que nos hemos trazado (Rodríguez *et al* 2002). Estos vectores son diseñados de tal manera que puedan ser manipulados de forma inicial en un hospedero unicelular, generalmente *Escherichia coli*. Ahí son seleccionados por el nuevo fenotipo de resistencia a determinados antibióticos, que le confiere la presencia del plásmido. Los plásmidos son moléculas de ADN de doble cadena, circulares y extracromosomales, que existen en el interior de las bacterias y se replican de manera autónoma en la célula hospedera. Es

posible separar e insertar en ellos mediante manipulación genética fragmentos de ADN que codifican antígenos foráneos (Vogel 1995, Davis *et al* 1993, Finan *et al* 1993).

En general las construcciones genéticas utilizadas para este tipo de inmunización contienen un promotor funcional en las células eucarióticas, el gen de interés que codifica un producto de importancia vacunal, orígenes de replicación para *E. coli* además, de un gen de resistencia a antibióticos (Haynes 1995, Davis *et al* 1995, Whalen *et al* 1995); generalmente kanamicina para seleccionar los transformantes (Davis *et al* 1995, Whalen *et al* 1995). Esta construcción es administrada *in vivo* por vía intramuscular, intradérmica o mucosa; algunos autores han reportado también la administración endovenosa (Robertson 1994, Jutewicz *et al* 1995).

Ventajas y desventajas de la vacunas con ácidos nucleicos

Los productos de la vacunación con ADN se expresan directamente en el tejido blanco, representando esto una ventaja cuando se trabaja con antígenos de difícil obtención, con una elevada pureza, o en grandes cantidades, evitando así los riesgos biológicos aparejados a la manipulación de grandes volúmenes de microorganismos patógenos y permitiendo seleccionar la diana específica, lo que no es posible con las vacunas clásicas (Robinson *et al* 1993). Se obtienen a un bajo costo, su producción es relativamente simple y la mayoría de los laboratorios están equipados para su producción en cantidades adecuadas, son de fácil administración y su conservación y el transporte se ve favorecido por su estabilidad a temperatura ambiente, lo que al mismo tiempo elimina el requerimiento de una cadena de frío, facilitando una mayor accesibilidad geográfica y permitiendo llevar la vacunación hasta áreas remotas, debido a que el ADN puede ser procesado como un precipitado seco y ser reconstituido con solo adicionar agua estéril inmediatamente previo a la administración (Yokoyama *et al* 1995, Bahloul *et al* 1998).

Las vacunas de ácidos nucleicos ofrecen una alternativa simple para la generación de respuesta de linfocitos T citotóxicos (del inglés, CTL) a diferencia de otros métodos como la inmunización con péptidos, limitada en su aplicación por la diversidad genética de las poblaciones humanas, o virus vivos atenuados los cuales pueden ver restringido su uso por cuestiones de seguridad como por ejemplo en Vaccinia o VIH. Otra ventaja de estas, es la posibilidad de codificar múltiples antígenos que incluyen algunos capaces de servir como inductores de determinados tipos de respuesta inmune (Donnelly *et al* 1997, Shabaan *et al* 2003, Ouyang *et al* 2003).

Una ventaja potencial de la vacunación con ADN para diversas enfermedades virales es que mediante la expresión de las proteínas virales “in situ” estas pueden tener el mismo plegamiento, las mismas

modificaciones transcripcionales y el mismo tipo de transporte intracelular ya que están siendo expresadas por las mismas células que son su hospedero en la infección natural (Rodríguez *et al* 2002, Bohloul *et al* 1998, Donnelly *et al* 1997).

Métodos de inmunización con el ADN. Mecanismo involucrados en la internalización del ADN en la célula

Para introducir esta construcción genética en el hospedero el método más utilizado es la inyección con ADN "desnudo", por vía intramuscular o subcutánea, en la cual es frecuente el empleo de la pistola de genes (Ma 1995), que es un método simple y no tóxico (Schofield y Caskey 1995). Esta técnica se ha convertido en la herramienta preferida para la inmunización con ADN y aunque la naturaleza de la inmunidad inducida es en su esencia igual a la que se obtiene por una inyección intradérmica (Robertson 1994), ambas logran una adecuada expresión de genes y una respuesta inmune específica después de una única dosis (Lee 1997, Matzinger 1994). La utilización de la pistola de genes se ve frenada por el costo de la tecnología (Matzinger 1994).

En la inmunización con ADN desnudo, un plásmido es inyectado de manera directa en el órgano o tejido blanco y por un mecanismo aún no bien explicado estas moléculas son internalizadas por las células (Schofield y Caskey 1995, Lee 1997). En el caso específico del músculo esquelético, se ha planteado que el paso de los ácidos nucleicos a través de la membrana ocurre como consecuencia de determinadas características estructurales que lo favorecen, como son: presencia de células multinucleadas, retículo sarcoplásmico y un extenso sistema tubular transversal que contiene fluido extracelular y penetra profundamente en las células musculares permitiendo la transferencia de ADN (Matzinger 1994).

Además de la administración directa de plásmidos, con la que se han obtenido los mejores resultados, se han usado vectores retrovirales recombinantes, ADN encapsulado en liposomas y ADN unido a proteínas transportadoras específicas, con resultados variables (Schofield y Caskey 1995). Uno de los factores fundamentales en la generación o no de respuesta inmune, parece estar relacionado con la fortaleza del promotor empleado. Generalmente las inmunizaciones exitosas efectuadas con ADN han empleado promotores del virus de Sarcoma de Rous (RSV) o preferentemente del citomegalovirus (CMV) (Pardoll 1995), encontrándose que los elementos de control transcripcional de los promotores de los genes muy tempranos de CMV, el cual incluye el intrón A, proporcionan una adecuada expresión de antígenos para la inducción de respuesta inmune (Pardoll 1995).

Se han empleado también promotores tejido-específico para la expresión de antígenos en la terapia génica. En algunos trabajos se ha usado la caja TATA de la RNA polimerasa II mientras que en otros se ha empleado al final una variedad de secuencias de poliadenilación que estabilizan el ARNm *in vivo*, pero la estabilidad parece variar dependiendo de la fuente, siendo una de las favoritas la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (3' UTR BGH).

Respuestas inducidas por la inmunización con ADN. Células presentadoras de antígenos (CPA)

En la inmunización con ADN desnudo para generar una respuesta inmune, particularmente de tipo celular, se necesita de la presentación de antígeno por las células presentadoras de antígenos profesionales (del inglés APC) (Pardoll 1995, Davis *et al* 1995, Garg y Tarleton 2002) debido a que esto no puede ser realizado directamente por los miocitos o células epiteliales (Schofield y Caskey 1995). Estos mecanismos de acción y presentación de antígeno en la inmunización con ADN desnudo no son conocidos. Se ha demostrado la generación de linfocitos citotóxicos específicos cuando los ácidos nucleicos son captados y expresados por las células del huésped en asociación con los antígenos de histocompatibilidad clase I (Lee 1997, Matzinger 1994, Corral y Petry 2000). Pequeñas concentraciones de péptidos sintetizados endógenamente pueden ser liberados continuamente de las células transfectadas o después de la muerte de la célula. La proteína extracelular pudiera entonces ser endocitada dentro del compartimento endosomal por células presentadoras de antígeno profesionales y seguidamente procesadas y acomplejadas con las cadenas alfa y beta de las moléculas de histocompatibilidad clase II, que después de la translocación a la membrana celular estimula a linfocitos T CD4+ los cuales son activados y promueven la ayuda a células B para la producción de anticuerpos (Whalen *et al* 1995, Germain y Margulies 1993, Wolf *et al* 1990, Wang *et al* 1995).

Se sugiere que la entrada de ADN y/o la expresión de proteínas por células dendríticas dispara la respuesta inmune en vacunas de ADN (Xiang y Ertl 1995) además, se conoce que la disposición intradérmica del ADN codificador de antígenos puede conducir a la activación de las APC en la dermis las cuales constituyen un 5% del tejido celular. Hasta ahora los mejores resultados por ruta intradérmica se han logrado con pistola de genes en algunos sistemas (Bevan 1995, Suto y Srivastava 1995).

En músculo la situación no es tan clara. Inicialmente las vacunas de ADN fueron suministradas por vía intramuscular y el hecho de que estas actuaran como inductores específicos de parámetros de inmunidad como la mediada por CTL sorprendió, ya que la presentación de antígenos para las células T requiere de las células presentadoras de antígenos (del inglés, APC) y los miocitos están carentes de las moléculas

vitales para la coestimulación (Whalen 1995). Ciertamente, como se ha demostrado con ADN marcado, los miocitos toman y expresan el ADN seguido de su inyección (Suto y Srivastava 1995), este proceso puede ser potenciado por la inclusión de ciertas moléculas facilitadoras como la bupivacaína, la cual provoca una dilatación total de los vasos en el sitio de inyección, activación de macrófagos y otras APC (Wolf *et al* 1990). La expresión puede ocurrir por meses, incluso por años (Schofield y Caskey 1995), lo que puede representar una ventaja considerable de las vacunas de ADN, ya que la respuesta pudiera tener un mantenimiento sostenido concomitante de células efectoras con la consiguiente memoria inmunológica.

Supuestamente, el ADN entra al núcleo y se transcriben los genes, expresándose entonces las proteínas y está lejos de aclararse si las proteínas sintetizadas por las células transfectadas, particularmente en los miocitos, actúan como la fuente de antígenos para la respuesta inmune.

Otra idea de como puede ocurrir la inducción de inmunidad establece que las células dendríticas o células invasoras en la respuesta al daño de células musculares pueden actuar como APC centrales (Whalen *et al* 1995). En ocasiones, para potenciar su actividad se emplea el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Whalen *et al* 1995).

Es posible que las células musculares puedan actuar como la fuente principal de proteínas y secretar el material que estaría disponible para la estimulación de las células del sistema inmune, pero para la estimulación de ciertas células T, la síntesis endógena es considerada como necesaria (Wang *et al* 1995). Existe un número de posibilidades en las que parece que en algún momento las proteínas exógenas pueden acceder a rutas de presentación necesarias para la inducción de las células T CD8⁺ (Whalen *et al* 1995). La primera es la existencia de una ruta en las células para exportar proteínas de los fagosomas al citosol y donde estas pueden entrar por rutas asociadas al MHC-I, demostrándose esta posibilidad para proteínas encapsuladas en liposomas sensibles a pH. Otra alternativa es la captura de péptidos presentados por moléculas de MHC y por último la posibilidad de la salida de péptidos de las células por medio de “chaperonas” como HSP96 y la posible internalización de estos complejos por receptores específicos en algunos tipos de APC (Sizemore *et al* 1995).

Utilizando los datos anteriores para lograr una explicación a la respuesta inducida mediante inmunización con ADN en el músculo, se han propuesto varias hipótesis dentro de las cuales se encuentran: 1) Las células musculares expresan el ADN exógeno y generan material antigénico el cual actúa normalmente ó 2) El antígeno es presentado a las APC del sistema inmune por las mismas células musculares ó 3) El antígeno es transferido directamente a las APC las cuales lo presentan provocando una respuesta inmune.

Una alternativa a la transferencia de proteínas expresadas, es la degradación de las células transfectadas con el ADN foráneo por las células fagocíticas del sistema inmune transfectando así a estas células con el ADN y generando una reacción inmune diferente a la generada por un antígeno no regenerativo (Bagarazzi *et al* 1998, Johnston y Barry 1997).

Potenciación de la inmunidad específica y propiedades adyuvantes del ADN

Para muchos agentes es necesario potenciar la inmunidad de mucosa para evitar la infección, lo que usualmente se hace mediante inmunización por vía oral o intranasal. En esta última se han logrado los mayores progresos cuando el ADN se acompaña de lípidos catiónicos y se logra además una potenciación de la respuesta inmune de mucosa (Wolf *et al* 1990).

Para que el ADN induzca una respuesta inmune por vía oral el fenómeno parece ser un poco más complejo, y se ha empleado la toxina del cólera (TC) como adyuvante en vacunas de ADN contra HVS-1 aumentando la resistencia en experimentos de retos vaginales. Existen otros métodos novedosos de liberación de ADN en la mucosa, se ha descrito recientemente el empleo de células bacterianas transformadas con plásmidos las cuales lo liberan en las células de la mucosa esto es de vital importancia para la inducción de la respuesta inmune de mucosa, así como para la activación de CTL. La ruta quizás menos explorada es la administración por vía endovenosa (Wolf *et al* 1990).

Cuando se conoce qué tipo de respuesta es necesaria para lograr una protección contra determinado patógeno, se trata de generar deliberadamente una conversión del tipo de respuesta inmunológica, aunque para la mayoría de los investigadores es más seguro y efectivo estimular la respuesta humoral y la celular, simultáneamente. Las dos partes de la respuesta están bajo el control de las células T cooperadoras (del inglés T helper, Th) Th1 o Th2 del linaje celular CD4⁺ (Xiang y Ertl 1995).

Cada vez es más evidente que las respuestas son mezcladas, por lo que no se debe inferir que la elección para un tipo de respuesta Th1 o Th2 sea de todo o nada y más bien caracteriza el perfil de la respuesta dominante. Otra alternativa es el empleo de vacunas de ADN en una inmunización y en la segunda dosis otro tipo de inmunógeno ya que en general poco se gana cuando se amplifica una primera dosis de ADN con ADN (Xiang y Ertl 1995). Para la segunda dosis se han utilizado antígenos glicoproteicos (que como inmunógenos primarios no brindan una buena respuesta), vacunas virales y vacunas de subunidades de proteínas recombinantes. El ADN por sí solo tiene propiedades estimulantes del sistema inmunológico y la administración de ADN adicional o la simple modificación de la secuencia de ADN puede servir para incrementar la respuesta inmune. Se han publicado una serie de artículos que demuestran que algunas

secuencias de nucleótidos específicas presentes en el ADN bacteriano son estimuladoras para los linfocitos. Entre estas secuencias se destacan repeticiones del dinucleótido CpG (motivos CpG), que se ha comprobado que estimula la respuesta inducida por las vacunas de ADN y su ausencia puede conducir a una inhibición de ella. Mediante la inmunización intradérmica la incorporación de tales secuencias estimuladoras en el plásmido incrementan la respuesta humoral y celular para la β galactosidasa, codificada por el plásmido que contiene la secuencia estimuladora o por un plásmido coinyectado (Xiang y Ertl 1995).

El cambio de la respuesta de anticuerpos de IgG1 a IgG2a contra una proteína antigénica coinyectada se puede alterar, con una inyección intramuscular de ADN plasmídico pudiéndose inferir que el plásmido por sí solo se comporta como adyuvante o inmunomodulador, por lo cual podemos plantear que alterando la secuencia de nucleótidos de un vector se puede alterar la inmunogenicidad de la vacuna de ADN (Xiang y Ertl 1995)

La inmunización con ADN representa una gran promesa como un sistema de vacunas de nueva generación, que consiste en una expresión continua del antígeno durante un tiempo determinado. Sin embargo, es difícil la identificación de los genes de un patógeno determinado que sean capaces de inducir respuesta inmune. Para la selección del ADN que codifica para el inmunógeno, se puede emplear la inmunización con una biblioteca genómica de expresión (Acosta 2001), de esta manera, varios cientos de ratones son inyectados con segmentos de todo el genoma y los que generen una respuesta inmune son investigados, pudiendo localizarse el o los genes que pudieran ser posibles candidatos vacunales. Se ha realizado la inmunización con bibliotecas genómicas de algunos patógenos demostrando su capacidad de inducir respuesta celular y humoral en el modelo de ratón (Acosta 2001, Xu y Liew 1994, Barry y Lai 1995, Michel 1995).

Como consecuencia de la amplia diversidad de agentes infecciosos en los que se está utilizando la inmunización con ADN y de la relativa corta vida de esta, los esquemas de inmunización necesarios para lograr obtener un tipo específico de respuesta aún no se encuentran definidos y se hallan disímiles variantes en relación a las dosis, tiempo entre ellas y rutas; por lo que hasta el momento cada grupo debe determinar su propio esquema de inmunización que manifieste armonía con los genes empleados y el tipo de respuesta que se pretende desencadenar (Michel 1995).

Entre el numeroso grupo de enfermedades en las que actualmente se trabaja en el desarrollo de vacunas de ADN podemos mencionar la Leishmaniasis (Shirmbeck *et al* 1995), Mycoplasmosis (Davis *et al* 1994), Hepatitis B (Davis *et al* 1994, Lagging *et al* 1995, Hoffman 1994), Hepatitis C (Lowrie *et al* 1994),

Malaria (Xiang *et al* 1994), Tuberculosis (Tanghe *et al* 2001), Rabia (Webster *et al* 1994), Influenza (Ulmer *et al* 1994, Montgomery *et al* 1993, Wang *et al* 1994) y SIDA (Ugen *et al* 1998, Tang *et al* 1992, Deck *et al* 1997). Las respuestas dependen del patógeno y no todas ellas se necesitan para dar protección (Fu *et al* 1998, Berder *et al* 1998). Se han comenzado los estudios encaminados a la terapia antitumoral (Bender *et al* 1998). Varios laboratorios han reportado el uso de ADN plasmídico como vacunas antitumorales, empleando construcciones plasmídicas que codifican los genes de la región variables de anticuerpos para inducir respuesta de anticuerpos anti-idiotípicos. Los títulos de anticuerpos obtenidos fueron más altos cuando se realizó una co-inyección con plásmidos que codifican la IL-2 o el INF γ . Dentro de los patógenos, el virus de la influenza es uno de los más estudiados por inmunización con ADN y especialmente dos de sus proteínas, la nucleoproteína A (NP) una proteína altamente conservada entre todos los virus de influenza A y la hemaglutinina (HA), glicoproteína de la superficie viral (Graun *et al* 1996, Liu *et al* 1996). La respuesta contra HA encontrada por la inmunización con ADN empleando diferentes vías (gotas intranasales, pistola de genes) (Graund *et al* 1996, Liu *et al* 1996) y su uso potencial en hombres, es de mayor magnitud que la que se genera empleando la vacuna de subunidad de HA. Con una inmunización primaria con pistola de genes ocurre un rápido llamado a las células B de memoria en el tejido linfóide, un evento necesario para la protección homóloga contra la influenza (Mancini *et al* 1996).

Vacunas de ADN en la Enfermedad de Chagas

La utilización de esta metodología en la Enfermedad de Chagas ha sido reportada por varios autores (Schnapp *et al* 2002,) los cuales han trabajado con genes individuales. Ellos han demostrado la inducción de respuestas tipo B y T citotóxica específica después de la inmunización con el gen que codifica para la principal cisteína proteínasa (cruzipain) del parásito (Schnapp *et al* 2002) además de comprobar en otros trabajos que esta misma proteína induce protección en mucosa y a nivel sistémico contra *T. cruzi* (Schnapp *et al* 2002). Rodríguez y colaboradores (Rodríguez *et al* 2002) encontraron una respuesta protectora tipo 1 después de la inmunización con un plásmido que contenía una proteína de *T. cruzi*. Resultados semejantes fueron encontrados por otros autores al inmunizar ratones BALB/c con plásmidos que contenían las proteínas ASP-1, ASP-2 y TSA-1 las cuales producen respuesta T citotóxica específica. Garg y colaboradores (Garg *et al* 2002) y otros, al inmunizar ratones con plásmidos que expresaban el gen que codifica para la trans-sialidasa (TS), antígeno de superficie de *T. cruzi*, (Katae *et al* 2002) obtuvieron resultados semejantes. Otros investigadores han reportado la inducción de anticuerpos que inhiben la actividad enzimática Trans-sialidasa al inmunizar con plásmidos que contienen genes para TS

de *T. cruzi* (Fujimura *et al* 2001). Por otro lado, Sepúlveda y colaboradores demostraron la existencia de protección en modelos murinos al inmunizar con un candidato vacunal compuesto por la proteína reguladora complementaria (CRP, del inglés *complement regulatory protein*) de *T. cruzi* (Sepúlveda *et al* 2000).

Regulaciones para el empleo de estas vacunas. Principales riesgos que se relacionan con su uso

El empleo de vacunas en los seres humanos está normado por Instituciones reguladoras que evalúan la seguridad y efectividad de todos los diversos preparados vacunales y ellas son las que autorizan o no su aplicación. Las vacunas de ADN no están eximidas de esto y los riesgos principales que se relacionan con ella son:

- El potencial de integración del ADN plasmídico al genoma de la célula hospedadora.
- El potencial de inducción de tolerancia o autoinmunidad.
- El potencial de inducción de anticuerpos contra el ADN.

Es por ello que en todas las investigaciones específicas relacionadas con el desarrollo de vacunas, se requiere de un trabajo experimental sobre la probable eficacia futura antes de ser probado en la especie blanco. De esta manera los debates acerca de las posibles vacunas son realizados a partir de experimentos efectuados en modelos animales, generalmente en ratas y en primates, antes de intentar pruebas clínicas en humanos. Se han usado otros animales como el conejo (Harley 1997).

Las pruebas en primates han alcanzado hasta los monos Aotus, pero el chimpancé continúa siendo el sistema de prueba más apropiado. A pesar de ello, como hay que garantizar que no se sometan a un estrés excesivo y cada animal puede haber sido el modelo de un número de candidatos vacunales y retos, resulta difícil la interpretación de los resultados obtenidos a partir de este sistema. No sucede así con Macaco rhesus, el cual constituye la base del trabajo en el VIH y su equivalente en simio VIS o el virus híbrido VIHS (Harley 1997).

Potencial de integración

La integración del ADN plasmídico al genoma de la célula hospedero, podría ser silente o fenotípicamente apreciable si este evento interrumpe un gen asociado a una función celular determinada. Este gen podría estar asociado, directa o indirectamente, con el proceso de división celular; resultando un efecto carcinogénico que también pudiera ser provocado por la activación de un oncogen. El proceso de integración puede ocurrir al azar o como resultado de una recombinación homóloga.

Inducción de tolerancia y auto inmunidad

En algunos sistemas experimentales la inyección repetida de pequeñas cantidades de antígenos conduce a una tolerancia inmunológica. El hecho de que el total de antígenos producidos luego de la inmunización con ADN sea poco y que en ocasiones la expresión de estos antígenos después de la inmunización persista por semanas o meses, hace pensar en la posibilidad de la inducción de una tolerancia más que de una inmunidad protectora (Lefkowitz y Gilkeson 1996).

En los estudios realizados donde se inmuniza con bajas dosis de ADN plasmídico a animales adultos (monos verdes africanos y ratones) aunque no es detectable una respuesta de anticuerpos, sí ha creado una memoria inmunológica que se pone de manifiesto en inmunizaciones posteriores con los antígenos en forma de virus inactivados o atenuados y no se ha comprobado el desarrollo de una tolerancia (Lefkowitz y Gilkeson 1996), incluso, se ha reportado que la inmunización con ADN elimina la tolerancia a ciertos antígenos como es el caso del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HbsAg) (Tan 1982). Hasta ahora, solo se ha encontrado tolerancia producida por inmunización con ADN en neonatos de algunas especies, por eso la edad, la especie y el método de administración son variables fundamentales para la respuesta a la inmunización con ADN (Lefkowitz y Gilkeson 1996).

La aparición de una respuesta auto inmune pudiera estar relacionada a la destrucción de las células musculares que expresan los antígenos, con la consiguiente liberación al medio de los constituyentes que podrían, en lo teórico, ser capaces de desencadenar una respuesta inmune. Esto ocurre tanto durante la infección viral como en la bacteriana, así como en el proceso de recambio celular, por lo que parece improbable que las vacunas de ADN posean algún riesgo adicional con relación a las vacunas convencionales.

Anticuerpos anti- ADN

La presencia de anticuerpos anti- ADN se asocia a ciertas patologías auto inmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico, pero la causa de este fenómeno aún no está totalmente esclarecida y están presentes una serie de factores que desempeñan un rol importante como lo son la susceptibilidad genética y las deficiencias inmunológicas. Sin embargo, aún no es del conocimiento de la ciencia si la exposición al ADN puede inducirlo o exacerbarlo. Se tienen algunas evidencias que indican la poca probabilidad de estos hechos: el ADN de doble cadena no induce anticuerpos anti-ADN, a menos que se encuentre acompañado a proteínas y se administre acompañado de un adyuvante; los anticuerpos anti-ADN circulan normalmente en humanos y en ratones, son específicos para el ADN bacteriano de determinada especie y

no presentan reacción cruzada con el ADN de mamíferos; lo que sugiere que su origen radica en una infección previa, y por último, la vacunación de animales con ADN puede resultar en la inducción de pocos o ningún anticuerpo anti-ADN detectables por las técnicas existentes (Fye y Sack 1993, Tan 1984). Dentro de los mecanismos de control de *T. cruzi* se encuentra la detección de anticuerpos, lo que puede tener utilidad en el tratamiento precoz y en la evitación de la transmisión por transfusiones, así como el desarrollo de una vacuna eficaz para la prevención de la misma. El objetivo de esta tesis es el desarrollo de vacunas experimentales sobre la enfermedad.

Principales obstáculos a tener en cuenta en el camino hacia una vacuna de ADN contra T.cruzi en el humano.

- Es un parásito en que su ciclo de vida pasa por muchos estadios y en cada estadio hay un perfil antigénico diferente.
- No se conocen hasta el momento antígenos protectores de cada estadio y no se han descrito antígenos comunes de estadio.
- No se conoce de forma precisa el tipo de respuesta inmune asociado a la protección
- La presencia de intrones en el genoma de *T. cruzi* complica técnicamente las vacunas de ADN
- Riesgo potencial de producir trastornos inmunopatológicos lo cual pudiera desencadenarse por la persistencia de la expresión de antígenos después de la inmunización con vacunas de ADN.

Aceptabilidad de las vacunas de ADN para su empleo en humanos.

Las agencias reguladoras como la AAF y la OMS (Food and Drug Administration 1996, Robertson 1998) exigen que deben tenerse en cuenta algunos aspectos sobre la seguridad de las vacunas de ADN para que sea aceptada su aplicación en seres humanos. Estas se corresponden con las preocupaciones que desde el punto de vista teórico despierta la introducción de información genética y la expresión persistente de un antígeno extraño en un organismo.

- 1- El ADN inyectado puede integrarse en las células del huésped y causar mutaciones por inserción de dichos plásmidos
- 2- La expresión por periodos prolongados de antígenos no propios pueden causar reacciones inmunopatológicas no deseadas
- 3- El uso de genes de citocinas o moléculas coestimuladoras pueden provocar efectos adicionales
- 4- La generación de anticuerpos anti-ADN pueden contribuir al desarrollo de reacciones autoinmunes

5- El antígeno expresado puede tener actividad biológica.

El tema de la seguridad para el uso de estos preparados vacunales tiene gran relevancia en estos momentos por el riesgo potencial de transformación que tiene estos conllevando, entre otras posibilidades a la formación de células tumorales debido a la inserción de un oncogen activo, la activación insercional de un protooncogen de la célula hospedera, o de la desactivación insercional de un supresor de oncogen (Robertson 1998).

Estas transformaciones pueden ocurrir a través de tres mecanismos: Integración al azar, recombinación homologa o inserción retroviral. Se conoce que el ADN transfectado en líneas celulares puede integrarse aleatoriamente por recombinación homóloga. Por esto es que las regulaciones, en el diseño y construcción de los plásmidos, van encaminadas a que en estos, no se incluyan secuencias con homologías al genoma humano, y no haya presencia de orígenes de replicación en células de mamíferos (Nichols *et al* 1995, Shiver *et al* 1996, Siegrist 1998).

En el recién nacido y en el caso de músculos tratados con agentes farmacológicos la posibilidad de la integración al azar no ha sido observado por técnicas como la PCR (sensibilidad de 1 copia del ADN plasmídico en 150 000 núcleos. Además, la extracción y reclonación de plásmidos vacunales a partir de músculo esquelético inmunizado arrojó la ausencia de insertos de ADN cromosomal (Siegrist 1998).

En el caso específico de la inducción potencial de tolerancia inmune y autoinmune se ha demostrado que en organismos sanos el ADN de doble cadena no es capaz de inducir anticuerpos anti ADN y que estos solos han podido observarse después del inocular a ratones sanos con ADN desnaturalizado y acomplejado a otra proteína y coadministrado con adyuvante completo (Gilkinson *et al* 1992, Robertson 1994, Nichols *et al* 1995)

Hay que tener en cuenta que tanto en humanos como en ratones, circulan normalmente anticuerpos anti ADN, específicos para ADN de ciertas especies bacterianas y que no reacciona cruzadamente contra ADN de mamíferos, lo que los hace no patogénicos (Mor *et al* 1997).

Por estas razones el diseño de plásmidos estipula el menor porcentaje de homología con el ADN de mamíferos

La vacunación de animales sanos con vacunas de ADN resultó en la inducción de poco o ninguna antiADN según los métodos de detección utilizados ELISA, WB, Radioinmunoensayo

Animales inmunizados con dosis bajas de ADN plasmídico e inmunizados subsecuentemente con vacunas de virus inactivos han generado una respuesta inmune específica normal.

No obstante todo lo dicho las regulaciones para este tipo de vacunas por su novedad se encuentran en revisión constante y se enriquecerán en la medida de que aumente los ensayos clínicos

En consecuencia con lo anterior en las regulaciones se contemplan los siguientes aspectos:

Control de materiales iniciales. Incluyen datos relacionados tanto con la secuencia nucleotídica del gen o genes de interés, así como de los plásmido y de las cepas transfectadas, garantizar que el plásmido no tenga secuencias de interés biológicas, información precisa del ADN de los marcadores de selección , la cepa hospedera debe estar totalmente caracterizada entre otras.

Control del proceso de producción. Deben existir bancos de células primarios y secundarios libres de contaminación, con criterios de puras bien establecidos, alta sensibilidad de los métodos para el control de estos parámetros . Determinación de reproducibilidad del los procesos producción

Control del producto final. Imprescindible la pureza, identidad, potencia y estabilidad del plasmido.

Ensayos clínicos. Hay evidencias de que las vacunas de ADN son seguras para ser aplicadas en seres humanos y están dirigidas en esencia a las patologías que no han tenido solución terapéutica o preventiva
Ensayos clínicos con vacunas de ADN en enfermedades infecciosas 2000

Producto	Enfermedad	Fase desarrollo	Compañía
Vacunas Prventivas ADN	Influenza	1	Merck
	Malaria	1	Pasteur
	HIV,HBV,HCV, TB, HPV	Invest/preclínica	Pasteur, Merieux
	<i>Herpes zoster, CMV H. piloris Clamidas</i>	Invest/preclínica	Vical, Merck
Vacunas Terapéuticas de ADN	HBV, HIV, HPV	Invest/preclínica	Merck

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS:

III.1 construcción de la biblioteca genómica de expresión

Cepas parasitarias

Se utilizaron epimastigotes de la cepa Y (CT-IOC 106) *T. cruzi*. (Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil.) y fueron procesados para la obtención en medio de Triptosa según Camargo y colaboradores (Camargo 1964)

Promastigotes de la cepa MHOM/77/LTB0016 de *Leishmania amazonensis* (Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil)

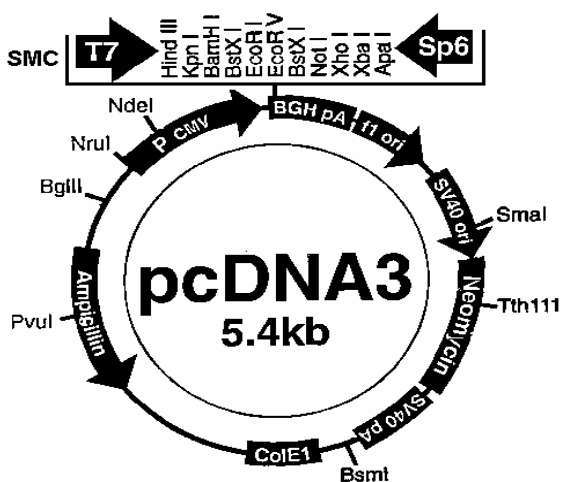
Cepas bacterianas

Escherichia coli (*E. coli*) XL-1 Blue: F' Tn10 proA⁺B⁺ lacI⁹ Δ (lacZ) M15/ recA1 endA1 gyrA96 (Naf^r) thi hsd r17 (r_k⁻m_k⁻) supE44 relA1 lac. (Stratagene).

Plásmido.

Se empleó el vector comercial pcDNA3 (Vector de expresión en células superiores) suministrado por la firma Invitrogen. Hold Madison. USA.

Plásmido pcDNA3.



- P CMV: Promotor intermedio / temprano de citomegalovirus.
- BGH pA: Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.
- SV40 pA: Señal de poliadenilación del virus SV40.
- SV40 ori: Origen de replicación del virus SV40.
- Fl ori: Origen de replicación del bacteriófago f1.
- Neo: Gen de resistencia a la neomicina.
- Amp: Gen de resistencia a la ampicilina.
- ColE1: Origen de replicación de *E. coli*.
- SMC: Sitio múltiple de clonaje.

Animales

Se emplearon ratones machos, de la línea isogénica BALB/c con un peso entre 16 y 18 gramos y 6 semanas de edad, suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Bejucal, CUBA) los cuales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad 60% con alimentación y agua *ad libitum*.

El cuidado y las manipulaciones experimentales se realizaron por el personal de la Dirección de Modelos de Animales del Instituto Finlay e IPK.

El trabajo con animales se llevó a cabo respetando todos los procedimientos experimentales con posibilidad de causar dolor o sufrimiento, respetando las normas de la ética de la investigación con animales (EEC Council Directive 86/609, OJL 1987).

Medios de Cultivo

- Medio Luria Bertaini (LB) (Sambrook et al 1989). Compuesto por Tryptona al 1 %, Cloruro de Sodio al 0.5 %, Extracto de Levadura al 0.5 %, se ajustó a pH 7.5 y se esterilizó en autoclave a 121°C , 1 atmósfera durante 20 minutos. Para el medio sólido se empleó agar técnico #1 al 1 %.(Biomeriux, France)
- Medio Infusión de Hígado-Tryptosa (Biomeriux, France) suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (Gibco) y $50\ \mu\text{g/ml}$ de Gentamicina.

Antibióticos

Se usó Tetraciclina a una concentración de $12.5\ \mu\text{g/ml}$, ampicillina a $50\ \mu\text{g/ml}$ y Gentamicina a $50\ \mu\text{g/ml}$ (Boehringer Mannheim Biochemica, Alemania).

Patrones de peso molecular

Se empleó el patrón de peso molecular (PPM) IV (Boehringer Mannheim Biochemica, Alemania) que contiene fragmentos de: 19329/ 7743/ 5526/ 4254/ 3140/ 2690/ 2322/ 1882/ 1489/ 1150/ 925/ 697/ 421/ 74 pb. Para el ensayo de Western Blot se utilizó el patrón de peso molecular (Sigma, USA) cuyo rango de peso molecular es de 14-70 KDa.

Enzimas de restricción y modificación

Se emplearon las enzimas de restricción Sau3A, Bam HI y Eco RV así como las enzimas T4 ligasa y fosfatasa alcalina, (Boehringer Mannheim Biochemica, Alemania), las cuales se usaron según las instrucciones del fabricante.

Preparación de células competentes

Se inoculó una colonia de *E. coli* XL-1 Blue en un precultivo de 5 ml de medio LB con Tetraciclina (LB_T) y se incubó a 37 °C con agitación en zaranda durante 16 horas (Incubator Shaken, Co, USA) a 200 rpm. A partir del precultivo crecido se sembró 1 µl/ml en un enermeyer con 200 ml de medio LB_T y se incubó a 37 °C con agitación en zaranda hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 leída a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro (Ultrospec III Pharmacia LKB). El cultivo se dejó reposar en baño de hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 600 x g por 30 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada (MLW K23D VEB MLW MEDIZINTECHNIK, Alemania). Después de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular fue lavado dos veces con agua destilada estéril a 4 °C y dos con glicerol al 10% (Pharmacia). Todas las centrifugaciones se realizaron con iguales condiciones a la primera. El botón celular se resuspendió en la solución de glicerol al 10% y se almacenó a -70 °C en microtubos hasta el momento de su uso (Sambrook *et al* 1989)

Purificación de ADN plasmídico por el método de Lisis Alcalina

La técnica se realizó según el método descrito por Maniatis (Sambrook *et al* 1989, Estévez y Martínez 1996). Cada clon de *E. coli* escogido es inoculado en un precultivo de LB suplementado con los antibióticos de selección escogidos y crecido a 37 °C, con agitación en zaranda durante 16 horas. Al día siguiente se centrifugó cada precultivo a 600 g a 4 °C por 10 minutos. A continuación el botón celular se resuspendió en 1mL de Tris-EDTA (TE) (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) pH 8, frío, agitando gentilmente por inversión hasta que las células estuvieran totalmente resuspendidas. Trasladamos el material a tubos de Eppendorf y centrifugamos a 1200 g. (Eppendorf, USA) durante 5 minutos, eliminamos el sobrenadante con micropipetas y resuspendimos el pellet en 100 µL de Liso I (Tris 25 mM, EDTA 1mM, Glucosa 50 mM) pH 8, frío, asegurándonos mediante pipeteo o vórtex de la completa dispersión de las células en la solución. Depositamos los viales 5 minutos en hielo y añadimos 200µL de Liso II (NaOH 0.2 M, SDS al 1%) recién preparado a temperatura ambiente, agitamos gentilmente por inversión y añadimos 150 µL de KAC 5/3 (Acetato de Potasio 5M, Ácido Acético 3M). Posteriormente se dejó reposar en hielo 5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 1200 g. Tomamos el sobrenadante sin tomar los detritus celulares y

depositamos en otro tubo. Se añadió 450 µL de fenol-cloroformo (v:v), agitamos con vortex y centrifugamos igual que la vez anterior. Seguidamente tomamos la fase acuosa, se depositó en viales nuevos y se adicionó 800 µL de etanol absoluto frío que fue agitado en vortex hasta su completa dispersión, posteriormente se dejó precipitar una hora a -20 °C. A continuación se centrifugó 15 minutos a 1400 g eliminamos el sobrenadante, lavamos el botón celular con 900µL de etanol al 70 % y se centrifugó nuevamente el mismo tiempo. Finalmente los tubos se secaron al vacío (DNA mini. Promega) durante 3 minutos. Resuspendimos el precipitado en 20 µL TE estéril y guardamos a -20 °C. Los resultados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

Obtención de antígenos solubles y citoplasmático de T. cruzi

Los epimastigotes de la cepa Y (CI-10C 106) a una concentración de 10^9 fueron mantenidos en medio de cultivo Infusión de Hígado-Triptosa, suplementado con 10% de suero fetal de ternera (Gibco) y 50 µg/mL de Gentamicina, durante siete días. Seguidamente estas células fueron recolectadas por centrifugación y el sedimento fue lavado cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato (SSTF) (NaCl 8g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.15 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L, pH 7.2) a 400 g durante diez minutos a 4°C. Posteriormente el botón celular obtenido fue resuspendido en 5 mL de SSTF y sonificado con una intensidad de 18 Hz (Soniprep 120, England) por tres veces durante 60 segundos, con intervalos de reposo de 60 segundos en hielo. Finalmente el homogenizado fue centrifugado a 1200 g durante una hora a 4°C y el sobrenadante fue distribuido en viales de 1 mL (Eppendorf) y conservado a -70°C. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al* 1951)

Purificación de ADN genómico de T. cruzi

El ADN genómico de *T. cruzi* fue obtenido de las formas epimastigóticas del parásito según el método de Hookey (Hookey y Palmer 1991). El cultivo inactivado con formaldehído tamponado al 0.5 % se centrifugó a 600 g a 4 °C durante 20 minutos (MLW K23D VEB MLW MEDIZINTECHNIK, Alemania) y el precipitado fue resuspendido en 1 mL de TE quedando a una concentración de epimastigotes de 10^9 /ml. Estas células se volvieron a resuspender y a centrifugar en iguales condiciones y fue resuspendido nuevamente en tampón lisis e incubados dos horas a 56 °C. Seguidamente se procedió a realizar varias extracciones del ADN con iguales volúmenes de fenol-cloroformo (v:v) hasta que la interfase se hizo imperceptible. Se procedió a precipitar con un décimo del volumen de acetato de sodio y dos volúmenes

de etanol absoluto. El sedimento obtenido fue resuspendido en tampón TE estéril que se dejó toda la noche. La integridad del ADN obtenido fue determinada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

Electroforesis en gel de agarosa

Se llevó a cabo según el protocolo propuesto (Sambrook *et al* 1989, Estévez y Martínez 1996). Los geles de agarosa se prepararon al 0.8 % utilizando agarosa NA (Pharmacia) y tampón de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) (Tris base 0.004 M, ácido bórico 0.01 M, EDTA 0.5 M), pH 8, adicionándole bromuro de etidio a una concentración final de 5 $\mu\text{L}/100\text{mL}$. Las muestras fueron mezcladas con tampón muestra (Bromofenol azul 0.25 %, Sacarosa en agua 40 % (p/v)) en una relación 1:6 (v:v). Se prefijó el voltaje de la fuente (modelo EPS 400/500, Pharmacia) entre 1 y 5 Voltios por centímetro (cm) de distancia entre los electrodos. Las bandas fueron visualizadas como una fluorescencia amarillo-naranja en un transiluminador (IBI Ultralinker 400, Eastman Chemical Co.).

Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN se determinó con un cuantificador automático de ADN y ARN, Gene Quant (Pharmacia Biotech England) (Sambrook *et al* 1989, Estévez y Martínez 1996).

Digestiones analíticas

En todas las digestiones las enzimas de restricción se utilizaron a una concentración de 1 U/ μg de ADN, los tampones empleados fueron los recomendados para la máxima actividad enzimática y la concentración del ADN fue de 50-100 ng/ μL en volúmenes finales de 20 μL . Las mezclas de reacción fueron incubadas en baño térmico durante una hora a 37 °C.

Digestiones preparativas

Las digestiones preparativas se realizaron en las mismas condiciones que las analíticas pero con sus componentes en mayor cantidad. Se digirieron 10 μg de ADN genómico de *T. cruzi* con la enzima Sau3A. La talla de los fragmentos obtenidos fue comprobada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % utilizando el patrón de peso molecular (PPM) IV. Se digirieron 10 μg del vector con la enzima BamH 1 comprobándose el resultado de la digestión por medio de una electroforesis de agarosa al 0.8% de la misma manera. Fueron resuspendidos en un volumen final de 30 μL y 40 μL el vector y el ADN respectivamente.

Desfosforilación de los extremos 5' del vector

La reacción de desfosforilación se llevó a cabo en un volumen final de 100 µL. Se empleó 1 U de enzima fosfatasa alcalina, por cada 50 pmol de extremos a desfosforilar del plásmido pcDNA3. La mezcla de la reacción se incubó a 37 °C durante una hora.

Reacción de ligamiento

Se tomaron fragmentos de ADN genómico de *T. cruzi* y del plásmido pcDNA3 que había sido previamente desfosforilado. Los fragmentos a ligar en cada caso fueron colocados en tubos de microcentrífuga con una relación vector-inserto de 1:3. Las reacciones de ligamiento fueron realizadas empleando 1 U de T4 DNA ligasa en 10 µL de volumen final a temperatura de 14 °C durante 16 horas. Finalmente la ligasa fue inactivada en un baño de María a 65 °C durante 10 minutos.

Electroporación

Las cubetas de electroporación fueron enfriadas previamente; mientras se descongelaban las células competentes en hielo. Se añadieron 80 µL de células en la cubeta más 20 ng del plásmido o la mezcla de ligamiento libre de sales. Posterior a este paso se le dio el pulso eléctrico con los parámetros reportados para *E. coli* (2500 Volt; 21 µF y 400 Ω) (IBI Gene Zapper 450/2500 Cat No 9100). Se adicionó entonces suavemente 1 mL de LB y se dejó crecer durante una hora a 37 °C; a 80 r.p.m. y esta mezcla se sembró en medio sólido o líquido suplementado con los antibióticos de selección.

Determinación de la proporción de recombinantes

Para la determinación de los recombinantes presentes en la biblioteca se sembraron en una placa de LB_A 20µL de la transformación y se seleccionaron al azar 50 colonias obteniéndose el ADN plasmídico por el método de lisis alcalina, el ADN de las diferentes colonias fué sometido a una digestión con la enzima EcoRV, posteriormente se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidium, utilizando como control el plásmido pcDNA3 digerido con la misma enzima. El gel fue fotografiado con una cámara fotográfica Polaroid (Kodak). El porcentaje de recombinantes se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Porcentaje de recombinantes} = \frac{\text{Número de clones recombinantes}}{\text{Número de colonias ensayadas}} \times 100$$

Purificación masiva de ADN plasmídico

Para llevar a cabo la purificación de la biblioteca genómica se sembraron los 980 µl restantes de las células electroporadas en un volumen de 500 ml del medio LB con el antibiótico de selección (ampicilina) (LB_A) y se dejó crecer a 37 °C en Zaranda durante 16 horas a 150 r.p.m. Posteriormente se centrifugó a 1200 g por 10 minutos, a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 mL de tampón lisis (Tris HCL 100 mM, pH 8, EDTA 100mM, SDS 2 %, NaCL 150 mM y proteinasa K 200 µg/mL) y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó 20 mL de liso II, se mezcló gentilmente por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos. A continuación se adicionó 18.7 µL de solución de KAC 5 M 5/3, pH 4.8, mezclando cuidadosamente y se mantuvo 20 minutos en hielo. Nuevamente se centrifugó, esta vez durante 15 minutos a 1200 g a 4 °C. Posteriormente se añadió 0.6 del volumen de isopropanol y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 1500 g a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante y se resuspendió en 500 µL de TE, luego se adicionó 3 µL de RNAasa (10 µg/µL) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se añadió igual volumen de fenolcloroformo (v:v) mezclando con ayuda de vortex, y se centrifugó nuevamente a 10000 r.p.m. por 10 minutos, este paso se repitió dos veces, tomando en cada uno la fase acuosa y desechando el resto. Se realizó un lavado con cloroformo isoamílico 24:1 y a continuación se llevó a cabo una precipitación con etanol absoluto a -20 °C por una hora. Finalmente se centrifugó a 1500 g por 15 minutos y se desechó el sobrenadante. El botón de ADN se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó en iguales condiciones y el sedimento se secó al vacío durante 5 minutos (DNA mini. Promega) y se resuspendió en 1 mL de agua destilada. Se realizó la lectura a 260 nm y 280 nm de una dilución adecuada del ADN obtenido en un espectrofotómetro (Ultrospec III Pharmacia LKB) para calcular la concentración y grado de pureza del mismo (Sambrook *et al* 1989)

III.2 estudio de la inmunogenicidad humoral y celular posterior a la administración de la biblioteca de expresión de *T.cruzi*

Esquema de inmunización.

Los animales fueron divididos en 5 grupos:

- L: Grupo inmunizado con la biblioteca genómica de *T. cruzi* (n = 30).
- T: Grupo inmunizado con antígenos solubles de *T. cruzi*. (n=16)
- P: Grupo inmunizado con el plásmido pcDNA3 (n =16).
- G: Grupo inmunizado con ADN genómico de *T. cruzi* (n = 16).
- C: Grupo no inmunizado (n = 16).

Dosis y vía de administración

Se administraron 25 µg de inóculo en 0.1 mL de solución salina al 0.9%, por vía intramuscular, en la región anterior de la pata trasera derecha, con excepción del grupo C que no fue inmunizado

Reinmunizaciones y obtención de las muestras

Fueron reinmunizados 10 animales del grupo L, de los cuales 5 recibieron 25 µg (L2) y el resto 50 µg (L3) de la biblioteca, por la misma vía y región. El resto de los animales de este grupo no fueron reinmunizados (L1). Se reinmunizaron además 5 animales del grupo T con una dosis de 25 µg por la misma vía y región (T2), el resto de los animales de este grupo no se reinmunizaron (T1).

Se inmunizaron adicionalmente 2 animales más de los grupos L,T,P,G para determinar la expresión de antígenos específicos en el tejido muscular por IFI, a los siete días de inoculados.

A cinco animales de cada grupo se les extrajo sangre del seno retroorbital con capilares de vidrio heparinizados, semanalmente durante las cinco primeras semanas post-inmunización, realizándose una extracción adicional en la sexta semana. A los grupos L2 y L3 sólo se les extrajo sangre en la sexta semana, a los 15 días de realizada la reinmunización.

Los sueros se obtuvieron por centrifugación a 400 g x a 4°C y fueron utilizados para la determinación de la inmunogenicidad humoral (ELISA y Western blot en la sexta semana) y para los estudios de autoinmunidad (IFI y ELISA).

Dos animales de los grupos L1, T, P, G y C fueron sacrificados doce semanas después del inicio del esquema de inmunización para realizar los estudios de inmunogenicidad celular (Ensayo de Linfoproliferación)

En la sexta semana, diez ratones de los grupos L, T, P y C fueron retados con la cepa “Y” *T. cruzi*, activada su virulencia por pases en ratones BALB/c.

III.2.1 ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el estudio de la respuesta de anticuerpos específicos en el suero de los animales inmunizados.

Se utilizó la misma metodología descrita para un método indirecto cualitativo (Ross y Novoa –Montero 1993). Se usaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Maxi-sorp, Nunc) las cuales se recubrieron con 100 µL/pozo de antígenos solubles de *T. cruzi* a una concentración de 5 µg/mL, disuelto en solución carbonato-bicarbonato 0.1M, pH 9.6 y se mantuvo en incubación durante 16 horas a 4°C en

cámara húmeda. Posteriormente se bloqueó con leche descremada al 3% (Oxoid) disuelta en SSTF (100 μ L/pozo) durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda, se lavó tres veces con SSTF-Tween 20 (0.05%) en un lavador de placas (Denley Well Wash 4), se añadió por duplicado el suero de los ratones diluido 1/200 con SSTF-Tween 20 (100 μ L/pozo) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación se lavó ocho veces en iguales condiciones y se depositaron 100 μ L/pozo de un conjugado anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) de ratón, obtenido en conejo, marcado con peroxidasa (Sigma) a una dilución de trabajo de 1/2000 y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de un nuevo lavado se añadieron 100 μ L/pozo de sustrato ortofenilendiamina (Sigma) diluido en tampón fosfato citrato 0.15 M, pH 5. Nuevamente se incubó 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y posteriormente la reacción se detuvo con ácido sulfúrico al 12.5% y se leyó en un espectrofotómetro (Flow Laboratories Inc. MV Lyon, Va) a una longitud de onda de 492 nm. Se calculó las medias de la densidades ópticas obtenidas para cada grupo

III.2.2 determinación de la respuesta de anticuerpos específicos mediante la técnica del Western Blot

Se siguió la metodología descrita por Tsang y colaboradores (Tsang *et al* 1983). Las proteínas totales de *T. cruzi* fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE, en una cámara electroforética Bio Rad, USA acoplada a una fuente Multidrive, Pharmacia (Suecia) preparando para ello las muestras en condiciones desnaturalizantes con 2-mercaptoetanol y calentándolas en baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas electroforéticamente de acuerdo a sus respectivos pesos moleculares; para ello se empleó un gel al 12.5 % de acrilamida, realizando la electroforesis a un voltaje constante de 120 Volts El patrón de peso molecular empleado en la electroforesis fue el juego de marcadores cuyo rango de peso molecular es de 14-70 KD, (Sigma, USA) y el cual fue sometido a las mismas condiciones de las muestras. la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa se realizó utilizando un equipo de transferencia húmedo (Bio Rad, USA) y tampón Tris 25mM-Glicina 125 mM pH-8.2, conteniendo un 20 % de metanol y aplicando una corriente de 300 mA durante una hora. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche descremada al 2 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave en zaranda (Janke & Kumkel IKA-Labortechnik, RDA.) Se cortaron las tiras correspondientes a cada uno de los puntos de aplicación, con el objetivo de incubar por separado cada una de las muestras de suero de los cuatro grupos contemplados en el esquema de inmunización. Las muestras de suero se diluyeron 1/100 en solución de leche descremada al 1 %, incubándose dos horas a temperatura ambiente con agitación en suave. Seguidamente se realizaron tres lavados con PBS y se incubó una hora con un

conjugado anti-inmunoglobulina G a una dilución de 1/2000, seguidamente se realizaron otros tres lavados con PBS y se reveló utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato y 4-cloro-1-naftol (Sigma) como elemento cromógeno. Transcurridos 15 minutos la reacción se detuvo lavando las tiras de nitrocelulosa con agua destilada.

III.2.3 estudio de la inmunogenicidad celular.

Se utilizó el procedimiento descrito por Wu y colaboradores (Wu *et al* 1991). A dos animales de cada grupo, con excepción de los grupos L2 y L3 se les extrajo el bazo en condiciones estériles el cual fue macerado para obtener los linfocitos. Estos últimos se resuspendieron en 10 mL de solución Hanks (Sigma) y se centrifugaron a 300 g x durante diez minutos a 4°C, posteriormente se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue sometido a un choque osmótico con solución lisante (Cloruro de Amonio al 0.83%) durante 15 minutos, en baño de hielo, para eliminar los hematíes en el botón celular. Seguidamente se realizaron dos lavados con solución Hanks a 300 g x durante 10 minutos y finalmente las células se resuspendieron en 2 mL de medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementado (Gibco) y 50 µg/mL de gentamicina (Sigma Chemical.Co). La viabilidad fue determinada empleando la tinción vital de Tripán azul al 0.1%. Las células se contaron en cámara de Neubauer utilizando la tinción de Turk violeta a una dilución 1/20, ajustando las mismas a 1×10^6 células por mililitro en medio RPMI 1640. Se depositaron 100 µL/pozo de la suspensión celular ajustada en placas de poliestireno de 96 pozos con fondo U (Costar) y las células fueron incubadas con 0.1 µg/mL de antígenos solubles de *T. cruzi*. Cada ensayo se realizó por triplicado. Para determinar la síntesis espontánea se cultivaron las células solamente con medio de ensayo. Seguidamente, se incubaron las placas durante 6 días en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y se añadió seis horas antes de concluir este tiempo 1 µCi por pozo de timidina tritiada (Amersham, U.K.). Se detuvo el cultivo por congelación a -70°C y después de descongelar las células, se cosecharon en una membrana de lana de vidrio utilizando un cosechador automático (Titertek).

Se depositaron las membranas en el orden correspondiente en viales de centelleo con 2.5 mL de líquido de centelleo (Scintran[®], BDH) y se midió la incorporación de timidina en un contador beta de centelleo líquido (LKB, Suecia), determinándose el índice de estimulación mediante la razón de la media de los conteos por minuto de los cultivos estimulados y no estimulados

III.3 inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar la expresión de antígenos de *T.cruzi* en el músculo esquelético de los ratones BALB/c inmunizados

Seguimos la metodología descrita por Ross y Novoa–Montero (Ross y Novoa –Montero 1993). A los siete días de la primera inmunización, se sacrificaron, por dislocación cervical, diez ratones BALB/c, dos de cada grupo, para obtener muestras de tejido muscular del sitio inoculado, se realizaron cortes por congelación de aproximadamente 4 µm de espesor, con un criostato (Friostat Lentz). Los cortes de tejido se adhirieron en láminas porta-objetos y se dejaron secar al aire 60 minutos. Posteriormente se fijaron en acetona fría (4°C) durante 10 minutos, se dejaron secar y se añadieron 50 µL de una mezcla de sueros humanos de alto título anti *T. cruzi*, procedentes de pacientes con tripanosomiasis de áreas endémicas de esta parasitosis, a una dilución de 1/20 en SSTF, realizándose una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron tres veces por cinco minutos con SSTF y se pusieron a secar con aire frío. A continuación se depositaron 50 µL de un conjugado de inmunoglobulinas de conejo anti IgG humanas marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma), diluido 1/20 en SSTF, conteniendo azul de Evans (1/1000) y se incubó nuevamente durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Se realizaron tres lavados similares a los anteriores, se depositó una gota de glicerina fosfatada y se colocó el cubre-objeto. La evaluación de la expresión antigénica se realizó mediante la observación de los cortes de tejido en un microscopio de fluorescencia (Wild-Leitz, Heerbrugg, Switzerland) equipado con lámpara HBO 500 watts CAC y con un lente de 25X de inmersión en aceite. Las láminas fueron fotografiadas con un equipo acoplado al microscopio.

III.4 estudio de la capacidad protectora de la administración de una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*

El reto se realizó con tripomastigotes metacíclicos (forma infectante) de la cepa “Y” de *T. cruzi*. La virulencia del parásito fue activada por pases sucesivos en ratones BALB/c en el laboratorio de parasitología del IPK. Después del último pase a seis animales infectados con la cepa virulenta del parásito se les extrajo sangre del seno retroorbital con capilares de vidrio heparinizados. Los tripomastigotes se lavaron con SSF por centrifugación a 1200 g x durante 10 minutos y el botón celular se resuspendió en 2 mL de solución salina fisiológica SSF. La concentración de esta suspensión de parásitos fue determinada por conteo en cámara de Neubauer para, a partir de esta, realizar una dilución de manera tal que al administrar 0.050 mL de la suspensión resultante se inocularan a 5×10^6 parásitos la cual

constituye la dosis letal media (DL₅₀). Una vez retados todos los grupos inmunizados y no inmunizados, todos los ratones fueron observados diariamente registrándose la mortalidad por día (Kirchhoff 1990).

III.5 estudio de la capacidad protectora de la inmunización de ratones BALB/c con la biblioteca genómica de *T cruzi* al reto con promastigotes de *Leishmania amazonensis*

Para el estudio de capacidad protectora cruzada frente al reto con promastigotes de la cepa MHOM/77/LTB0016 de *Leishmania amazonensis* (Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro Brasil) se inmunizaron animales igual que los grupos L y P utilizando un grupo control no inmunizado y fueron retados a las seis semanas del inicio del experimento con la cepa de estudio con la virulencia activada. Se utilizó un cultivo de cinco días, lavado por centrifugación a 1200 g x durante 10 minutos, el pellet se resuspendió en 2 ml de SSF estéril. Finalmente, la concentración de esta suspensión fue preparada mediante conteo en cámara de Neubauer para, a partir de esta, realizar una dilución de manera tal que al administrar 0.05 ml de la suspensión resultante se inocularon 5×10^6 promastigotes por animal, dosis considerada como letal (DL 50). La inoculación se realizó subcutáneamente en los cojinetes plantares de la extremidad posterior derecha de los ratones. Los animales se distribuyeron de forma aleatoria y se identificaron individualmente. Semanalmente se determinó el tamaño de las lesiones durante 10 semanas. Para ello se midieron las patas en sentido dorsoventral con un cutímetro y el cálculo se realizó, entre el cojinete infectado y el no infectado. Los incrementos de tamaño de las lesiones fueron calculados desde la cuarta semana de infectados los animales hasta cada evaluación realizada (Koberle 1974)

III.6 determinación de respuestas autoinmunes

A los sueros obtenidos de los grupos L,P,G,T y C se les realizó la determinación de anticuerpos anti ADN de doble y simple cadena, anticuerpos anti músculo cardíaco y de Factor Reumatoideo de tipo IgG, mediante el método de ELISA, así como se le realizó la determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta.

III.6.1 determinación de anticuerpos anti ADN de doble cadena

Se utilizó un ELISA cualitativo de tipo indirecto para la detección de anticuerpos (García 1995). Se utilizaron placas de polivinilchloride (PVC) Titertek (Flow Laboratories) de 96 pocillos. La poli-L lisina (Sigma) diluida en Solución Salina tamponada con fosfato (SSTF) (NaCl, 54mM; K₂HPO₄, 1.9mM; Na₂HPO₄ 8.1 mM; KCL, 5.4 mM) pH 7.2 a concentración de 5 µg/mL, se aplicó en un volumen de 100

μL por pocillo y se incubó a 37°C en cámara húmeda y a continuación se lavó tres veces con solución de lavado SSTF pH 7.2

Se utilizó ADN para el recubrimiento (timo de ternera. Merck), a una concentración de $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$, el cual fue previamente filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa con poro de 0,45 micras (Sartorius). Se añadió $100\ \mu\text{L}$ de la solución por pocillo y se incubó toda la noche a 4°C en atmósfera húmeda. A continuación se procedió a lavar en las mismas condiciones.

Las muestras se diluyeron 1:100 en el diluyente SSTF Tween 20 al 0.05% + suero de caballo al 5% y se depositaron $100\ \mu\text{L}$ por pocillo y por duplicado. Se incubaron a 1 hora a 37°C , en cámara húmeda y se procedió luego a lavar tres veces con lavador automático (Organon Teknica), programándose por tres ciclos con SSTF Tween 20 al 0.05%.

Se utilizó como segundo anticuerpo una anti-inmunoglobulina G (anti IgG) de ratón marcado con fosfatasa alcalina (Sigma), obtenida en conejo a una dilución de 1:8000. El diluyente empleado fue el mismo utilizado en las muestras. Se depositaron $100\ \mu\text{L}$ por pocillo y se incubó 1 hora a 37°C . Se realizaron tres lavados iguales a los descritos para las muestras.

Como sustrato se utilizó el parnitrofenilfosfato (PNFP), 10 mg en 10 mL de Buffer de dietanolamina, a razón de $100\ \mu\text{L}$ por pocillo y se incubó en cámara oscura durante 30 min. a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con hidróxido de sodio 3N, $50\ \mu\text{L}$ por pocillo. La lectura de los resultados se efectuó en un Espectrofotómetro modelo Reader MicroELISA System (Organon-Teknika) a una longitud de onda de 405 nm. Se consideró como valor de corte la media más 2 desviaciones estándar de los valores obtenidos en el grupo control negativos.

III.6.2 determinación de anticuerpos anti ADN de simple cadena

Se utilizó la misma metodología para la determinación de anticuerpos anti ADN que la utilizada para la determinación de los anticuerpos anti-ADN de doble cadena, excepto que el ADN fue calentado a 100°C durante 15 minutos para su desnaturalización y luego enfriado rápidamente en una solución de SSTF pH 7.2 y en lugar del suero de caballo al 5% se utilizó como diluyente de las muestras y del conjugado SSTF - albúmina sérica bovina al 2%-Tween 0.05%.

III.6.3 determinación de anticuerpos antinucleares

Se realizó mediante Inmunofluorescencia Indirecta, utilizando como sustrato hepatocitos provenientes de una suspensión celular de hígado de rata (Kreamer *et al* 1986). Brevemente, se extrajo el hígado de una

rata Wistar de 250 gramos (CENPALAB) anestesiada con éter, el mismo se lavó varias veces con solución salina fisiológica fría. Posteriormente se realizaron los cortes de hígado, tomando las porciones más externas, respetando las porciones centrales que son vascularizadas. Se maceraron los fragmentos añadiendo poco a poco el SSTF pH 7.2, con suero fetal de ternera al 7%. Se filtró por una gasa simple luego a través de una rejilla de acero con gasa doble y nuevamente por la gasa doble.

Se aislaron los hepatocitos mediante un gradiente de Ficoll Telebrix $d = 1.080$ por centrifugación a 400 gravedades durante 20 minutos, se extrajo el anillo que contienen los hepatocitos de la interfase. Se realizaron dos lavados de 5 minutos a 170 g x con SSTF-suero fetal bovino 7%. Se realizó conteo en cámara de Neubauer y se ajustaron las células a 5 millones por mL. Se añadieron $10 \mu\text{L}$ en cada pocillo de la lámina portaobjetos y se dejó secar. Luego se fijaron las láminas con acetona fría y se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Los sueros de los ratones se diluyeron 1:10 en solución salina tamponada con fosfato pH 7.2. Se incubaron con los hepatocitos durante 30 minutos. Como anticuerpo revelador se utilizó una anti-inmunoglobulina G de ratón obtenida en conejo y marcada con isotiocianato de fluoresceína (Centro de Inmunología Molecular, Cuba) diluida 1:50 en SSTF.

Las láminas se observaron en lente de inmersión en aceite, con un aumento de 1000 en un microscopio equipado para epifluorescencia (Carl Zeiss Jena). Se consideraron positivas las muestras que presentaron fluorescencia nuclear que correspondiera al menos con uno de los patrones descritos (Difuso, Granular, Núcleolar y Homogéneo) (Tan 1982, Tan 1984)

III.6.4 determinación de anticuerpos contra músculo cardíaco

Se siguió la misma metodología utilizada para el ensayo de IFI, pero los cortes de tejidos fueron realizados a corazones de ratones normales; se realizaron cortes por congelación de aproximadamente $4 \mu\text{m}$ de espesor, con un criostato (Friostat Lentz). Los cortes de tejido se adhirieron a láminas porta-objetos y se dejaron secar al aire 60 minutos. Posteriormente se fijaron en acetona fría (4°C) durante 10 minutos, a continuación, fueron enfrentados con el suero de los ratones de los diferentes grupos a una dilución de $\frac{1}{2}$ diluidos en SSTF durante 30 minutos a 37°C y luego fueron incubados por el mismo tiempo con el segundo anticuerpo unido a la fluoresceína $\frac{1}{20}$ diluido en SSTF y fueron revelados en la misma forma descrita con anterioridad

III.6.5 determinación del factor reumatoideo

Se realizó según el método Sánchez (Sánchez 1995). Se utilizaron placas de 96 pocillos de polivinylchloride PVC (Titertek Flow Laboratories).

Se recubrieron las placas con IgG de conejo, purificada con el uso de Proteína A de *Stafilococo aureus*, a 10 µg/mL, diluida en buffer carbonato (Na_2CO_3 , 0.015M; NaHCO_3 , 0.035M; NaN_3 , 0.0031M) a pH 9.6. Se aplicaron 100 µL por pocillo y se incubó durante toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Se procedió a lavar en un lavador automático (Organon Teknika), programándose por tres ciclos cada uno, posteriormente la placa se sacudió sobre el papel absorbente. Se utilizó como solución de lavado SSTF Tween 20 al 0.05%. Se bloqueó con SSTF leche descremada al 2% a 100 µL. Se incubó 1 hora a 37°C y se realizó lavado igual.

Las muestras fueron diluidas 1:100, utilizando como diluyente SSTF Tween 20 al 0.05% con albúmina sérica bovina al 2%. Se depositaron 100 µL de las muestras. Se utilizó un conjugado antiinmunoglobulina G de ratón (Sigma) obtenida en chivo, marcada con peroxidasa, a una dilución de 1/10000 en el mismo diluyente de la muestras. Se depositaron 100 µL por pocillos y se incubó a 1 hora a 37°C. Y se volvió a lavar en las mismas condiciones.

Como sustrato se utilizó el peróxido de hidrógeno a 0.024 %, 10 µL, y como cromógeno la orto fenilendiamina (OPD), en buffer citrato fosfato (ácido cítrico 53 mM, Na_2HPO_4 1M) pH 5, 100 µL por pozos y se incubó a 1 hora a 37°C. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico al 12.5%

En el valor de corte se utilizaron los valores de densidades ópticas del grupo no inmunizado. Se determinaron los valores de las medias y la desviación estándar de las densidades ópticas. Se consideraron positivos los valores dos veces superiores que la media de los negativos.

III.7 procesamiento estadístico.

Para el procesamiento estadístico de los resultados obtenidos con el método de ELISA al estudiar los sueros de los animales inmunizados con la biblioteca de expresión, se realizó un Análisis de la Varianza de Clasificación Simple (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey's para determinar los pares significativos. Para el estudio del reto la variable que estudiamos es el tiempo de sobrevida de cada sujeto dentro de cada grupo. Para la comparación de los grupos el test usado fue el de Extensión de Gehan, Peto y long-rank para varias muestras.

En el experimento de reto con *Leishmania amazonensis* los incrementos de tamaño de las lesiones fueron calculados desde la cuarta semana de infectados los animales hasta cada evaluación realizada, las medidas se compararon por análisis de varianza de clasificación doble con mediciones repetidas (Statistica para Windows versión 4.2 del año 1993)

CAPITULO IV.- RESULTADOS

IV.1 construcción de la biblioteca genómica de expresión

En la figura 1 (B- G) se muestran los resultados de las digestiones analíticas realizadas al ADN genómico purificado a partir de *T. cruzi* con la enzima Sau3A y los patrones de bandas que se obtuvieron a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos respectivamente). El patrón de peso molecular empleado permitió estimar que las tallas de los fragmentos obtenidos se encontraban en un rango de 5 - 1.8 Kb. En corridas electroforéticas anteriores pudimos observar la integridad total del ADN genómico sin digerir, lo que nos indicó la ausencia total de nucleasas inespecíficas en la preparación.

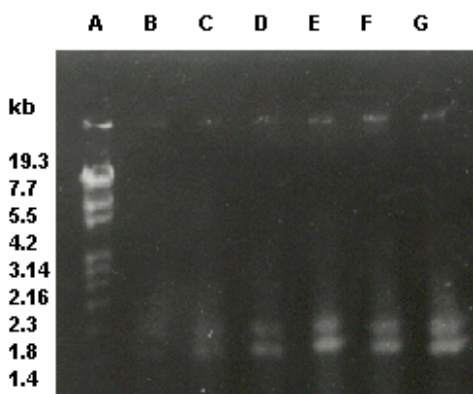


figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Análisis de restricción del ADN genómico de *Trypanosoma cruzi*. Se empleó Sau3A a diferentes tiempos de incubación a 37°C. A. Patrón de peso molecular. (B, C, D, E, F y G) Tiempos de incubación con la enzima 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos respectivamente.

La figura 2 nos muestra el resultado de la purificación del plásmido pcDNA3. Esta purificación fue analizada en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. En la misma se pueden detallar las configuraciones correspondientes al plásmido nativo con predominio de la forma superenrollada y ausencia de ARN (Línea B). Una muestra de las digestiones realizadas con la enzima Bam HI durante la preparación de los vectores para la construcción de la biblioteca puede ser observado también (Líneas C, D) donde se observa la banda correspondiente al vector linealizado (5,446 Kb). La línea D corresponde al resultado de la desfosforilación con la enzima fosfatasa alcalina, encargada de impedir la recircularización de los plásmidos, al eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5'. A pesar de haber aplicado una cantidad apreciable de ADN digerido, no se observaron signos de degradación ni bandas por encima del vector, lo que indica una digestión total. La línea A se corresponde con el patrón de peso molecular

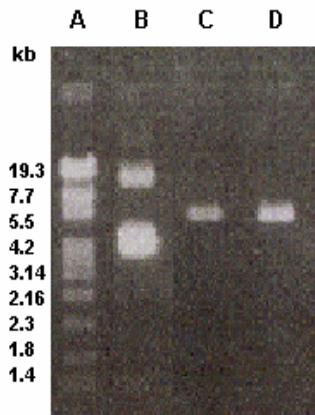


figura 2. Electroforesis en gel de Agarosa 0.8 %. A. patrón de peso molecular. B. pcDNA3 nativo. C. pcDNA3 digerido con BamHI. D. pcDNA3 digerido con BamHI y desfosforilado.

En la figura 3 se observa el resultado obtenido del análisis de restricción realizado con la enzima EcoRV a los plásmidos purificados a partir de los transformantes obtenidos después de la transformación genética de *E. coli* con la biblioteca genómica; como resultado de este experimento se observaron 8 clones con insertos de ADN de *T. cruzi* entre los 10 clones seleccionados (80 %) Líneas (4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13). Todos los clones recombinantes analizados en este caso muestran bandas con tallas mayores y menores que el vector digerido (Línea 2) utilizado como control. El resto de las bandas de plásmido digeridos se mantienen a nivel del vector y parecen corresponder con clones no recombinantes (Línea 5 y 12).

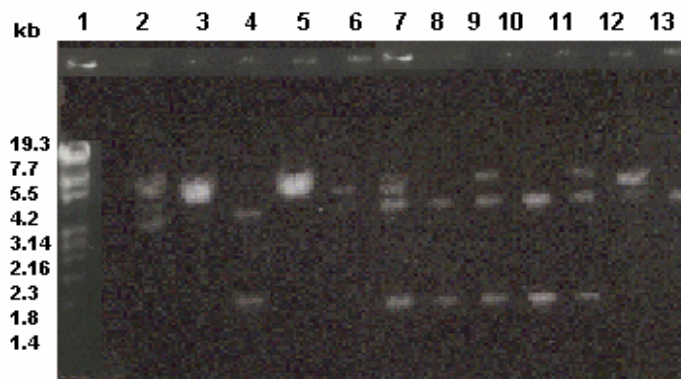


figura 3. Análisis de restricción con la enzima EcoRV de los plásmidos purificados de los transformantes obtenidos. 1. Patrón de PM. 2. Plásmido en su forma nativa. 3. Plásmido pcDNA3 digerido con la enzima EcoRV. 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13. Plásmidos digeridos con EcoRV y con insertos ADN de *T. cruzi*. 5 y 12. Clones no recombinantes

IV.2 estudio de la inmunogenicidad humoral y celular desarrollada por la administración de una biblioteca genómica de *T. cruzi*

IV.2.1 ELISA para determinar la respuesta de anticuerpos específicos en ratones Inmunizados con la biblioteca genómica de expresión contra *T. cruzi*

En las determinaciones realizadas hasta la cuarta semana post-inmunización no se obtuvieron diferencias significativas en la producción de anticuerpos específicos por los animales inmunizados con la biblioteca genómica al compararlo con los demás grupos. Sólo se obtuvo un aumento significativo de anticuerpos específicos en el grupo inmunizado con antígenos de *T. cruzi* ($p < 0.05$) (Datos no mostrados).

En la sexta semana post-inmunización se observó un aumento significativo en la producción de anticuerpos específicos en el grupo reinmunizado con 50 μg de la biblioteca genómica, con respecto al grupo que recibió una dosis de la librería genómica de expresión y al no inmunizado ($p < 0.05$). Los animales inmunizados con antígenos de *T. cruzi* mostraron un aumento significativo de anticuerpos específicos con respecto a los demás grupos, con excepción del grupo reinmunizado con 50 μg de la biblioteca genómica ($p < 0.05$) (figura 4).

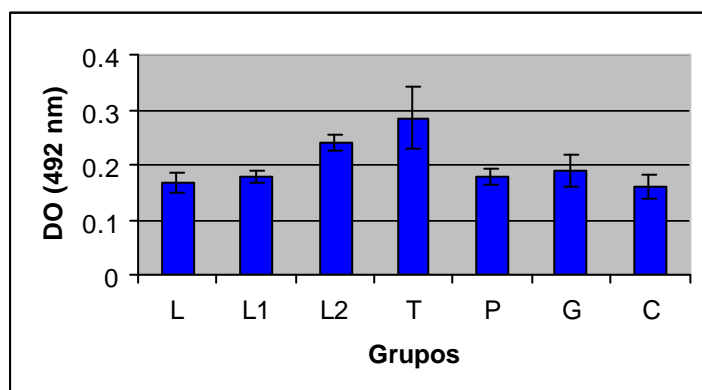


figura 4. Respuesta de anticuerpos IgG específicos contra antígenos solubles de *Trypanosoma cruzi* en la sexta semana post-inmunización (ELISA). Media de las densidades ópticas 492 nm y valores de Desviación Standard. L: Grupo inmunizado con una dosis de la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* (0.167; 0.0187) L1: Grupo reinmunizado con 25 μg de librería de expresión de *T. cruzi* (0.178; 0.0099) L2: Grupo reinmunizado con 50 μg de la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* (0.218; 0.0135) G: Grupo inmunizado con ADN genómico (0.189; 0.0286) P: Grupo inmunizado con el plásmido pcDNA3 (0.177; 0.0152): T: Grupo inmunizado con una dosis de antígenos solubles de *T. cruzi* (0.284; 0.0564) C: Grupo no inmunizado (0.159; 0.0212)

IV.2.2 determinación de la respuesta de anticuerpos específicos mediante la técnica de Western blot

Los resultados obtenidos en la evaluación de la respuesta inmune humoral frente a antígenos solubles de *T. cruzi* con la utilización del método de Western blot dos semanas después de la tercera inmunización (figura 5), mostraron el reconocimiento de diferentes bandas con tallas que oscilaron en un rango aproximado entre 55 hasta 25 KDa, por el suero de los animales inmunizados con la biblioteca genómica (L1, L2, L3, L4, L5). Todos los animales reconocieron una banda de aproximadamente 55 Kda. Algunos animales en los grupos (L1 y L3) además, una banda de aproximadamente 45 Kda. Mientras que un animal reconoció adicionalmente una banda con talla aproximada de 25 KDa. Al analizar la respuesta del suero de los animales inmunizados con el vector y del suero de los animales no inmunizados considerados ambos grupos como controles negativos, no observamos reactividad de los mismos. Como era de esperar, los sueros de los animales inmunizados con los antígenos solubles de *T. cruzi* fueron reactivos reconociendo una diversidad de bandas correspondientes a un amplio rango de pesos moleculares (C+)

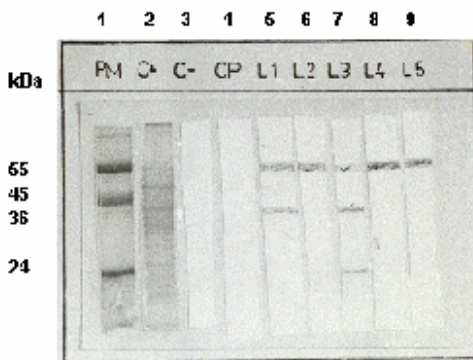


figura 5. Western blot. Reactividad de suero de animales inmunizados con antígenos solubles de *T. cruzi*. 1. Patrón de PM. 2. Suero de ratones inmunizados con antígenos solubles del parásito. 3. Suero de ratones no inmunizados 4. Suero de ratones inmunizados con el plásmido pcDNA3. 5-9. Suero de los ratones inmunizados con la biblioteca genómica

IV.2.3 Estudio de la inmunogenicidad celular.

La respuesta celular frente a antígenos solubles de *T. cruzi* se muestra en la figura 6, donde se pueden observar diferencias en la respuesta linfoproliferativa entre los diferentes grupos evaluados. Los dos animales inmunizados con antígenos solubles de *T. cruzi* mostraron índices de estimulación positivos, al igual que uno de los animales del grupo inmunizado con la biblioteca de expresión. El resto de los animales, pertenecientes a los diferentes grupos, mostraron valores negativos (IE < 2)

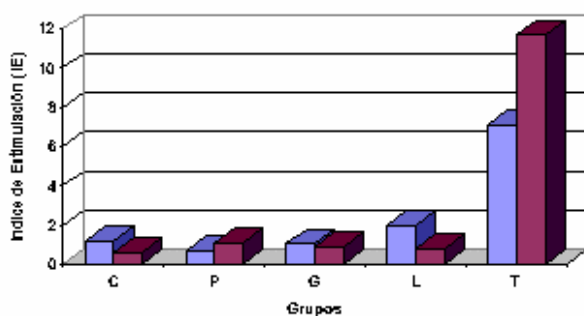
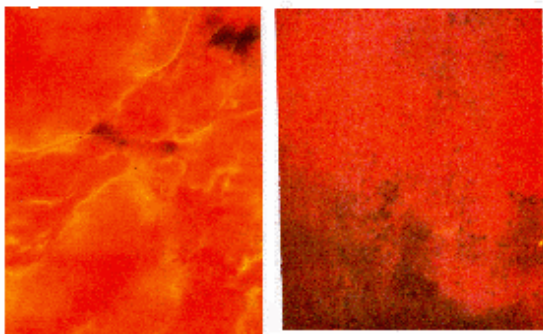


figura 6. Respuesta linfoproliferativa contra antígenos solubles de *Trypanosoma cruzi*. L: Grupo inmunizado con una dosis de la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*. T: Grupo inmunizado con una dosis de antígenos solubles de *T. cruzi*. P: Grupo inmunizado con el plásmido pcDNA3. G: Grupo inmunizado con ADN genómico. C: Grupo no inmunizado

IV.3 inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar la expresión de antígenos de *T.cruzi* en el músculo de los animales inmunizados

La expresión de los antígenos de *T. cruzi* fue positiva en los cortes de tejido muscular obtenidas de los animales inmunizados con la biblioteca genómica de expresión del parásito (figura 7 A). Se observó ausencia de expresión en los animales inmunizados con el plásmido pcDNA3 (7 B). Resultados similares al grupo inmunizado con el plásmido, se observaron en los grupos inmunizados con ADN genómico, antígenos solubles de *T. cruzi* y en el grupo no inmunizado.



A

B

figura 7. Inmunofluorescencia indirecta de músculo. Expresión de antígenos de *T. cruzi* en animales inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de dicho microorganismo. A. Muestra de tejido muscular de un animal inmunizado con la librería genómica de expresión. B. Muestra de tejido muscular de un animal inmunizado con el plásmido pcDNA3.

IV.4 estudio de la capacidad protectora de la administración de una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*

En el cuadro 1 y en la figura 8 se puede observar que todos los animales de los grupos de animales no inmunizados y los inmunizados con el plásmido vacío murieron entre los tres a cinco días post reto, para un 100% de mortalidad. En el grupo inmunizado con antígenos solubles del parásito, la mortalidad comenzó a partir del sexto día, haciéndose más intensa hacia el décimo día (60%) post inoculación y finalmente, la muerte de todos los animales se produjo el día 30. En el grupo inmunizado con la biblioteca, la mortalidad ocurrió en cuatro de los animales (40%) entre los veinte y cuarenta días post reto, el resto, 6 animales (60%) se mantuvieron con vida todo el período de observación. Como resultado del reto realizado se encontró que los ratones inmunizados con la biblioteca genómica fueron capaces de controlar la infección aguda con trypomastigotes de *T. cruzi*. Al comparar todos los grupos estudiados entre sí, encontramos diferencias significativas ($p < 0.0001$). Se detectó una sobrevida significativamente mayor ($p < 0.001$) en el grupo inmunizado con la biblioteca genómica, al compararlo con los demás grupos.

Cuadro 1 Porcientos de mortalidad, protección y supervivencia en los diferentes grupos estudiados en días de observación posteriores al reto con 5×10^4 parásitos

Grupo	N ^o de Animales	Mortalidad %	Protección %	Tiempo de supervivencia en días
Control negativo	10	100	-	3-5
Plásmido	10	100	-	3-5
Antígeno <i>T. cruzi</i>	10	80	20	30
Biblioteca genómica	10	40	60	60 ($p < 0.001$)

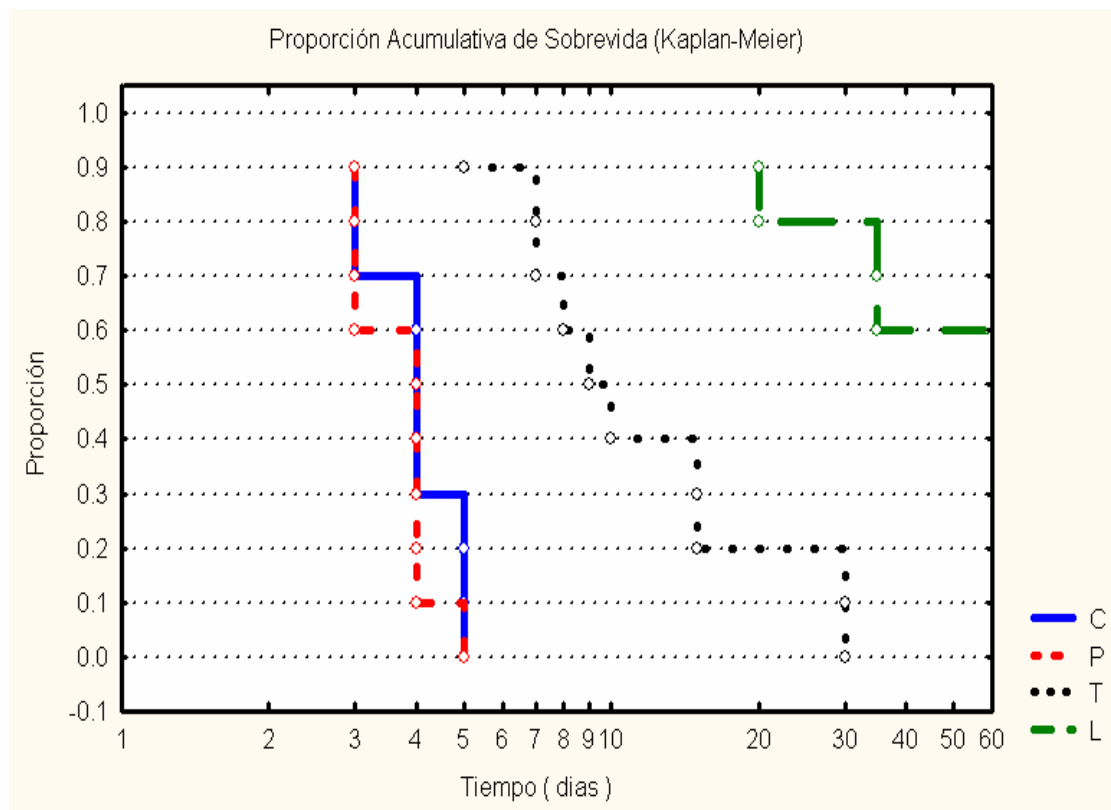
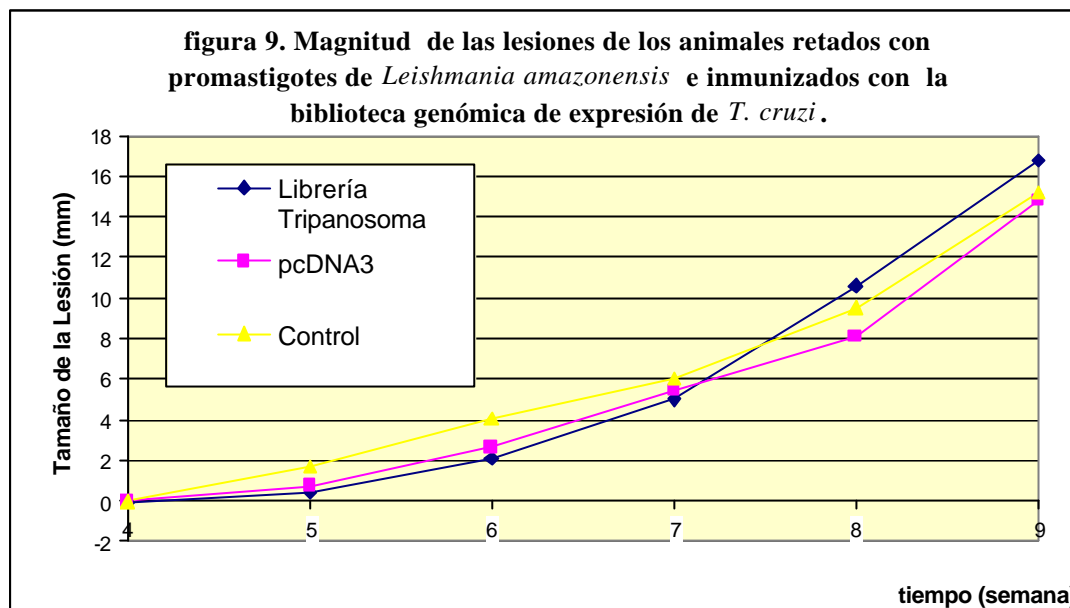


figura 8. Supervivencia acumulativa de animales retados con *T. cruzi*. L: Grupo inmunizado con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*. T: Grupo inmunizado con antígenos solubles de *T. cruzi*. P: Grupo inmunizado con el plásmido pcDNA3. C: Grupo control

IV.5 estudio de la capacidad protectora de la administración de una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* al reto con promastigotes de *Leishmania amazonensis*

En el siguiente resultado, figura 9 se puede observar como los ratones inmunizados, tanto con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*, como con el plásmido pcDNA3 y el grupo no inmunizado se desarrollaron lesiones, causadas por la infección con los promastigotes de *Leishmania amazonensis*. Las lesiones en los cojinetes plantares fueron evidentes desde la quinta semana y mostraron un incremento continuo hasta la semana 10. En ninguno de los intervalos de tiempo se encontró diferencias significativas entre los distintos grupos estudiados



IV.6 determinación de respuestas autoinmunes

IV.6.1 detección de Anticuerpos anti ADN de doble y simple cadena

El estudio resultó negativo con todos los sueros del grupo inmunizado con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* en todos los tiempos establecidos (Grupo L). También fueron negativos los sueros de todos los animales provenientes de los demás grupos de estudio (T,P,G, y C)

IV.6.2 detección de Anticuerpos Antinucleares

La detección de anticuerpos antinucleares resultó negativa en todos los tiempos y grupos estudiados.

IV.6.3 determinación de anticuerpos contra músculo cardíaco

No se demostró la presencia de anticuerpos contra músculo cardíaco en ninguno de los animales de los grupos estudiados.

V.6.4 detección del Factor Reumatoideo tipo IgG en ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*

Como se observa en la figura 10, en el grupo de ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*, hay un aumento del Factor Reumatoideo en las determinaciones de los días 7 y 21 obteniéndose en todos los animales, valores por encima del valor de corte. En el grupo inmunizado con

ADN genómico del parásito, el factor reumatoideo alcanza un valor máximo en la determinación del día 14, encontrando en algunos de los animales valores por encima del valor de corte.

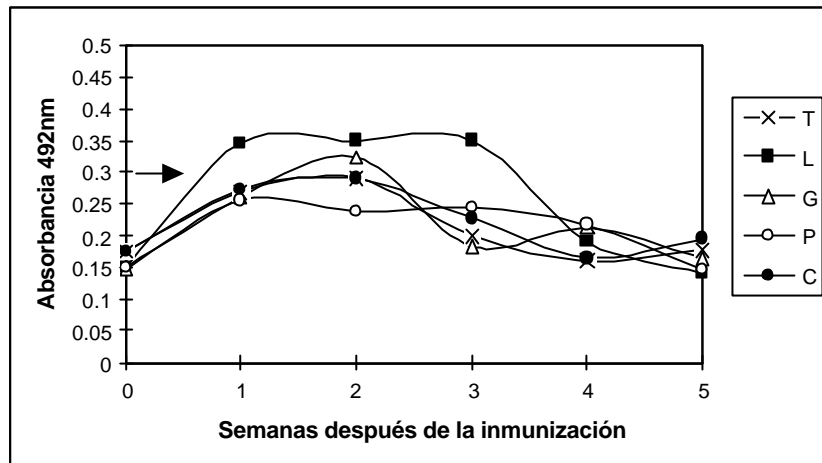


figura 10. Determinación de factor reumatoideo mediante ELISA en el suero de animales inmunizados con ácidos nucleicos de *T. cruzi*. T: Grupo inmunizado con antígenos solubles de *T. cruzi*. L: Grupo inmunizado con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*. G: Grupo inmunizado con la librería de expresión de *T. cruzi*. G: Grupo inmunizado con ADN genómico de *T. cruzi*. P: Grupo Grupo inmunizado con el plásmido pcDNA3. C: Grupo control Valor de corte 0.3

CAPITULO V.- DISCUSIÓN:

V.2 construcción de la biblioteca genómica de expresión de T. cruzi

Para simplificar el trabajo se decidió digerir el ADN genómico de *T. cruzi* con la enzima Sau3A, que presenta una elevada frecuencia de corte en el ADN y ligar los fragmentos obtenidos al vector digerido con la enzima BamH1.

El resultado del análisis de restricción con la enzima EcoRV de los recombinantes obtenidos después de la transformación genética de *E. coli* con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*, permitieron demostrar que en el inóculo que se administró había una elevada cantidad de insertos de ADN de *T. cruzi* (80%). Aunque los resultados obtenidos de la proporción de clones con inserto de ADN de *T. cruzi* fueron altos debe tomarse en consideración que los resultados provienen del estudio de clones tomados al azar, por lo que los mismos no indican exactamente la proporción real de plásmidos en la biblioteca con insertos de ADN del parásito. Además, en nuestro caso no se utilizó el codón de iniciación presente en el plásmido usado para la construcción de la biblioteca, por lo que se trabajó con una estrategia que obliga a la expresión de los genes a partir de su propio codón de iniciación lo que disminuye potencialmente el número de genes expresados.

Otra alternativa en estos clonajes ha sido la utilización de un codón de iniciación en el vector llevando el clonaje de los fragmentos de ADN después de su digestión con enzimas que aseguren una expresión óptima de sus genes teniendo en cuenta los diferentes marcos de lecturas (Goldemberg *et al* 1984, Barry *et al* 1995).

La utilización de bibliotecas genómicas de expresión de ADN complementario (ADNc) en el caso de parásitos con ciclos de vida complejos, obliga a la obtención de bibliotecas a partir de todos los estadios evolutivos del mismo con el objetivo de contar con toda la representación antigénica (Harumal *et al* 2003, Shabaan *et al* 2003, Liu *et al* 2003). La utilización de bibliotecas obtenidas de ADN genómico podría constituir una alternativa simple de esta estrategia si asegurara la expresión de todos los genes con el uso de una sola biblioteca (Manoutcharian *et al* 1998, Acosta 2001, Melby *et al* 2000, Rodrigues *et al* 2002, Shabaan *et al* 2003).

Las tallas de los fragmentos seleccionados favorece potencialmente la inclusión de genes que pudieran codificar productos importantes del parásito, tal vez relacionados con su diagnóstico o la protección contra la infección causada por el mismo. Sin embargo, pensamos que este conjunto de fragmentos del genoma

es también representativo de lo que el parásito expresa en una infección natural. (Schnapp *et al* 2002 a, Schnapp *et al* 2002 b, Rodrigues *et al* 2002, Shabaan *et al* 2003)

V.3 estudio de la inmunogenicidad humoral y celular desarrollada por la administración de una biblioteca genómica de *T. cruzi*

*V.1 ensayo inmunoenzimático (ELISA) para determinar la respuesta de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión contra *T. cruzi**

Con respecto a los resultados obtenidos al estudiar el suero de los animales inmunizados por el método de ELISA, se puso de manifiesto la ausencia de respuesta humoral hasta 4 semanas después de administrada la biblioteca, lo que coincide con los resultados obtenidos por Barry y colaboradores (Barry *et al* 1995), después de la inmunización de ratones con una biblioteca genómica de expresión de *Mycoplasma pulmonis*, quienes encontraron una pobre respuesta de anticuerpos específicos en los animales inmunizados. Otros autores, llevando a cabo la inmunización con genes individuales, han obtenido resultados similares (Rhodes *et al* 1993, Katsumi *et al* 1994, Irwin *et al* 1994, Quan *et al* 1995, Fachado *et al* 1998, Acosta 2001, Montalvo *et al* 2001, Jensen *et al* 2001, Garg *et al* 2002, Katae *et al* 2002, Schnapp *et al* 2002).

En el estudio de la sexta semana postinmunización se evidenció un efecto estimulador específico de la respuesta inmune humoral después de la reinmunización con 50 µg de la biblioteca, al compararlo con el grupo no inmunizado, es de señalar que entre este grupo y el inmunizado con antígenos de *T. cruzi*, que mostró la mayor respuesta de anticuerpos, no se encontraron diferencias significativas. Es bueno señalar que la cinética de la producción de anticuerpos es dependiente de la dosis y del intervalo de tiempo en que se administre, se ha determinado que entre 4 y 12 semanas después de una dosis se alcanza la máxima producción de anticuerpos y además, se ha determinado que en el caso de la dosis óptima no hay dependencia del número de dosis que se inyecten una vez alcanzada el nivel máximo de anticuerpos producidos. Respecto a la duración de la respuesta depende de la especie, siendo de por vida en ratones, mientras que en ciertos primates no humanos es de corta duración (55, 70, 71)

El hecho de no haberse encontrado diferencias significativas entre el grupo reinmunizado con 50 µg de la librería y los grupos reinmunizados con 25 µg de esta y con ADN genómico del parásito, hace necesario el estudio de este resultado en el futuro, con la utilización de un número mayor de animales y de otros esquemas de inmunización.

De forma general, la casi totalidad de los estudios realizados inmunizando con bibliotecas de expresión no han prestado atención al estudio de la inmunidad humoral y se han dedicado fundamentalmente al estudio de la inmunidad mediada por células y de la capacidad protectora mediante estudios de reto (Rhodes *et al* 1993, Katsumi *et al* 1994, Quan *et al* 1995, Vogel 1995, Garg *et al* 2002, Rodríguez *et al* 2002, Katae *et al* 2002, Schnapp *et al* 2002) .

V.2 determinación de la respuesta de anticuerpos específicos mediante la técnica del Western blot

Al evaluar la respuesta inmune humoral mediante la técnica del Western blot en los diferentes grupos de estudio se pudo confirmar la intensa reactividad de los sueros de los animales inmunizados con la biblioteca genómica, demostrándose que las respuestas encontradas en los animales inmunizados con dicha construcción genética estuvieron dirigidas contra los productos de los genes de *T. cruzi* representados en ella y no contra productos codificados por genes presentes en el vector. En ninguna de las determinaciones realizadas se mostró respuesta en los sueros de los animales inmunizados con el vector pcDNA3 (control negativo).

El hecho de detectarse respuesta inmune específica humoral en los animales inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* puso de manifiesto indirectamente la expresión de los genes de dicha construcción genética, posterior a la realización de la inmunización (Barry *et al* 1995) lo cual coincide con los resultados obtenidos por la IFI.

Las variaciones de la respuesta observada entre distintos animales e incluso dentro del mismo animal y en diferentes momentos del esquema de inmunización (datos no mostrados), reflejan la composición diferente, en cuanto a genes de *T. cruzi* se refiere, de los distintos inóculos suministrados a los diferentes animales; ya que, si bien la dosis de ADN fue la misma, la composición de cada inóculo en cuanto a fragmentos de ADN de *T. cruzi*, debió ser diferente por tratarse de una biblioteca genómica y no de genes individuales bien definidos como los utilizados en otros trabajos (Montgomery *et al* 1993, Ulmer *et al* 1994, Webster *et al* 1994, Garg *et al* 2002, Katae *et al* 2002, Schnapp *et al* 2002). No obstante, se apreció un reconocimiento preferencial de la banda de 55 KDa, lo que pudiera estar en relación con una elevada inmunogenicidad de esta proteína, unido a una alta representatividad del gen correspondiente en la biblioteca genómica.

Es importante señalar que, además de la heterogeneidad encontrada en las respuestas inducidas por la inmunización con la biblioteca genómica se observa un limitado número de bandas reconocidas por el suero de los animales inmunizados. Entre otros factores que pudieran estar influyendo en este resultado,

está la no expresión de genes codificantes para proteínas inmonogénicas, ya que en este caso el inmunógeno empleado, la biblioteca, es en sí misma heterogénea porque contiene el 80 % de ADN compuesto por plásmidos recombinantes, de los cuales, no todos contienen fragmentos de ADN posibles a expresar; ya que para esto sería necesario la presencia de un ATG lo suficientemente cercano al promotor de *Citomegalovirus* (CMV) presente en el vector de expresión, sin que existan secuencias de parada que ocasionen la terminación prematura de la transcripción (Acosta 2001, Montalvo *et al* 2001).

Además también es un hecho fortuito cuáles moléculas de ADN de las inyectadas son exitosamente transfectadas en la célula blanco; lo que condiciona posteriormente la expresión de antígenos, los que aunque expresados, no necesariamente son inmunogénicos y, en caso de serlo, los anticuerpos reaccionantes contra los mismos pudieran no ser detectados por Western blot ya que no se evidenciarían los que reaccionan contra epítopes conformacionales (Acosta 2001).

En este análisis también es necesario tener en cuenta la dosis empleada para la inmunización (50 µg de ADN), que pudiera considerarse baja si se tiene en cuenta que el inmunógeno no es homogéneo, aunque es mayor que las dosis comúnmente empleadas para genes individuales que oscilan en un amplio rango, en dependencia de la vía y método de inmunización empleado y la especie animal (Whalen *et al* 1995).

Otro factor importante a señalar, es que en la preparación de antígenos solubles del parásito utilizada en el Western blot, no están representados todos los antígenos del microorganismo, mientras que al inmunizar con una biblioteca genómica teóricamente se administran todos los genes del microorganismo, tanto las proteínas de secreción como las proteínas que no se secretan (Graun *et al* 1996, Liu *et al* 1996). En este caso, solo estaríamos evaluando la respuesta contra antígenos solubles semipurificados de *T. cruzi*, por lo que un grupo de respuestas inducidas en los animales pudo no haber sido detectada, que serían las que pudieron haberse producido contra otras proteínas del microorganismo codificado por genes presentes en el inmunógeno.

V.3 estudio de la inmunogenicidad celular.

La respuesta linfoproliferativa positiva obtenida en uno de los animales inmunizados con una dosis de la biblioteca (grupo L) sugiere un efecto estimulador específico tras la administración de la biblioteca. La diferente respuesta inmune observada en los dos animales de este grupo debe ser interpretada con cautela ya que muchos factores podrían haber influenciado en los resultados obtenidos con esta técnica, entre ellos, los más importantes son: los niveles de expresión de los diferentes genes y el grado de solapamiento entre los genes administrados a cada animal. Además, habría que tener en cuenta el número y la calidad de

los antígenos presentes en el purificado citoplasmático y estructural de *T. cruzi* utilizado para la estimulación linfocitaria.

Se conoce que esta técnica de inmunización produce una potente estimulación de la inmunidad celular y en otros reportes de inmunización con bibliotecas genómicas de expresión, también se encontraron resultados que apuntan en este sentido (Hoffman *et al* 1994, Tang *et al* 1992, Danko y Wolf 1994, Fujimura *et al* 2001, Schnapp *et al* 2002, Garg *et al* 2002, Katae *et al* 2002, Planelles *et al* 2001).

Se ha comprobado que, inmunizando con bibliotecas de otros parásitos como *Leishmania donovani* y *Leishmania major*, en el primer caso con una biblioteca de ADN complementario y en el segundo con ADN genómico, se indujeron fuertes respuestas específicas a nivel celular, así como mediante ciclos repetidos de inmunización con fracciones de la biblioteca original, se identificó un reducido grupo de clones con una marcada capacidad protectora (Piedrafita *et al* 1999, Melby *et al* 2000).

V.4 inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar la expresión de los antígenos *T. cruzi* en el músculo esquelético de los animales inmunizados.

Los resultados obtenidos, con el método de inmunofluorescencia indirecta evidenciaron la expresión en músculo de al menos una parte de los antígenos del parásito en la misma forma que se expresan durante la infección del hospedero, con una conformación similar a la encontrada en el microorganismo original, ya que la mezcla de sueros utilizada como anticuerpo primario en la técnica provenía de pacientes infectados con el microorganismo en su forma salvaje. Este resultado puso en evidencia, que la inmunización con bibliotecas de expresión reproducen en forma inocua la expresión antigénica en el marco de la afección logrando la estimulación del sistema inmune con la potencialidad de generar un estado de protección aún sin el conocimiento preciso de los antígenos inductores de protección (Abbas *et al* 1995)

Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores en la inmunización con genes individuales provenientes de otros microorganismos, administrados por vía intramuscular, aunque en nuestro caso inmunizamos con una biblioteca genómica de expresión (Mair *et al* 2000, Johnston y Barry 1997).

En los reportes que existen de inmunización con bibliotecas genómicas de expresión, no se realizaron los estudios de la expresión antigénica en el tejido muscular, pero al detectarse una respuesta inmune específica en los animales inmunizados, se puso de manifiesto indirectamente la expresión de los genes de la biblioteca después de la inmunización (Barry *et al* 1995, Manoutcharian *et al* 1998, Melby *et al* 2000).

El hecho de haber encontrado expresión de antígenos del microorganismo en el músculo, después de la administración de la biblioteca, permite plantear la posibilidad de que la célula muscular haya realizado el

procesamiento del ARN mensajero (ARN_m) de *T. cruzi* como lo realiza el propio microorganismo, hecho que debe confirmarse en trabajos posteriores. De ser así, esto tendría implicaciones desde el punto de vista básico y aplicado, ya que hasta el momento los trabajos publicados de inmunización con ADN de parásitos, se llevaron a cabo después de la obtención de un ADN complementario a partir del ARN_m maduro de dicho microorganismo (Davis *et al* 1994, Lagging *et al* 1995, Hoffman *et al* 1994, Mair *et al* 2000). De confirmarse el procesamiento del ARN de parásitos por la célula muscular, se simplificaría sustancialmente la preparación de vacunas de ADN a partir de organismos eucariota.

Con la excepción de nuestros resultados, aún no existen reportes del estudio de la expresión *in vivo* de los antígenos después de la administración de bibliotecas de expresión

V.5 estudio de la capacidad protectora de la administración de una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*

El análisis de las tasas de mortalidad dentro de un período dado, no expresa la velocidad con que van muriendo los sujetos de cada grupo, sólo interesa si murió dentro del período de observación. En el análisis de sobrevivencia, utilizado en nuestro trabajo, es precisamente esta velocidad el elemento de comparación. Las diferencias encontradas ($p < 0.001$) entre los animales inmunizados con la biblioteca genómica y los controles, puso en evidencia la capacidad de respuesta de los ratones inmunizados al controlar la infección aguda producida por los trypanomastigotes de *T. cruzi*, lo que permite una mayor sobrevivencia. Este resultado sugiere que los antígenos expresados *in vivo* después de la inmunización, fueron capaces de desencadenar respuestas inmunoprotectoras asumiendo su estructura nativa, al igual que lo hace el propio parásito; con sus péptidos intactos, e inducir cierta protección para esta especie (Shirmbeck *et al* 1994, Davis *et al* 1994).

En una de sus investigaciones, Piedrafita y sus colaboradores (Piedrafita *et al* 1999) describen la inmunización con varias fracciones de una biblioteca de *Leishmania major* así como la protección que cada una de ellas genera. Este es el primer reporte, que conozcamos, en que se estudie la respuesta *in vivo* de ratones inmunizados con una biblioteca del género *Trypanosoma*, *sp*, aunque, en trabajos más recientes de nuestro grupo, también se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de las lesiones de los animales inmunizados con una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis* y los grupos controles, poniendo de manifiesto la capacidad de respuesta de éstos (González 2000, Montalvo *et al* 2001). Más recientemente, otros investigadores han mostrado resultados semejantes al inmunizar con

genes que codifican para una proteína específica de *T. cruzi* (Fujimura *et al* 2001, Garg *et al* 2002, Katae *et al* 2002, Schnapp *et al* 2002)

La muerte de los ratones inmunizados con la biblioteca genómica nos hace pensar en diferentes factores que pudieran estar influyendo en este resultado; cada animal pudo haber recibido un inóculo con diferente composición genética, y algo más importante aún, los niveles de expresión de los diferentes genes administrados pudo no haber sido igual en todos los ratones inmunizados.

Finalmente se quiere señalar, que el número de trypomastigotes metacíclicos inoculados durante el reto, formas infectantes para el hombre o animales, es muy superior a la que el vector deja durante sus deyecciones, después de alimentarse con la sangre de un vertebrado durante la infección natural, hecho que podría sugerir otra posible optimización en la respuesta modificando esta variable.

Finalmente, estos resultados nos permiten contar con varias herramientas para el estudio de la Enfermedad de Chagas en el campo de la inmunoprotección mediante la inmunización con ácidos nucleicos, siempre que logremos encontrar la composición adecuada para un inmunógeno definido.

V.6 estudio de la capacidad protectora de la administración de una biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi* frente al reto con promastigotes de *Leishmania amazonensis*.

La aparición de las lesiones en los cojinetes plantares de los ratones inmunizados con la biblioteca similares a los producidos en los controles (plásmido y grupo no inmunizado) puso de manifiesto que la biblioteca de *T. cruzi* no fue capaz de inducir un estado de protección frente a la infección con los promastigotes de *Leishmania amazonensis*. Se ha reportado la presencia de antígenos comunes entre las especies de *Leishmania* y *T. cruzi*, los cuales pertenecen a la misma familia Trypanosomatides (Bastrenta *et al* 2003). La existencia de antígenos compartidos entre estos parásitos pudiera conferirles algún grado de protección cruzada (Araujo y Morein 1991, Frank *et al* 2003). Sin embargo, en nuestro experimento esto no se evidenció (Bastrenta *et al* 2003, Frank *et al* 2003). La ausencia de protección cruzada pudiera explicarse por la no presencia o baja representación de los genes relacionados con estos antígenos en la biblioteca utilizada para la inmunización, o por la no relevancia de los mismos para la inducción de una respuesta inmunoprotectora en el caso de que dichos antígenos hallan sido expresados de forma adecuada.

V.7 determinación de respuestas autoinmunes

V.7.1 determinación de anticuerpos anti-ADN de doble cadena.

No se produjo una respuesta frente a determinantes antigénicos conservados, presentes en el ADN de doble cadena, lo que coincide con otros autores quienes después de inmunizar con un gen del factor IX humano y otros genes (Katsumi *et al* 1994, Quan *et al* 1995), no detectaron anticuerpos contra el ADN de doble cadena post-inmunización.

Esta falta de respuesta pudiera explicarse por varios mecanismos entre los cuales se encuentran: la rápida transcripción y traducción de los genes de *T. cruzi* lo cual polariza la respuesta inmune hacia las proteínas y no hacia el ADN (Vogel y Sarver 1995), la inducción de la tolerancia a nivel de linfocitos B específicos mediante la eliminación física (Erikson 1991, Chen *et al* 1994, Chen *et al* 1995), y la edición de receptores (Gay *et al* 1993, Marko *et al* 1993) o inactivación funcional (Tsao *et al* 1993).

Otros factores que pudieran estar implicados en la falta de respuesta frente al ADN son los linfocitos T supresores (Shoenfeld *et al* 1993) o las interacciones idiotipo-antiidiotipo (Borl *et al* 1984) y aspectos relacionados con la forma de administración del ADN. Sólo se han logrado respuestas de anticuerpos específicos después del acoplamiento del ADN a una proteína transportadora, seguida de su administración con adyuvante completo de Freud (Borl *et al* 1984, Stollar 1989, Edgington y Stollar 1992, Desai *et al* 1993).

V.7.2 detección de anticuerpos anti ADN de simple cadena

La falta de producción de anticuerpos anti ADN de simple cadena y de otros anticuerpos antinucleares en los ratones inmunizados con la biblioteca de expresión, podría explicarse por los mismos elementos que planteamos anteriormente, aunque es mucho mas frecuente la detección de linfocitos B que reconocen el ADN de simple cadena en sujetos normales (Hoch *et al* 1983, Conger *et al* 1984, Burastero *et al* 1994).

Nuestro trabajo brinda resultados divergentes a los obtenidos por Katsumi y colaboradores (Katsumi *et al* 1994), quienes encontraron altos niveles de anticuerpos dirigidos contra el ADN de simple cadena después de la inmunización con el gen del factor IX humano

La discrepancia con respecto a los resultados obtenidos pudieran explicarse por la diferencia de los esquemas de inmunización empleados, ya que en el trabajo de inmunización con el factor IX se utilizó mayor número de dosis, con intervalos de tiempo reducidos entre las mismas. La ausencia de respuestas

frente al ADN de timo de ternera, utilizado en el ensayo, no excluye la posibilidad de que se produzcan anticuerpos dirigidos contra el ADN de *T. cruzi*

V.7.3 determinación de anticuerpos contra músculo cardíaco

No se produjo respuestas de anticuerpos contra músculo cardíaco en el grupo inmunizado con la biblioteca de *T. cruzi*. La realización de este estudio en el presente trabajo estuvo motivado por las características de la Enfermedad de Chagas, en la que con gran frecuencia los individuos crónicamente infectados presentan una pan-miocarditis con infiltrados inflamatorios mononucleares, dependiente probablemente de una reacción de tipo autoinmune (Luquetti 1994, Pérez –Fuentes *et al* 2003).

También, en el curso de la enfermedad se producen autoanticuerpos de diferente especificidad, entre los que se encuentran los dirigidos contra el endocardio y estructuras vasculares cardíacas (Rojas de Arias 1992, Vergara *et al* 1995, Pérez –Fuentes *et al* 2003).

La génesis de este tipo de reacción autoinmune se cree que es debido a la reactividad cruzada entre los antígenos del parásito y estructuras del tejido cardíaco. A pesar de la demostración por IFI de la expresión de antígenos de *T. cruzi* en el tejido muscular después de la inmunización con la biblioteca de expresión de este parásito, no se detectaron respuestas autoreactivas, lo que puede explicarse por diferencias en la expresión y localización de los antígenos parasitarios después de la inmunización con ADN. Este elemento apunta hacia la posible utilización de la inmunización con genes del parásito para la prevención de la enfermedad, sin el riesgo de inducir manifestaciones autoinmunes similares a las producidas en la infección natural.

V.7.4 detección de factor reumatoideo

El patrón de respuestas del factor reumatoideo después de la inmunización de los animales con la biblioteca de expresión, se asemeja a la producción de anticuerpos específicos en el marco de una primo infección o una primo vacunación.

La producción de factores reumatoideos IgG en los ratones inmunizados con la biblioteca genómica del parásito, puede deberse a la producción de inmunocomplejos o a la estimulación inespecífica del sistema inmune por el ADN que se administró.

Los linfocitos B, con actividad del factor reumatoideo, son abundantes en la zona del manto de los ganglios linfáticos y las amígdalas, en sujetos en los que no se detectan factores reumatoideos en el suero. Estos linfocitos autorreactivos podrían haber escapado del proceso de delección clonal sin tener ninguna

función en particular. Sin embargo, algunos autores sugieren la posibilidad de que la función principal de estos linfocitos B sea independiente de la secreción de anticuerpos y que esté relacionada con el procesamiento de los antígenos atrapados en los inmunocomplejos (Carson *et al* 1987, Carson *et al* 1991). En el marco de respuestas inmunes de tipo secundario, pueden encontrarse frecuencias de linfocitos B con actividad de factor reumatoideo tan altas como la de linfocitos específicos de antígenos (Welch *et al* 1983, Coulie y Snick 1985).

Se piensa que la expresión de linfocitos B específicos con actividad de factor reumatoideo es dependiente de linfocitos T y hasta el momento no se ha demostrado la existencia de linfocitos T que reconozcan IgG autóloga (Carson *et al* 1991). Se ha demostrado que para la producción de respuestas contra factor reumatoideo en el marco de una respuesta inmune secundaria se necesita la presencia de linfocitos específicos de antígenos (Nemazee 1985, Nemazee y Sato 1988).

La infección experimental de ratones con protozoos, incluyendo *T. cruzi* induce la producción de autoanticuerpos (García *et al* 1995, Vergara *et al* 1995).

En nuestro experimento, demostramos la expresión de antígenos del parásito y la producción de anticuerpos específicos, lo cual pudiera inducir la formación de inmunocomplejos y la producción subsiguiente de factor reumatoideo.

La estimulación inespecífica por el ADN administrado pudiera explicar también la presencia de factor reumatoideo, ya que se ha demostrado una estimulación inespecífica del sistema inmune después de la administración de ADN bacteriano de alto peso molecular y oligodeoxinucleotido (motivos CpG) (Krieg 1995 *et al* 1995, Krieg 1995 a, Krieg 1995 b).

Se ha reportado, que en ratones inyectados con ADN bacteriano o con oligodeoxinucleótidos que contenían la secuencia CpG se produjo una estimulación de los linfocitos B, T y células AN, con la producción de la interleucinas 6 y 12, así como la producción de Interferón Gamma, lo que lleva a más de 95% de las células B a entrar en el ciclo mitótico y producir inmunoglobulinas (Tomlinson *et al* 1995). Los macrófagos también responden a la presencia de ADN exógeno produciendo Factor de Necrosis Tumoral alfa (Bonay y Fresno 1995). De esta forma, el reconocimiento del ADN extraño contribuye a la producción de citocinas y a la activación policlonal vista en muchas infecciones. (Krogstad 1994).

Estos efectos del ADN sobre la respuesta inmune pudieran estar implicados en la producción de factor reumatoideo detectada en nuestros experimentos, después de la inmunización con la biblioteca de expresión. Hasta el momento, no existen reportes que hayan estudiado el comportamiento del factor reumatoideo después de la inmunización con ácidos nucleicos.

V.7.5 determinación de anticuerpos antinucleares.

No hubo presencia de anticuerpos antinucleares en ninguno de los animales de los grupos estudiados, hecho que podría explicarse por lo anteriormente discutido al analizar la respuesta de anticuerpos contra el ADN de simple y doble cadena.

Las vacunas de Ácidos Nucleicos representan una efectiva y novedosa forma de expresión de antígenos *in vivo* generando respuesta inmune humoral y celular contra antígenos virales, bacterianos y parasitarios (Lowrie *et al* 1994, Xiang *et al* 1994, Lagging *et al* 1995). Esta tecnología promete ser una novedosa estrategia en el campo de la inmunoprotección que ya algunos la llaman "Vacuna del futuro" , sin embargo, hasta el momento, solamente nos permite la manipulación del sistema inmunitario y la búsqueda de nuevos antígenos potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas.

Finalmente, con este trabajo pretendemos estimular la búsqueda de nuevas variantes en la inmunización con ácidos nucleicos de organismos eucariota, como el parásito que nos ocupa, considerando esta tecnología como una herramienta útil para la identificación de antígenos o la preparación de vacunas de última generación.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi* utilizando el vector pcDNA3. y se demostró la expresión de los antígenos de *T. cruzi* en el tejido muscular de los animales inmunizados con la biblioteca genómica de expresión.
2. Se demostró un aumento significativo de los niveles de anticuerpos específicos en los animales reinmunizados con 50 µg de la biblioteca genómica de expresión, con respecto al grupo que recibió una sola dosis de la biblioteca y al grupo no inmunizado. Además, se pudo demostrar una respuesta específica humoral por Western Blot en el suero de los ratones BALB/c inmunizados con la biblioteca genómica
3. Se observó estimulación linfocitaria B antígeno específica en los animales inmunizados con una dosis de la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*
4. Se demostró protección en los ratones BALB/c inmunizados con la biblioteca genómica de *T. cruzi*. No se detectó protección en los animales inmunizados con la biblioteca de *T. cruzi* y retados con promastigotes de *Leishmania amazonensis*
5. No se detectaron anticuerpos anti ADN de doble, simple cadena, anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti músculo cardíaco en los sueros de los ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*. Además, se observó un incremento transitorio en las cifras de Factor Reumatoideo IgG en los ratones inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*.

RECOMENDACIONES

1. Determinar, en trabajos futuros, la capacidad de la célula muscular de ratón, de procesar el ARN_m de *T. cruzi* en una forma similar a como lo realiza el propio microorganismo.
2. Estudiar la respuesta inmune humoral y celular específica, en animales inmunizados con la biblioteca genómica de expresión de *T. cruzi*, utilizando un mayor número de animales y otros esquemas de inmunización.
3. Seleccionar los sueros de los animales con altos títulos de anticuerpos para buscar clones en la biblioteca genómica que expresen antígenos con potencialidad vacunal.
4. Evaluar el reto empleando un mayor número de animales, considerando diferentes dosis, vías de administración y tipos de adyuvantes.
5. Llevar a cabo estudios de inmunización con fracciones de la biblioteca de expresión

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas KA. Inmunidad frente a los microorganismos. En: Abbas KA, Lichtman HA, Pober SI. Eds. Inmunología Celular y Molecular. 2. Ed. Madrid. Mc Graw Hill Interamericana de España. 1995, 369-76.
- Acosta A. Inmunización con genotecas de expresión de distintos microorganismos. Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias Médicas. Instituto Finlay. Ciudad de la Habana. 2001.
- Alcina A, Fresno M. Respuesta inmune frente a los protozoos parásitos. En: Larraga V, Fresno M, Enjuanes L. Nuevas Tendencias: Inmunología. Ciudad de la Habana: Edición Revolucionaria. 1987: 325-40.
- Almeida IC, Milani SR, Gorin AJ, Travassos LR. Complement mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-galactosil antibodies. J Immunol 1991; 146: 2394-00.
- Altcheh J, Corral R, Biancardi MA, Freilij H. Anti-F2/3 antibodies as cure marker in children with congenital *Trypanosoma cruzi* infection Medicina B Aires. 2003;63:37-40.
- Andrews NW, Alves MJ, Shumacher RI, Calli, W. *Trypanosoma cruzi*. Protection in mice immunized with 8-methoxypsoralen-inactivated trypomastigotes. Exp. Parasitol. 1985; 60:225-62.
- Anselme A, Moleiro F. Pathogenic mechanisms in Chagas' cardiomyopathy. En: A Ciba Foundation Symposium 20 (new series) Tripanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. Amsterdam: Elsevier, 1974: 125-36.
- Antunez AC, Cecchini FM, Bolli FB, Oliveira PP, Reboucas RG, Monte TL, et al. trypanosomiasis and AIDS. Arq Neuropsiquiaty. 2002;60:730-3
- Araujo FG, Morein B. Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigens incorporated into iscoms protects against lethal challenge in mice. Infect. Immun. 1991; 59:2909-14.
- Asin SN, Giojalas LC. Type of rectal contents and infectivity of domiciliary populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: reduviidae) in Argentina. J. Med. Entomol. 1995; 32:399-01.
- Aznar C, Lopez BP, Bradariz S, Mariette C, Liegeard P, Do Carmo DA. et al. Prevalence of anti R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. Fems Immunol Med Microbiol 1995; 12: 231-37.
- Bagarazzi ML, Boyer JD, Ugen KE, Javadian MA, Chattergoon M, Shah A. et al. Safety and immunogenicity of HIV-1 DNA constructs in chimpanzees. Vaccine 1998; 16: 1836-41.
- Bahloul C, Jacob Y, Tordo N, Perrin P. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the Lyssa viruses. Vaccine 1998; 16: 417-25.
- Barry MA, Lai WC, Johnston SA. Protection against Mycoplasma infection using expression-library immunization. Nature 1995; 377: 632-35.
- Basombrio MA. *Trypanosoma cruzi*. Partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. Exp. Parasitol. 1990; 71:1-8.
- Bastrenta B, Mita N, Buitrago R, Vargas F, Flores M, Machane M, et al. Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:255-64.
- Beaver PCh, Jung RC, Cupp EW. Parasitología Clínica. 2ª ed. Barcelona: Editores Salvat, 1986: 65-112.
- Beherend M, Beltran M, Restrepo M, Kroeger A. Control of Chagas disease in blood banks in Colombia. Biomedica. 2002;22:39-45.

- Bender BS, Ulmer JB, De Witt CM, Cottey R, Taylor SF, Ward AM, Friedman A. et al. Immunogenicity and efficacy of DNA vaccines encoding influenza A proteins in aged mice. *Vaccine* 1998; 16: 1748-55.
- Benenson AS. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 16a ed. Washington DC: OPS, 1997:465-68 (Publicación científica No 564).
- Bevan MJ. Antigen presentation to cytotoxic T-lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 1995; 182: 639.
- Bonay P, Fresno M. Characterization of carbohydrate binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1995; 270: 11062-70.
- Borl J, Sasaki T, Stollar BD, Borel Y. Conjugation of DNA fragments to protein carriers by glutaraldehyde: immunogenicity of oligonucleotide hemocyanin conjugates. *J. Immunol. Methods*. 1984; 67:289-2.
- Borst P. Transferring receptor, antigenic variation and the possibility of a Trypanosome vaccine. *Trends Genet* 1991; 7: 307-9.
- Brener Z, Krettli AU. Immunology of Chagas' Disease. IN: Wyler, D.J. Ed. Modern parasite biology. Cellular, immunological and molecular aspects. New York: W.H. Freeman and Co. 1990; 247-61.
- Burastero SE, Balow JE, Notkins L, Casali P. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1 B cell subset. *Science*. 1994; 236:77-80.
- Cai X, Chai Z, Jing Z, Wang P, Luo X, Chen J. Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *J Trop Med Public Health* 2001;32:105-1.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. 1 Origin of metacyclic tripanosomes in liquid medio. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1964; 6: 93-100.
- Cancado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44:29-7.
- Capron A, Loch C, Fracchia GN. Safety and efficacy of new generation vaccines. *Vaccine* 1994; 12:667-9.
- Carson DA, Chen P, Fox PI. Rheumatoid factor and immune networks. *Annual Review Immunol*. 1987; 5:109-26.
- Carson DA, Chen PP, Kipps TJ. New roles for rheumatoid factor. *J. Clin. Invest*. 1991; 87:379-83.
- Chen C, Nagy Z, Radic MZ. The site and stage of anti DNA B cell deletion. *Nature*. 1995; 373:252-55.
- Chen C, Radic MZ, Erikson J. Deletion and Editing of B cells that Express Antibodies to DNA. *J. Immunol*. 1994; 152:1970-82.
- Chiari E, Oliveira AB, Prado MAF, Alves RJ, Galvao LMC, Araujo FG. Potential use of WR 6026 as prophylaxis against transfusion-transmitted. American trypanosomiasis. *Atimicrob. Agentes Chemoter* 1996; 40:613-5.
- Cichutek K. Nucleic acid immunization: a prophylactic gene therapy?. *Vaccine* 1994; 12:1520-25.
- Coney L, Wang B, Ugen EK, Boyer J, Mc Callus D, Srikantan V. Facilitated DNA inoculation induces anti HIV-1 immunity *in vivo*. *Vaccine* 1994; 12:1545-50.
- Conger JD, Pike BL, Nossal GJV. Clonal analysis of the anti DNA repertoire of murine B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984; 84:2931-35.
- Corral RS, Petray PB CpG DNA as a Th1-promoting adjuvant in immunization against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*. 2000;19:234-42. .

- Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Condolio B, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 1974; 49: 13-21.
- Coulie PG, Snick VJ. Rheumatoid Factor (RF) production during anamnestic immune response in the mouse. Activation of RF precursors cells is induced by their interaction with immune complexes and carrier specific helper T cells. *J. Exp. Med.* 1985; 161:88-7.
- Cuna WR, Cuna CR. Characterization of T cell clones from chagasic patients predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90: 503-6.
- Cuyás MC, García J. Tripanosomiasis americana. Enfermedad de Chagas. En: Farrera P, Rozman C. *Medicina Interna*. 13a ed. Tomo 2. España: Editorial Mosby / Doyma, 1995: 2448-51.
- Danko I, Wolff JA. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine* 1994; 12:1499-2.
- Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Caulombe J, Whalen RG. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 733-40.
- Davis HL, Michael LM, Mancini M, Schleef M, Whalen RG. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against. The hepatitis B virus surface antigen vaccine. *Vaccine* 1994; 12: 1503-09.
- Davis HL, Schirmbeck R, Reiman J, Whalen RG. DNA mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1447-56.
- Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. Characterization of humoral responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* 1997; 15: 71-8.
- Desai DD, Krishnan, RM, Swindle JT, Marion TN. Antigen specific induction of antibodies against native mammalian DNA in nonautoimmune mice. *J. Immunol.* 1993;151:1614-26.
- Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. A Trypanosoma cruzi small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med.* 2002;195:401-13.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97:603-12.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu, MA. DNA Vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:617-48.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. Immunization DNA. *J Immunol Meth* 1994; 176: 145-52.
- Edgington SM, Stollar BD. Immunogenicity of ZDNA depends on the size of polynucleotide presented in complexes with methylated BSA. *Mol. Immunol.* 1992; 29:609-17.
- Erikson J, Radic MZ, Camper SA, Hardy RR, Carmack C, Weigert M. Expression of anti DNA immunoglobulin transgenic in nonautoimmune mice. *Nature.* 1991, 349:331-334.
- Escobar S. Megacolon en el adulto. En: Rosner JM, Kawabata M, eds. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud: Enfermedad de Chagas en el Paraguay.* Japón: EFACIM-JICA, 1990:70-1.
- Estévez P, Martínez M. Técnicas seleccionadas de purificación de proteínas. *Manual de Laboratorio.* La Habana. Ed Finlay. 1996; 15-8.
- Fachado A, González JL, Hidalgo C, Torres D, Fonseca L. Expresión of the major surface antigen of *Toxoplasma gondii* in the muscle of BALB/c mice *Biotecnología Aplicada* 1998;15:159-61.

- Feng XG, Lin JJ, Zhu JG, Zhang L, Yuan CX, Cai YM. Protective effect induced by vaccination with a partial cDNA expression library of *Schistosoma japonicum* in mice Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2002;18:231-4.
- Ferrari Y, Levin MJ, Wallukat G, Elies B, Lebesgue D, Chiale P et al. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein PO of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta-1-adrenergic receptor. J Exp Med 1995; 182: 59-5.
- Ferrer JF, Esteban E, Murua A, Gutierrez S, Dube S, Poiesz B et al. Association and epidemiologic features of *Trypanosoma cruzi* and human T cell lymphotropic a virus type II in inhabitants of the Paraguayan Gran Chaco. Am J Trop Med Hyg. 2000;68:235-41.
- Ferrer JF, Galligan D, Esteban E, Rey V, Murua A, Gutierrez S, et al. Hantavirus infection in people inhabiting a highly endemic region of the Gran Chaco territory, Paraguay: association with *Trypanosoma cruzi* infection, epidemiological features and haematological characteristics. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97:269-80.
- Fomsgaard A. Genetisk immunisering *Æn biologiske pendant til kold fusion*. Ugeskr-Laeger 1995; 157: 4932-6.
- Food and Drug Administrations. Points to consider on plasmid DNA vaccine for preventive infectious disease indications. Final draft. December 1996.
- Franco FR, Paranhos BGS, Yamauchi LM, Yoshida N, da Silveira JF. Characterization of a cDNA clone encoding the carboxy-terminal domain of a 90-kilodalton surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. Infect Immun 1993; 61: 4196-201.
- Frank FM, Fernandez MM, Taranto NJ, Cajal SP, Margni RA, Castro E. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. Parasitology. 2003;126:31-9.
- Fu TM, Guan L, Friedman A, Ulmer JB, Liu MA, Donnelly JJ. Induction of MHC class I restricted CTL response by DNA immunization with ubiquitin-influenza virus nucleoprotein fusion antigens. Vaccine 1998; 16: 1711-17.
- Fujimura AE, Kinoshita SS, Pereira-Chioccola VL, Rodrigues MM. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. Infect Immun. 2001; 69:5477-86.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Hynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:11478-482.
- García NM. Desarrollo de un método inmunoenzimático para la detección de anticuerpos contra ADN de doble cadena. Tesis para optar por el Título de Especialista de Inmunología. ISCM. La Habana. 1995.
- Garg N, Tarleton RL Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun. 2002;70:5547-55.
- Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor Editing: An Approach by Autoreactive B Cells to Escape Tolerance. J. Exp. Med. 1993, 117:999-08.
- Gazzinelli TR, Leme CM, Cancado RJ, Gazzinelli G, Sharfstein J. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' Disease. Infect Immun 1990; 58: 1437-44.
- Gentilini M, Duflo B. *Medicine Tropicale*. 3^a ed. Francia: Flanmarion Medicine - Sciences, 1982: 120-25.

- Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 403-50.
- Gherardi MM, Ramírez JC, Esteban M. Towards a new generation of vaccine: the cytokine IL -12 as adjuvant to enhance cellular immune response to pathogens during prime-booster vaccination regimens. *Histol Histopathology*. 2001; 16:655-67.
- Gilkeson GS, Pritchard AJ, Pisetsky DS. Especificity of anti-DNA antibodies induced in normal mice by immunization with DNA. *Clin Immunol. Immunopathology*. 1992;59:288-300.
- Goldemberg S, Mousquer J, De Lima FM, Bonaldo MC. Construction of cDNA libraries. In: Morel, C.M. Ed. *Genes and antigens of parasites. A laboratory manual*. 2. Ed. Río de Janeiro. Fundacao Oswaldo Cruz. 1984; 187-09.
- Goldsmith RS: Infectious disease: Protozoal. In: Schroeder SA; ed. *Current Medical Diagnosis and Treatment*. California: Appleton & Lange, 1991: 536-50.
- Gomes YM, Abath FG, Futardo AF, Regis LN, Nakasawa M, Montenegro LT. A monoclonal antibody against blood forms of *Trypanosoma cruzi* lyses the parasite in vitro and inhibits host cell invasion. *Appl Biochem Biotechnol* 1995; 50: 57-9.
- González CS. *Trypanosoma cruzi*. En: Basualdo JA, Coto CE, De Torres RA. *Microbiología Biomédica*. Buenos Aires: Editorial atlante SRL 1996: 903-14.
- Gonzalez J, Muñoz S, Ortiz S, Anacona D, Salgado S, Gallegillos M. Biochemical, immunological and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* populations of the Andean north of Chile. *Exp Parasitol* 1995; 81: 125-35.
- González MM. Respuestas de ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis*, al reto con promastigotes de la misma especie Instituto Pedro Kourí. Ciudad de la Habana. 2000. Tesis para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Microbiología.
- Graun D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order lagomorpha (Rabbit, hares and allies). *Nature* 1996; 379: 333-35.
- Gruppi A, Cerban F, Pistoresi PMC, Vottero CE. *Trypanosoma cruzi*: transfer of protection by lymph node cells obtained from mice immunized with exoantigens of pl 4.5. *Exp Parasitol* 1995; 80: 382-89.
- Guide for the care and use of laboratory animals. EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 1, Dec.12, 1987.
- Harley JB. Autoantibodies in systemic Lupus Erythematosus. In: Koopman W J. ed. *Arthritis & Allied conditions*. 13 th edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997: 1347-60.
- Harumal P, Morgan M, Walton SF, Holt DC, Rode J, Arlian L. et al. Identification of a homologue of a house dust mite allergen in a cDNA library from *Sarcoptes scabiei* var *hominis* and evaluation of its vaccine potential in a rabbit/*S. scabiei* var. *canis* model. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:54-0.
- Haynes JR. Particled-Mediated Nuclie Acid Vaccination. En Simposium "New trends in Molecular Biotecnology: Basic and Aplied Aspecs". Louvain-La-Neuve. September. 1995.
- Hernández MC, Fernández AM, Alcina A, Fresno M. Characterization of a Glycolyl-Phosphatidylinositol anchored membrane protein from *Trypanosoma cruzi*. *Infec. Immun*. 1991; 59:1409-16.
- Heyneman D, Mc Kerrow HJ. Parasitic Diseases In: Stites PD, Terr IA; eds. *Basic and Clinical Immunology*. 7. ed. California: Appleton & Lange, 1991: 672-81.
- Hoch S, Schur PH, Schwaber J. Frequency of anti DNA antibody producing cells from normal and patients with Systemic Lupus Erytematosus. *Clin. Immunol. & Immunopathol*. 1983; 27:28-7.

- Hoffand R, Boyer MH. Immunology of Chagas' Disease. En: Tizard I. Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis. Boca Ratón (Florida): CRC Press, 1985:145-83.
- Hoffman SL, Sedegah M, Hedstrom RC. Protection against malaria by immunization with a Plasmodium yoelii circumsporozoite protein nucleic acid vaccine. Vaccine 1994; 12: 1529-33.
- Hoft DF, Donelson JE, Kirchhoff LV. Repetitive protein antigens of *Trypanosoma cruzi* have diverse intracellular locations. J. Parasitol. 1995, 81:549-54.
- Holscher C, Hartmann R, Mossmann H, Schaub GA. Effects of the isolation methodology on protein profiles of blood trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 2003;126:41-51.
- Hookey JV, Palmer MF. A comparative investigation and identification of *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae strains by monoclonal antibody and fingerprint analysis. Zbl Bakt 1991; 275: 185-99.
- Inmunidad frente a los parásitos. En: Roitt I. Inmunología: Fundamentos. 9a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1998: 285-94.
- Irwin MJ, Laube SL, Lee V, Austin M, Chada S, Anderson CG. et al. Direct injection of a recombinant retroviral vector induces human immunodeficiency virus-specific immune responses in mice and nonhuman primates. J. Virol. 1994, 68:5036-44.
- Jacoby EM, Schlichting I, Lantwin CB, Kabsch W, Krauth SRL. Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* tripanothione reductaseumepacrine complex. Proteins Struct Funct Genet 1996; 24: 73-0.
- Jensen AT, Curtis J, Montgomery J, Handman E, Theander TG. Molecular immunological characterisation of the glucose regulated protein 78 of *Leishmania donovani*(1). Biochim Biophys Acta. 2001;1549:73-7.
- John RD. Inmunología de los parásitos. En: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS. Harrison: Principios de Medicina Interna. 7ª ed. Volumen 2. México: Interamericana, 1990: 965- 69
- Johnston SA, Barry MA. Genetic to genomic vaccination. Vaccine 1997; 15: 808-809.
- Jutewicz DM, Morin MJ, Robinson HL, Webster RG. Antibody forming cell response to viral challenge in mice immunized with DNA encoding the influenza virus hemagglutinin. J Virol 1995; 69: 7712-15.
- Kahn S, Colbert TG, Wallage JC, Hoagland NA, Eisen H. The major 85 kDa surface antigen of the mammalian stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. Proc Nat Acad Sci USA 1991; 88: 4481-85.
- Katae M, Miyahira Y, Takeda K, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. Infect Immun. 2002 ;70:4833-40
- Katsumi A, Emi N, Abed, A, Hasegawa Y. Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. Hum-Gene-Ther. 1994, 5:11-13.
- Kelly JM, Taylor MC, Rudenko G, Blundell PA. Transfection of the African and American trypanosomes. Methods Mol Biol 1995; 47: 349-59.
- Kenneth EM. Tripanosomiasis Americana. En: Hoeprich PD; ed. Tratado de Enfermedades Infecciosas. Tomo 2. 2a. ed. Ciudad de La Habana: Editorial Científico-Técnico, 1982: 1027-34.
- Khaw M, Panosian CB. Human Antiprotozoal Therapy: Past, present and future. Clin. Microbiol. Rev., 1995, 8:427-39.

- Kim JJ, Nottingham LK, Wilson DM, Bagarazzi ML, Tsai A, Morrison LD. et al. Engineering DNA vaccines via co-delivery of co-stimulatory molecule genes. *Vaccine* 1998; 16: 1828-35.
- Kipnis TL, da Silva WD. Evasion of *Trypanosoma cruzi* from complement lysis. *Braz J med biol Res* 1989; 22: 1-16.
- Kirchhoff LV. Trypanosoma species (American trypanosomiasis, Chagas diseases). *Biology of Trypanosomes*. In: Mandel GL, Douglas Jr, Bennett JE. Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, Churchill Livingstone. 1990; 2077-88.
- Köberle F. Pathogenesis of Chagas' disease. En: *A Ciba Foundation Symposium 20 (new series) Tripanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*. Amsterdam: Elsevier. 1974: 137- 52.
- Kreamer BL, Steaker JL, Sawada N, Sattle GL, His MTS, Pitot HC. Use a low speed, isodensity percull centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparation. *In vitro cell & Develop Biol*. 1986, 201-11.
- Krieg AK, Matson S, Wadschmidt TJ. B cell activation by oligodeoxynucleotides that contain stem-lopp motifs. *Nature*. 1995; 374:46-49.
- Krieg AM. CpG DNA. A Pathogenic factor in system Lupus erythematosus. *Journal of Clinical Immunology*. 1995, 15:284-92. (a)
- Krieg, AM. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol*. 1995, 73-7. (b)
- Krogstad DJ. Protozoarios de la sangre y los tejidos. En: Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B, Guerra H. *Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas*. 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1994: 630-49.
- Lagging LM, Mayer K, Hoft D, Houghton M, Belshe RB, Ray R. Immune response to plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1995; 69: 5859-62
- Lagrange PH, Calabrese KS, Alencar AA, Goncalves da Costa SC. The colonization of cartilage by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. 1992; 87: 115-16.
- Lefkowitz JB, Gilkeson GS. Nephritogenic auto antibodies in Lupus. *Current concepts and continuing controversies*. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 894-03.
- Levin MF, Levitus G, Kerner N. Auto antibodies in Chagas' Heart Disease: Possible markers of severe heart complaint. *Mem inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 539-43.
- Levinson W, Jawetz E. *Microbiología e Inmunología: auto evaluación y repaso*. 2ª ed. México, DF: El Manual Moderno, 1998: 434-436.
- Lewicka K, Breniere CSF, Barnabe C, Dedet JP, Tibayrenc M. An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guinea. *Exp Parasitol* 1995; 81: 20-28.
- Liu MA, McClements WL, Friedman A, Ulmer JV, Shive JW, Donnelly JJ. Immunization of primates with DNA vaccine. *Vaccine* 1996; 14: 876-79.
- Liu R, Enstrom AM, Lam KS. Combinatorial peptide library methods for immunobiology research. *Exp Hematol*. 2003;31:11-30.
- Llanio, N.R. Protozoos. En: Llanio, N.R. ed. *Parasitosis Intestinal*. Ciudad de La Habana, Editorial Pueblo y Educación. 1988; 1:18-21.
- Lowrie DB, Tascon RE, Colston MJ, Silva C. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 1994; 12: 1537-40.

- Lowry DH, Rosebrogh NJ, Farr AL, Randal LJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- Luquetti AO. Practical aspect of Chagas' Disease. *Parasitology Today* 1994;10: 287-88.
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis - splicing of pre-m RNA. *RNA* 2000; 2: 163-69
- Mancini M, Hadchouel M, Davis HL, Whalen RG, Tiollais P, Michel ML. DNA mediated immunization breaks tolerance in transgenic mouse model of hepatitis B surface antigen chronic carriers. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93: 496-01.
- Manoutcharian K, Terrazas LL, Gevorkian G, Govezensky T. Protection against murine cysticercosis using cDNA expression library immunization. *Immunol. Lett.* 1998; 62:131-36
- Marcipar IS, Welchen E, Roodveldt C, Marcipar AJ, Silber AM. Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;220:149-54.
- Marko Z, Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert MB. Lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J. Exp.* 1993, 177:1165-73.
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991-95
- Meira WS, Galvao LM, Gontijo ED, Machado-Coelho GL, Norris KA, Chia E. Trypanosoma cruzi recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease *J Clin Microbiol.* 2002;40:3735-40.
- Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Weiguo Z, Geldmacher C, Biediguer NM. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of cDNA expression library. *Infect Immun.* 2000; 68:5595-02
- Mello de Oliveira JA. Heart aneurysm in Chagas' Disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998; 40: 301-07.
- Messina J, Pippen AM, Pisetsky DS. Induction of cross-reactive antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J. Clin. Invest.* 1995; 95:1398-02
- Metz G, Carlier Y, Vray B. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by INF- γ -preactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite Immunol* 1993; 15: 693-99.
- Michel ML, Davis HL, Schleef M, Mancini M, Tiollais P, Whalen RG. ADN-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection on humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 12: 5307-11.
- Moncayo A. Chagas Disease. *Tropical Disease Research* 1993;52: 67-5.
- Moncayo A. Chagas' Disease: Epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health Stat Qu.* 1992, 45:276-79.
- Montalvo AM, Esteban A, González M, García R, Sarmiento ME, Acosta A. Construcción de una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis* y su expresión en músculo de ratones BALB/c. *Rev Cuban Med Trop* 2001; 53: 154-60.
- Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, Perry HC, Friedman A, Martínez D.I. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: Optimization of vectors. *DNA Cell Biol.* 1993, 12:777-83.
- Mor G, Singla M, Steinberg AD, Hoffman SL, Okuda K, Klinman DM. Do DNA Vaccine induce Autoimmune Disease. *Human Gene. Therapy* 1997; 8:293-00.
- Nemazee D, Sato VL. Induction of rheumatoid antibodies in the mouse, regulated production of auto antibody in the secondary humoral response. *J. Exp. Med.* 1988; 158:529-45.

- Nemazee D. immune complexes can trigger specific T cell dependent auto anti-IgG antibody production in mice. *J. Exp. Med.* 1985; 161:242-50.
- Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ Potential DNA vaccine integration into host cell genome *Ann. NY: Acad. Sci* 1995; 772:30-9.
- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R Licea T, Sotolongo F. Sensibilización de placas para ensayos inmuno-enzimáticos con antígenos vacunales enzimáticos. *VacciMonitor* 2001; 3:14 –17
- Olivares FE, Vray B. Relationship between granulocyte macrophage colony stimulating factor, tumor necrosis factor alpha and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. *Parasite Immunol* 1995; 17: 135-41.
- Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol.* 2002; 168:6366-74.
- Ouassi MA, Taibi J, Cornette J, Velge P, Marty B, Loyens M. et al. Characterization of major surface and *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitol* 1990; 100: 115-24.
- Ouyang L, Yi X, Zeng X, Zhou J, Wang Q, McReynolds L. Partial protection induced by phage library-selected peptides mimicking epitopes of *Schistosoma japonicum*. *Chin Med J Engl.* 2003;11:138-41.
- Paiva CN, Pyrrho AS, Lannes-Vieira J, Vacchio M, Soares MB, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi* sensitizes mice to fulminant SEB-induced shock: overrelease of inflammatory cytokines and independence of Chagas' disease or TCR Vbeta-usage. *Shock.* 2003;19:163-8.
- Pardoll DM, Beckerleg AM. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity* 1995; 3 :165-68.
- Pérez-Duque GA, Escarlanteg R, Sousa-Junior AH, Haber GA. Carlos Chagas and Chagas disease. *Gen* 1995; 49: 179-88.
- Pérez-Fuentes R, Guegan JF, Barnabe C, Lopez-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Briones B. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol.* 2003;33:293-9
- Petri K, Eisen H. Chagas' disease: A model for the study of autoimmune diseases. *Parasitology Today.* 1989; 5: 111-6.
- Piedrafita D, Xu D, Heenter R A, Harrinson F, Liew F Y. Protective immune response induced by vaccination with an expression library of L major. *J Immunol* 1999, 163: 1467-72.
- Pitcovsky TA, Buscaglia CA, Mucci J, Campetella O. A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *J Infect Dis.* 2002;186:397-04.
- Planelles L, Thomas MC, Alonso C, Lopez MC. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun.* 2001;69:6558-63.
- Plorde JJ. Tripanosomiasis. En: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS. Harrison: Principios de Medicina Interna. 7ª ed. Volumen 2. México: Interamericana, 1990: 965- 69.
- Prata A. Tripanosomiasis Americana. En Goldsmith R, Heyneman D. Parasitología y Medicina Tropical. 1ª ed. México, DF: El Manual Moderno, 1995: 346-48.
- Quan YZ, Spitalnik SL, Cheng J, Erikson J, Wojczyk B, Ertl HC. Immune response to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology.* 1995; 209:569-79.

- Recommended Procariotic Protocol. IBI gene Zapper 450/2500 Electroporation System Cat No 9100.
- Rey L. Parasitología. 2a ed. Río de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1991: 128-37.
- Rhodes GH, Dwarki VJ, Abai A, Felgner J, Felgner PL, Gromkowski SH. Injection of expression vectors containing viral genes induces cellular, humoral and protective immunity. In: Ginsberg, HS, Brown F, Chanock RM, Lerner RA. Eds. Vaccines 93. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993; 137-41.
- Rizzo NR, Arana BA, Diaz A, Cordon-Rosales C, Klein RE, Powell MR. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among school-age children in the endemic area of Guatemala. Am J Trop Med Hyg. 2003;68:678-82.
- Robertson J. Guidelines for assuring the quality of DNA vaccines. WHO Technical Report Series. 1998; 878:77-90
- Robertson JS. Safety consideration for nucleic acid vaccines. Vaccine. 1994; 12: 1526-81
- Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a hemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine 1993; 11:957-60.
- Rodríguez MM, Soares MB, Vasconcelos JR. Endogenous interleukin-4 downregulates the type 1 CD4 T cell-mediated immune response induced by intramuscular DNA immunization. J Interferon Cytokine Res. 2002; 22:1137-41.
- Rodríguez JB, Gros EG. Recent developments in the control of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent for Chagas's disease. Curr. Med. Chem. 1995, 2:723-42.
- Rojas de Arias A. La investigación de la Enfermedad de Chagas en el Paraguay. En: Enfermedades Tropicales en Guatemala. Memorias del I Seminario Internacional de Enfermedades Tropicales; 1992 Abril 7-10. Japón: Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), 1992; 105-07.
- Rottenberg ME, Riente A, Sporrang L, Altcheh J, Petray P, Ruiz AM. et al. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and / or CD8. Immunol Lett 1995; 45: 53-0.
- Ruel BJ, Dawson BD, Tewani D, Fouts DL, Manning JE. Expression and evolution of member the *Trypanosoma Cruzi* trypomastigote surface antigen multigene family. Mol Biochem Parasitol 1994; 63: 109-20.
- Ruiz ML, Bijovsky AT, Pudles J, Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi* monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone. Exp. Parasitol. 1995; 80:605-15.
- Saez-Alquezar A, Murta M, Pereira Marques W, Rodrigues da Silva G. The results of an external quality control program for serological screening for antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood donors in Brazil Rev Panam Salud Publica. 2003;13:129-37.
- Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2 Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; 1.2- 6.34
- Sánchez C.M. Desarrollo de un método inmunoenzimático para la detección de Factor Reumatoideo en la Artritis Reumatoide. Tesis para optar por el Título de Especialista de Inmunología. La Habana. 1995.
- Sánchez-Guillen MC, Barnabe C, Guegan JF, Tibayrenc M, Velasquez-Roja M, Martínez-Munguía J. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the State of Puebla, a non-endemic area of Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:947-52

- Santos-Buch CHA, Acosta AM. Pathology of Chagas' Disease. En: Tizard I. Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis. Boca Ratón (Florida): CRC Press, 1985:145-183.
- Schnapp AR, Eickhoff CS, Scharfstein J, Hoft DF. Induction of B- and T-cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 2002;4:805-13. (b).
- Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore D, Curtiss R 3rd, Hoft DF. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect Immun.* 2002;70:5065-74. (a)
- Schofield JP, Caskey CT. Non-viral approaches gene therapy. *British Medical Bulletin.* 1995; 51:56-0
- Schrevel J, Millerioux V, Sinou V, Frappier F, Santus R, Grellier P. New trends in chemotherapy on human and animal blood parasites. *Parasitol. Res.* 1996, 82:283-4.
- Sepulveda BS, Cassels BK. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.* 1996; 62:98-05.
- Sepulveda P, Hontebeyrie M, Liegeard P, Mascilli A, Norris KA. DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 2000;68:4986-91.
- Shabaan AM, Mohamed MM, Abdallah MS, Ibrahim HM, Karim AM Cloning and characterization of a *Schistosoma mansoni* 1H and 30S clones as two tegumental vaccine candidate antigens. *Acta Biochim Pol.* 2003;50:269-78. .
- Shirmbeck R, Bohm W, Ando K Chisari FV, Reimann J Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen specific cytotoxic T lymphocytes in no responder mice *J Virol* 1995; 69: 5929-35
- Shiver JW, Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. Humoral and cellular immuniteies elicited by DNA vaccines:aplication to the human immunodeficiency virus and influenza. *Adv Drug Delv Rev.* 1996; 21:19-31.
- Shoenfeld Y, Blank M, Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R. Manipulation of autoimmune diseases with T suppressor cells: lessons from experimental SLE and EAE. *Immunol Letters.* 1993, 36:109-16.
- Siegrist CA. Potential adventages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization *Vaccine.*1997; 15:798-00.
- Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon activated macrophages. *Infect Immun* 1995; 63: 4862-7.
- Siqueira BR, Menezes QLE. Acute Chagas' Disease: Clinic, Diagnosis and treatment. *Arq Bras Med* 1995; 69: 171-3.
- Sizemore DR, Brenstrom AA, Sadoff JC. Attenuated *Shigella* as a DNA vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 1995; 270: 299-04
- Smith HA. Regulatory considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* 1994; 12: 1515-19.
- Solana ME, Katzin AM, Umezawa ES, Miatello CS. High specificilty of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas' Disease. *J Clin. Microbiol* 1995; 33: 1456-60.
- Souto PT, Campetella O, Cazzulo JJ, de Souza W. Cysteine proteinasas in *Trypanosoma cruzi* immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci* 1990; 96: 485-90.
- Stollar, B.D. Immunochemistry of DNA. *Intern. Rev. Immunol.* 1989, 5:1-22.

- Tambourgi DV, Cavinato RA, Díaz de Abreu CM, Peres BA, Kipnis TL. Detection of trypanosoma-decay accelerating factor antibodies in mice and humans infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 516-20.
- Tan, E.M. Antinuclear Antibodies. Diagnostic Markers for Autoimmune diseases and Probes for Cell Biology. *Adv. Immunol.* 1984, 44:93-51.
- Tan, E.M. Auto antibodies to Nuclear Antigens (ANA). Their Immunobiology and Medicine. *Adv. Immunol.* 1982, 33:167-40.
- Tang DC, Devit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356: 152-54.
- Tanghe A, D' Souza S, Rosseels V, Denis O, Ottenhoff TH, Dalemans W, Wheeler C, Huygen K. Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting. *Infection and Immunology* 2001; 69:3041-47.
- Tarkoski A, Czerkinski C, Nilsson LA. Simultaneous induction of rheumatoid factor and the antigen specific antibody secreting cells during the secondary immune response in mice. *Clin Exp Immunol* 1985; 61: 379-87.
- Taverne J. Immunity to Protozoa and Worms. In: Roitt ML, Brostoff J, Male KD; eds. *Immunology*. 2a ed. London: Gower Medical Publishing, 1989: 17.1-19.
- Teixeira A.R. Chagas' disease. Trends in immunological research and prospects for immunoprophylaxis. *Bulletin of the World Health Organization*. 1979, 57:697-10.
- Teixeira SM, Vieira LQ, Gazzinelli RT. Genomics, pathogenesis and control of infection with protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 2002;18:52-4.
- Teixeira AR, Argañaraz ER, Freitas LH, Lacava ZGM, Santana JM, Luna H. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mutation research* 1994; 305:197-09.
- Tomlinson S, Raper J. Natural Human Immunity to Trypanosomes. *Parasitology today* 1998; 14: 354-59.
- Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U, Nussenzweig V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitol* 1995; 110: 547-54.
- Tomoyoshi N, George Am. Effects of 3' unrelated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1995;75:55-67
- Tsang VC, Peralta JM, Simons AR. Enzyme linked immunotransfer blot technique (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 1983; 92: 377-91.
- Tsao BP, Chow A, Cheroute H, Song Yw, McGrath ME, Kronenberg, M. B cells are allergic in transgenic mice that express IgM anti DNA antibodies. *Eur. J. Immunol.* 1993, 23:2332-39.
- Turner CW, Lima MF, Villalta F *Trypanosoma cruzi* uses a 45-kDa mucin for adhesion to mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290:29-4.
- Ugen KE, Nyland SB, Boyer JD, Vidal C, Lera L, Rasheid S. et al. DNA Vaccination with HIV-1 expressing constructs elicits immune responses in humans. *Vaccine* 1998; 16: 1818-21.
- Ulmer JB, Deck RR, Witt MC, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MM. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine* 1994; 12: 1541-44.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgener PL, Dwarki VJ. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993, 259:1745-9.

- Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, da Silveira JF. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*. 2003 ;43:91-7.
- Unterkircher C, Avrameas S, Ternynck T. Autoantibodies in the sera of *Trypanosoma cruzi* infected individuals with or without clinical Chagas' Disease. *J Clin Lab Ana*. 1993; 7: 60-9.
- Valenzuela JG, Ribeiro JM. Purification and cloning of the salivary nitrophorin from the hemipterian *Cimex lecturalius*. *J Exp Biol* 1998; 201:2659-64.
- Velasco O, Guzmán C, Ibañez S. Enfermedad de Chagas. En: Valdespino JL, Velasco O, Gutiérrez A, Del Río A, Ibañez S, Magos C. Enfermedades Tropicales en México: Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. México: Inst. Nac. de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, 1994;279-91.
- Velázquez CJ. Clínica y Terapéutica en la Enfermedad de Chagas. En: Rosner JM, Kawabata M, eds. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud: Enfermedad de Chagas en el Paraguay. Japón: EFACIM-JICA, 1990:70-81.
- Vera-Cruz JM, Magallon-Gastelum E, Grijalva G, Rincon AR, Ramos-Garcia C, Armendariz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res*. 2003;89:480-6
- Vergara V, Lorca M, Engstrom A, Veloso C. Serum antibodies against synthetic peptides from *Trypanosoma cruzi* antigens in Chagas' Disease patients. *Inmunología* 1995; 14: 1-4.
- Villar JC, Marin-Neto JA, Ebrahim S, Yusuf S. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 1:CD003463.
- Vogel FR, Sarver N. Nucleic Acid Vaccines. *Clinical Microbiology. Reviews*. 1995; 8:406-10.
- Waite GJ, Mc Manus DP. Nucleic Acids. Vaccine of the Future. *Parasitol Today* 1995, 11:133-6.
- Wang B, Merva M, Dang K, Ugen KE, Williams WV, and Weiner DB. Immunization by direct DNA inoculation induces rejection of tumor cell Challenge. *Human Gene Therapy* 1995; 6:407-11
- Wang B, Merva M, Dang K, Ugen KE, Williams WV, Weiner DB. ADN inoculation induces protective in vivo immune responses against cellular challenge with VIH-1 antigen-expressing cells. *AIDS RES Hum Retroviruses* 1994; 2: 35-41.
- Webster RG, Fynan EF, Santoro JC, Robinson H. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* 1994; 12: 1495-1498.
- Welch MJ, Fong S, Vaughan JH, Carson DA. Increased frequency of rheumatoid factor precursor B Lymphocytes after immunization of normal adults with tetanus-toxoid. *Clin & Exp. Immunol*. 1983, 51:299-05.
- Whalen RG, Leclere C, Deriaud E, Shirmbeck R, Reimann J, Davis HL. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen. Activation and entrainment of the immune response. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 772: 64-76.
- Will H, Cattaneo R, Koch HG. Clon HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees *Nature* 1982; 299:740-42
- Wilson ME. Profiles of infections. In: Wilson ME; ed. *A world guide to infections: Diseases, Distribution, Diagnosis*. New York: Oxford University Press Inc., 1991: 675-76.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsado G, Williams P, Jani A. Long term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 363-69.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgnar PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-68

- World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases (CTD). Control of Tropical Diseases. Chagas Diseases. Geneva: OMS, 1996.
- Wrightsman RA, Miller MJ, Saborio JL, Manning JE. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 1995, 63:122-5.
- Wu JY, Riggin CH, Seals JR, Murphy CI, Newman MJ. "in vitro" measurement of antigen specific cell-mediated immune responses using recombinant HIV-1 protein adsorbed to latex microspheres. J. Immun. Meth. 1991; 143:1-9.
- Xiang Z, Ertl HC. Manipulation of the immune response to a plasmid- encode viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. Immunity 1995; 2: 129-33
- Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HCJ. Vaccination with plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. Virology 1994; 199: 132-34
- XII Annual Meeting Research in Chagas Disease and XI Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1995; 90, suppl: 1-312.
- Xu D, Liew FY. Genetic vaccination against leishmaniasis. Vaccine 1994; 12: 1534-36.
- Yokoyama M, Zhang J, Whitton JL. DNA immunization confers protection against lethal Lymphocyte choriomeningitis virus infection. J virol 1995; 69: 2684-88.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS RELACIONADAS CON EL TEMA:

- **Alberti E**, Acosta A, Sarmiento ME, y cols. Specific Cellular and Humoral Immune Response in BALB/c Mice Immunized with a Expression Genomic Library of *T cruzi* **Vaccine** 1998; 6:608-12
- **Alberti E**, Acosta A., Sarmiento ME y cols. Respuesta humoral en ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi* . **Rev Cub. Med Trop** 1999; 51:620-5
- **Alberti E**, Acosta A , Sarmiento ME y cols. Evaluación de la respuesta humoral por Western Blot en ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca genómica de *Tripanosoma cruzi* . **Rev . Cub Med Trop** 2001; 53:703-6
- **Alberti E**. *Tripanosoma* spp, en Microbiología y Parasitología Médica Tomo III, ed. Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL , Edición Ciencias Médicas. Ciudad de la Habana. Capitulo 81. 2001; 50-68.
- Munster A., **Alberti E**, Acosta A y cols. Evaluación de algunos marcadores autoinmunes serológicos en ratones BALB/c inmunizados con ácidos nucleicos de *Neisseria meningitides* y *Trypanosoma cruzi* **Advances in Modern Biotechnology** 1997; 4: V32
- **Alberti E**, Acosta A. Sarmiento M, y cols. Expresión de Antígenos de *Trypanosoma cruzi* en músculos de ratones BALB/c inmunizados con una librería genómica de expresión **Vaccimonitor** enero (1) 2-4, 1997

- Vidal T, **Alberti E**, Acosta A, y cols. Respuesta linfoproliferativa a antígenos solubles de *Trypanosoma cruzi* en ratones BALB/c inoculados con una librería genómica de expresión Vaccimonitor. septiembre (9) 2-4,1996
- Ruíz E A, **Alberti A E**, Montalvo AAM, Acosta DA, García MR, Martínez BM, Sarmiento Garcia-San Miguel ME e Izquierdo L. Evaluación de la inmunogenicidad y protección inducida ratones Balb/c inmunizados con una Biblioteca Genómica de Expresión de Trypanosoma cruzi **Revista Panamericana de Infectología** 2004 (Coautoría) (En prensa)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS RELACIONADAS INDIRECTAMENTE CON EL TEMA

- Vidal, T; Hidalgo , C; **Alberti, E** y cols. Respuesta linfoproliferativa frente a proteínas de la vacuna cubana antimeningococcica en ratones BALB/c inmunizados con una librería genómica de expresión. **Vaccimonitor**. 1: 2-4. 1997.
- Hidalgo, C; Acosta , A; López, M.R; Sarmiento, M.E; **Alberti, E** y cols. Inmunización con ADN; Respuesta humoral y celular específica contra *N meningitidis* tipo B. **Advances en Modern Biotechnology**. 1997; 4: V32.
- Montalvo AM, **Alberti E** y cols. Construcción de una Biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis* y su expresión en músculo de ratones BALB/c. **Rev Cub Med Trop** 2001.;53: 154-60
- Montalvo AM, **Alberti E**. Significant and transitory control lesion`s development in mice immunized with a genomic library of *Leishmania amazonensis* . **Revista Brasileira de Patologia Tropical** 2002;31: 10-4.

La mayor parte de los resultados incluidos en estas tesis han servido en la formación de residentes de inmunología y microbiología, han sido publicados y presentados en eventos nacionales e internacionales y algunos han sido premiados por la Academia de Ciencias de Cuba y en el Forum Ramal Nacional de Salud.

Trabajos de Terminación de residencia:

- Respuesta inmunespecífica celular y humoral en ratones BALB/c inmunizados con una librería genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi* . Tesis para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Inmunología de la Dra Mignelis Padilla Rivas. La Habana 1996. Tutor
- Determinación de anticuerpos antinucleares y factor reumatoideo en ratones inmunizados con ácidos nucleicos. Tesis para optar por el título de especialista de Primer Grado en Inmunología de la Dra Marulin Peña La Habana 1996. Asesor
- Construcción y Evaluación de la Inmunogenicidad y protección inducida en ratones BALB/c por una genoteca de *Trypanosoma cruzi* Tesis para optar por el título de especialista de Primer Grado en Microbiología de la Dra Aniran Ruiz Espinosa La Habana. 2000. Tutor
- Evaluación de la respuesta humoral por Western Blot en ratones BALB/c inmunizados con una librería genómica de *Trypanosoma cruzi*. Tesis para optar por el título de Maestro en Parasitología de la Dra Aniram Ruiz Espinosa La Habana 2001.Tutor
- Respuestas de ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca genómica de expresión de *Leishmania amazonensis* al reto con promastigotes de la misma especie. Tesis para optar por el título de

Especialista de Primer Grado en Microbiología de la Dra Marta M González Elías. Ciudad de la Habana 2001 Tutor

- Expresión de antígenos de *Leishmania amazonensis* en músculos de ratones inmunizados con una biblioteca genómica de expresión Tesis para optar por el título de Maestro en Parasitología de la Dra Marta M González Elías. Ciudad de la Habana 2001 Tutor

Presentaciones nacionales e internacionales

- **Alberti E**, Acosta A, Sarmiento ME, Fachado A, Fonte L, Hidalgo C, y col. Construcción y Evaluación de la Inmunogenicidad y protección inducida en ratones BALB/c por una genoteca de *Trypanosoma cruzi* Second National Workshop on Cellular Immunity at Finlay Institute. January 1994.
- **Alberti E**, Acosta A, Sarmiento ME, Fachado A, Fonte L, Hidalgo C, y cols. Respuesta inmuno-específica celular y humoral en ratones BALB/c inmunizados con una librería genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. XIII Latin American Congress of Parasitology. Havana Cuba November 17-23 , 1997
- **Alberti E**, Acosta A, Sarmiento ME, Fachado A, Fonte L, Hidalgo C, y cols Evaluación de algunos marcadores serológicos autoinmunes en ratones BALB/ inmunizados con ácidos nucleicos de *Trypanosoma cruzi* Biotecnología 97. la Habana 1997.
- **Alberti E**, Acosta A, Sarmiento ME, Fachado A, Fonte L, Hidalgo C, y cols. Evaluación de la respuesta humoral y celular específica y de algunos marcadores de autoinmunidad en ratones BALBc inmunizados con una librería genómica de *Trypanosoma cruzi* XIII Latin American Congress of Parasitology. Havana Cuba November 17-23 , 1997
- **Alberti E**, Acosta A, Sarmiento ME, Fachado A, Fonte L, Hidalgo C, cols. Construcción y Evaluación de la Inmunogenicidad y protección inducida en ratones BALB/c por una genoteca de *Trypanosoma cruzi*. First Congress Latin- American of Screening Neonatal and Metabolic diseases, First Meeting International of Immunodiagnostic, and III Meeting National of Immunoassays. Cuba September 1997.
- **Alberti E**, Acosta A, Sarmiento ME, Fachado A, Fonte L, Hidalgo C, y cols. Construcción y Evaluación de la Inmunogenicidad y protección inducida en ratones BALB/c por una genoteca de *Trypanosoma cruzi* III National Congress V Workshop Latin American of Hematology Immunology and Hemotherapy Havana Cuba November 1997.

- **Acosta A, Alberti E,** Sarmiento ME, Fachado A, Fonte L Hidalgo C y cols. Immunization with DNA of different Microorganisms. Workshop of Immunology and Emerging Diseases. Jerusalem, Israel. 24-31 July 1998
- **Alberti E,** Acosta A, Sarmiento ME, Fachado A, Fonte L, Hidalgo C, y cols Evaluación de la respuesta humoral y celular específica y de algunos marcadores de autoinmunidad en ratones BALB7c inmunizados con una librería genómica de *Trypanosoma cruzi*. V National Congress of Physiology Cuba November 1998 (DNA vaccines).
- **Alberti E** . Course Signal Transduction Pathways in Host and Parasite Cells. Evaluación de la respuesta humoral por Western Blot en ratones BALB/c inmunizados con una librería genómica de *Trypanosoma cruzi*. 2000. INGEBI. Buenos Aires. Argentina.
- **Alberti E** Workshop. Signal Transduction Pathways in Host and Parasite Cells. 2000. Evaluación de la respuesta humoral por Western Blot en ratones BALB/c inmunizados con una librería genómica de *Trypanosoma cruzi*. Cristal Palace. Buenos Aires. Argentina.

Premios:

Premio de la Academia de Ciencias de Cuba.

Evaluación de la respuesta humoral y celular específica y de algunos marcadores de autoinmunidad en ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. La Habana . 1998. **Alberti E y cols** autor principal

Forum Ramal Provincial. Trabajo premiado como relevante

Evaluación de la respuesta humoral y celular específica y de algunos marcadores de autoinmunidad en ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. La Habana 1999. **Alberti E y cols** autor principal