

PERSPECTIVAS DE LAS VACUNAS INVERSAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS



SOLANLLY PAOLA MÉNDEZ MARTÍNEZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

BACTERIÓLOGA Y MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ, NOVIEMBRE 19 DE 2010**

PERSPECTIVAS DE LAS VACUNAS INVERSAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Dra Ingrid Schuler, Ph.D

Decana académica

Facultad de Ciencias

Dra Luz Amparo Maldonado, Bact

Directora

Carrera Bacteriología

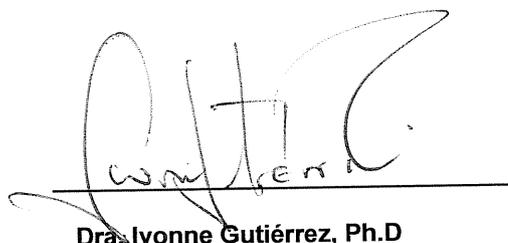
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA
INDUSTRIAL
BOGOTÁ, NOVIEMBRE 19 DE 2010**

**PERSPECTIVAS DE LAS VACUNAS INVERSAS
EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**



Dr Hugo Díez, Ph.D

Director



Dra. Ivonne Gutiérrez, Ph.D

Jurado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA
INDUSTRIAL
BOGOTÁ, NOVIEMBRE 19 DE 2010

**PERSPECTIVAS DE LAS VACUNAS INVERSAS
EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Claudia Cuervo P.

Dra Claudia Cuervo, Ph.D

Jurado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA
INDUSTRIAL
BOGOTÁ, NOVIEMBRE 19 DE 2010

NOTA DE ADVERTENCIA:

Artículo 23 de la resolución N°13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por la esperanza que me mueve y que me da felicidad, Por mostrarme la luz para prepararme y cumplir la misión que me encomendó.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que siempre han valorado mi trabajo y de alguna manera me han brindado su apoyo en el momento oportuno. A mis queridos profesores y amigas que dejaron en mí mucho más que los conocimientos. Al Dr. Hugo Diez por todas sus enseñanzas, paciencia y confianza.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	2
2.	PRESUPUESTOS TEÓRICOS	3
3.	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	4
	3.1. Formulación del problema	
	3.2. Justificación	
4.	OBJETIVOS	5
	4.1 Objetivo general	
	4.2 Objetivos específicos	
5.	MÉTODOS	
	5.1 Tipo de investigación	6
	5.2 Población de estudio	
	5.3 Proceso de selección	
	5.4 Criterios de selección de la información	
	5.5 Estrategia de búsqueda y recolección de información	
6.	RESULTADOS ESPERADOS	
	6.1 Criterios de selección de la información	7
	6.2 Vacunas de ADN en la enfermedad de Chagas	
	6.3 Bioinformática y la molécula idónea para vacunación	
	6.4 metodología de vacunas inversas y proceso de inmunización	
7.	DISCUSIÓN	22
8.	CONCLUSIÓN Y SUGERENCIAS	23
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
10.	ANEXOS	33

#

PERSPECTIVAS DE LAS VACUNAS INVERSAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

RESUMEN

En la enfermedad de Chagas existe un elevado número de investigaciones, informes, y ensayos sobre vacunación utilizando como antígeno (Ag) cepas virulentas, diferentes formas de cepas atenuadas, parásitos completos, fracciones subcelulares y Ags específicos. Estos ensayos han tenido un relativo éxito en la caracterización antigénica de las moléculas en experimentos *In Vitro* y en *Ex vivo*, sin embargo, no se tiene una molécula idónea candidato a la vacunación, pues los resultados *In vivo* son poco alentadores, existe el inconveniente que en modelos animales no se ha podido reproducir la Enfermedad de Chagas en su fase crónica, y adicionalmente los diseños experimentales manejan muchas variables que dificultan su ejecución (Camargo., 2009). Es en este punto cuando las herramientas bioinformática son de gran utilidad en la predicción de péptidos que potencialmente pueden ser utilizados como candidatos a vacunas. De 200 artículos revisados solo 37 cumplían con los criterios de inclusión donde se observar que la obtención de Ags por técnicas de biología molecular y de ADN recombinante ha permitido clonar, expresar y producir diferentes antígenos de *T. cruzi* (Ibáñez., 1987), que se han utilizado con fines de inmunización y vacunación en modelos murinos, tales como la cisteína proteínasa (cruzipain), las proteínas ASP-1, ASP-2 y TSA-1, la trans-sialidasa (TS), entre otros, obteniéndose respuestas inmunes efectoras a nivel de anticuerpos, citotoxicidad, proliferación linfocitaria pero es muy pobre la respuesta en presentación antigénica e inmunoprotección (Rodríguez., 2002). Además de todos los adelantos a nivel de vacunación, la bioinformática también a ayudado a la búsqueda de información determinando así por ejemplo, la capacidad infecciosa de un microorganismo que viene contenida en su información genética ampliamente conocida y estudiada en muchos de estos incluyendo *T. cruzi*, el estudio a fondo de los mismos permite inferir las características de la enfermedad. (Betancor y colaboradores., 2000).

1. INTRODUCCION

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es un protozooario hemoflagelado de la familia Trypanosomatidae agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la cual afecta 108 millones de personas en el mundo (OMS/OPS 2006) y se encuentra distribuida en 15 países endémicos de América Latina, entre ellos Colombia (OMS 2002) donde el número de casos anuales nuevos por transmisión vectorial es de 5.250 aproximadamente, 4.792.000 personas están expuestas al riesgo, 436.000 están infectadas y de ellas 131.500 evolucionan a cardiomiopatía chagásica crónica (OMS/OPS 2006). La mayor parte de los Géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son patógenos humanos y animales que se transmiten mediante vectores de insectos (Morell., 2005). El impacto de la enfermedad en la población se refleja principalmente en que disminuye sustancialmente la calidad de vida y capacidad de trabajo del individuo, y en las repercusiones económicas en los sistemas de salud donde el costo de prevención y tratamiento en un país como el nuestro se encuentra aproximadamente en 1.028 dólares anuales por paciente y 11.619 dólares para el tratamiento de por vida para un solo paciente (Castillo y Riquelme., 2008). Si bien los tratamientos disponibles como el benzonidazol (Rochagán®) y el nifurtimox (Lampit®) son efectivos en la fase aguda de la enfermedad (Marín-Neto et al., 2008, Villar., 2002), los índices de parasitemia bajan considerablemente en los sintomáticos crónicos ya que los efectos colaterales especialmente la toxicidad en riñón e hígado aún persisten (Altcheh, 2005), y se siguen presentando casos de refractariedad al tratamiento (De Castro., 2006) como resistencia "In Vitro" e "In Vivo" al medicamento por parte del parásito (Dos Santos et al., 2008, Nogueira et al., 2009,). Debido a esta problemática, los programas de salud pública han implementado estrategias de prevención a nivel del control vectorial, el tamizaje en bancos de sangre, control de los trasplantes de órganos, el seguimiento del hijo de madre chagásica, y de manera alterna los grupos de investigación han empezado a evaluar moléculas que potencialmente pueden ser usadas como vacunas o inmunomoduladores (Camargo., 2009). Con los avances en Bioinformática, biología molecular y las aplicaciones tecnológicas como el ADN recombinante entre otras, se abren las perspectivas de utilizar como vacunas moléculas de ADN dada la facilidad de expresar antígenos "in vivo" para generar una respuesta inmune protectora (Motta., 2009). Este trabajo pretende presentar de manera crítica y objetiva, una revisión sobre los avances logrados en vacunas moleculares y el verdadero alcance que pueden tener las vacunas de ADN (llamadas vacunas inversas) en la Enfermedad de Chagas.

2. PRESUPUESTOS TEORICOS

T. cruzi es el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. La transmisión se realiza a través de diversos mecanismos como el vectorial por insectos hematófagos de la familia

Reduviidae, subfamilia triatominae y género *Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastronylus*, por vía transparentaría, transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, leche contaminada y hay reportes por accidentes de trabajo (OMS., 2002, Michailowsky., 2003). Clínicamente la enfermedad se caracteriza por tener diferentes fases. La fase inicial o aguda es autolimitada caracterizándose por signos inespecíficos de carácter inmunológico como fiebres, adenopatías y en algunos casos (30%) es posible observar el llamado Chagoma o síndrome de Romaña. Para que la infección se establezca en un hospedero, es necesario que existan las condiciones adecuadas y que el parásito logre superar los mecanismos extra e intracelulares del hospedero (Palau., 2000) y por ello solo un 30% de los casos agudos pasa a desarrollar la siguiente fase subclínica, mal llamada indeterminada por algunos autores, que se caracteriza por ser una fase silente donde el único patrón clínico reiterativo es la seropositividad ante pruebas de laboratorio y presencia de alteraciones electrocardiográficas (arritmias y taquicardias). A su vez, de esta fase un 36% de infectados pasan a la tercera fase o crónica, en la cual desarrollan miocardiopatías y problemas digestivos (Perdigao., 2002). Uno de los principales retos en Colombia consiste en prestar más apoyo y reforzar las capacidades nacionales y regionales para alcanzar el objetivo de eliminar la Enfermedad de Chagas como problema de salud pública, aunque no se ha podido erradicar del todo existen diferentes tratamientos que se han venido utilizando alrededor de hace unos 40 años donde se experimento mas de cien compuestos de los cuales solo el nifurtimox Lampit®, (NFX) y benzonidazol Rochagán ® (BNZ) han mostrado una buena respuesta contra la enfermedad, pero también mostrando a su vez reacciones adversas al medicamento (RAM) como son manifestaciones dermatológicas por hipersensibilidad, gastrointestinales, neurotoxicidad periférica y mioartralgias, con menor frecuencia se han registrado elevaciones en las concentraciones plasmáticas de las transaminasas hepáticas y excepcionalmente alteraciones hematológicas como trombocitopenia (Sosa., 2004, Kubata., 2002, Apt B 2008, Romanha., 2010). Sin embargo, estudios alrededor de los 90 en diferentes países Latinoamericanos mostraron que el tratamiento en niños y adultos jóvenes hasta los 20 años de edad, lograron un 60% de la curación de la infección previniendo de esta manera el desarrollo de cronicidad de la infección (Guhl 2005). Como se han presentado RAM se han implementado sustancias para disminuir dichos efectos y así tener mejores resultados como lo es el ácido tióctico (AT) el cual es antioxidante y su función es secuestrar radicales libres, los cuales son generados en gran medida por la acción del BNZ sobre las células del huésped más algunos pacientes resultan refractarios al AT (Sosa., 2004). Es por esto que el tratamiento para la fase sintomática crónica avanzada de la Enfermedad de Chagas generalmente se limita al manejo de las complicaciones asociadas con la patología encontrada en el corazón y los órganos digestivos, y hace necesario la implementación de programas eficientes de prevención como la vacunación (Reyes., 2005).

No existe para la enfermedad de Chagas un programa oficial de prevención por vacunación debido a la cronicidad de la infección y al propio del ciclo de vida de *T. cruzi*. (Katae., 2002, Rottenberg, 1995). Se han identificado diferentes marcadores antigénicos del parásito que podrían ser utilizados como inmunógenos protectores, que van desde el uso de parásitos completos muertos por métodos físicos o químicos, cepas atenuadas por varios pases en cultivo, por tratamiento con agentes farmacológicos o por radiación ionizante, antígenos purificados, proteínas inactivadas y diferentes estudios “*In vitro*”, “*Ex vivo*”, “*In vivo*” han logrado caracterizar moléculas como inmunomoduladores o candidatos potenciales a vacunas, siendo los más relevantes los estudios realizados en la glicoproteína gp60, las trans/sialidasas, la proteína Tc52, la cisteínil proteínasa, la proteína del choque térmico de 70Kda HSP70 también muy estudiada en *Trypanosoma rangeli* (Cuervo., 2004), el antígeno flagelar Rod el cual induce respuesta inmunitaria protectora (Luhrs., 2003), el antígeno de superficie de los tripomastigotes (TSA), y la proteína de superficie del kinetoplasto KMP-11, encontrándose que cumplen un importante papel antigénico dentro de la enfermedad pero que aún no reúnen las características suficientes para ser postuladas como vacunas (Miller et al., 1996, Wize et al., 1997, Fernández et al., 1998, Díez et al., 2007, Cuervo et al., 2009, Valenzuela 1998, Andrews., 1985, Wrightsman., 1995). En la actualidad se trabaja tanto en la localización de proteínas en el parásito, como en la expresión de proteínas recombinantes para su uso tanto a nivel de investigación y creación de posibles candidatos vacunales como en ensayos inmunológicos que permitan identificar estadios tempranos de la enfermedad para su tratamiento eficaz. (Diez., 2004). A partir de todos estos trabajos empezó a postularse el uso de vacunas de ADN apoyadas por el avance de la bioinformática y la Biología molecular. Es por ello, que este trabajo pretende realizar una revisión donde se muestre de manera crítica y objetiva el verdadero uso y aplicabilidad de las vacunas inversas (ADN) en la enfermedad de Chagas.

3. FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Formulación del problema: ¿Qué características debe tener una vacuna contra la enfermedad de Chagas?, ¿Porque no hemos obtenido una vacuna contra la enfermedad de Chagas a pesar de los avances moleculares y la disponibilidad de herramientas de bioinformática?, ¿Cómo garantizar que los análisis bioinformáticos encuentren la vacuna idónea “*in vivo*”?

3.2 Justificación: La enfermedad de Chagas es una parasitosis que repercute clínicamente en disminuir la calidad de vida del individuo y acortar su vida laboral

productiva generando altos costos en el tratamiento tanto para pacientes como para las entidades de salud gubernamentales que lo cubren; tratamiento que en las fases crónicas de la enfermedad se torna refractario y dado los efectos colaterales que lo acompañan puede ser suspendido en determinado momento en el paciente afectado. Las vacunas surgen como una alternativa de prevención para dichos individuos y dado que la bioinformática es una herramienta computacional que permite la búsqueda de secuencias de ADN o proteínas en una base de datos establecida, plantea la posibilidad de realizar estudios “*in silico*” que permitan hacer un mayor acercamiento hacia las posibles moléculas que potencialmente pueden llegar a ser buenos candidatos para vacunación. Adicionalmente, realizar una revisión sobre el tema de vacunas inversas en la Enfermedad de Chagas permitirá al estudiante de doble programa (Bacteriología/Microbiología) conocer las estrategias de bioinformática para el diseño e implementación de vacunas inversas a nivel industrial (Competencia de Microbiología industrial), determinar la importancia de las vacunas dentro de los planes de prevención de salud pública a nivel de la enfermedad (Competencia Bacteriología), y en conjunto, la revisión crítica y objetiva de los estudios sobre vacunas en Chagas, entre ellos las vacunas de ADN permitirá inferir sobre el impacto real de la biología molecular en la vacunación en esta enfermedad y sobre las perspectivas futuras que puede tener a largo plazo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Realizar una revisión sobre vacunas de ADN en la enfermedad de Chagas.

4.2 Objetivos específicos

- Describir el papel de la bioinformática en el análisis del ADN de *T. Cruzi* para seleccionar moléculas como posibles candidatos a vacunación.
- Explicar las estrategias metodológicas que permiten el desarrollo de vacunas inversas y el proceso de inmunización con ADN.

5. METODOLOGIA

La investigación es de tipo documental en donde se hizo una revisión de la literatura, en la cual se recopiló información acerca creación de vacunas inversas en la enfermedad de Chagas.

- 5.1 Tipo de investigación** - La investigación es de tipo documental en donde se hizo una revisión de la literatura, en la cual se recopiló

información acerca creación de vacunas inversas en la enfermedad de Chagas

5.2 Población estudio - Artículos y libros que se encuentren en bases de datos reconocidas, que sean actualizados y que contengan información acerca del *Trypanosoma cruzi*, la importancia en salud pública de la Enfermedad de Chagas y la creación de vacunas inversas a través de programas bioinformáticos.

5.3 Proceso de selección - Para el desarrollo de esta monografía se realizará una búsqueda de artículos/libros y programas computacionales relacionados con vacunas inversas para la Enfermedad de Chagas, en diferentes bases de datos como: Elsevier, Hinari, Medline, MDConsult, Medical library (proquest), Medlatina (EbscoHost), National Library of medicine, Science direct, Scielo.

5.4 Criterios de selección de la información

5.5.1 Criterios de inclusión: Las publicaciones revisadas fueron seleccionadas con base a los objetivos planteados y se seleccionaron según los siguientes parámetros: Año de publicación: 2000 – 2009, Idioma de la publicación: Inglés / Español, Tipo de artículo: se revisaran tanto artículos de revisión de tema como de carácter experimental. Los temas académicos que deben incluir los artículos son Prevalencia de la enfermedad de Chagas e impacto en la Salud pública, creación de vacunas inversas a través de programas computacionales, Proteínas conservadas de importancia para la creación de posibles vacunas contra la enfermedad de Chagas.

5.5.2 Criterios de exclusión de artículos: Resúmenes de artículos o comentarios personales tipo editor, Artículos divulgativos de carácter no científico, Artículos en idiomas diferentes a español e inglés, Informes técnicos comerciales, Artículos que fueron publicados antes del año 2000, Programas bioinformáticos diferentes a los mencionados, técnicas de biología molecular diferentes a las mencionadas.

5.6 Estrategia de búsqueda y Recolección de la información - Para el desarrollo de la monografía se utilizará la estrategia de búsqueda mediante la utilización de los encabezados temáticos, operadores y palabras de texto relacionadas con el tema. La información se recolectaron por Tabulación de artículos: los datos para recopilar la acción se tabularan en un formato de

recolección, y los datos se extraerán a partir de la tabulación de artículos se dejaran únicamente aquellos que cumplieran con los criterios de inclusión.

6 RESULTADOS

6.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Para cumplir con el diseño metodológico y los criterios de inclusión, se hizo una revisión de literatura en la cual se analizaron 200 artículos de los cuales 37 (19%) cumplían con los criterios, como se muestra en la Figura. 1. (Ver Anexo 1 Artículos que cumplieron criterios de inclusión).

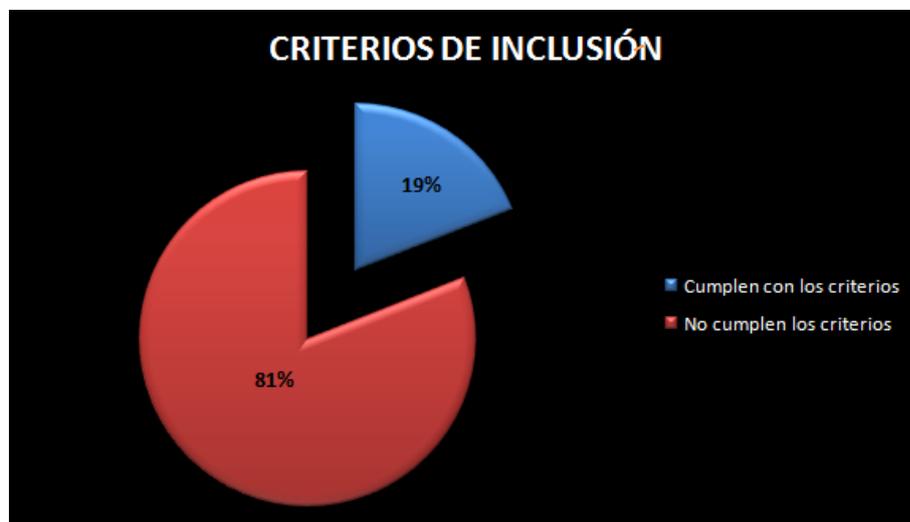


Figura. 1 Criterios de inclusión

De 200 artículos que se encontraron durante la búsqueda, 37 (19%) entraron dentro de los criterios de inclusión, los demás no cumplían con alguno de los requisitos y fueron excluidos de la monografía (Figura 1). De los 37 artículos que estuvieron dentro de los criterios de inclusión se clasifican según el cumplimiento de cada criterio que en total fueron 5 (Figura 2). Es de aclarar que en los presupuestos teóricos hay algunos artículos anteriores al año 2000 que no forman parte del diseño de la monografía y se colocaron dentro de la referencia bibliográfica solo para mostrar los antecedentes previos al trabajo. Posterior a determinar porcentajes de cumplimiento de criterios los artículos se clasificaron en tres grupos artículos que cumplían de 5 a 4 criterios (fueron los seleccionados para la revisión), artículos que cumplían 3 a 2 criterios y artículos que cumplían de 1 a 0 criterios de inclusión, los cuales fueron excluidos de la revisión. Figura 3.

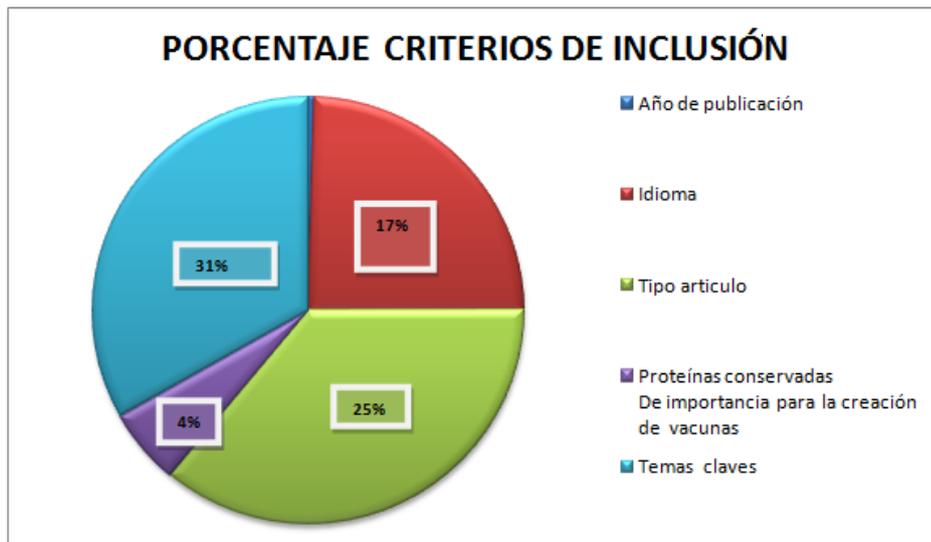


Figura. 2 Porcentajes Criterios de Inclusión

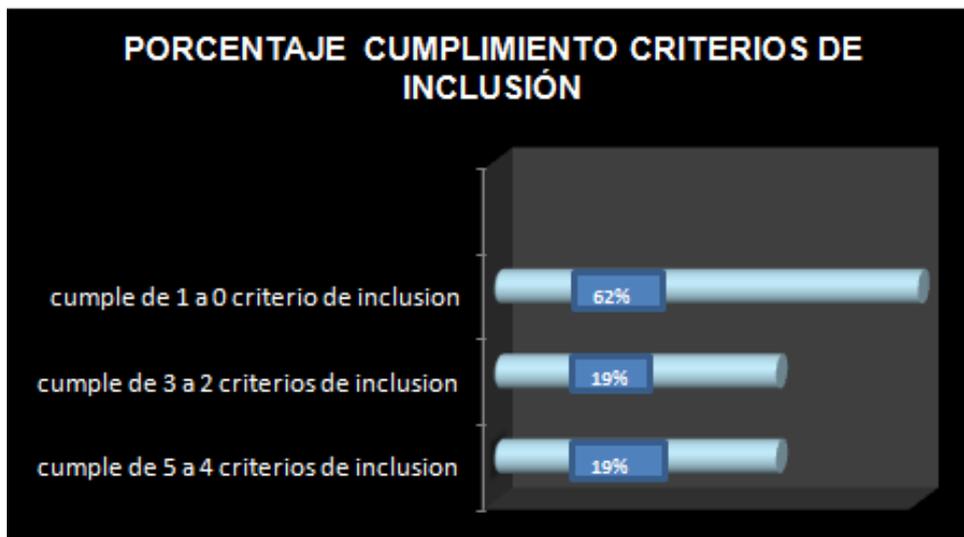


Figura. 3 Porcentajes cumplimiento Criterios de Inclusión

6.6 VACUNAS DE ADN EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Con el fin de cumplir con el objetivo general se realizó una revisión sobre los ensayos con vacunas de ADN en la enfermedad de Chagas encontrándose que el éxito en la vacunación es aún incipiente, pues depende de la respuesta inmune del huésped y no hay un patrón único de respuesta ya que el parásito presenta estadios tanto extracelulares como intracelulares, lo que hace que la enfermedad presenta diferentes

fases clínicas y por consiguiente dificulta la obtención de una molécula idónea para proteger en todos los períodos que presenta la enfermedad (Fujimura AE., 2001). Es así como en la fase aguda se han podido encontrar anticuerpos (Acs) protectores y fijadores del complemento, específicos de una cepa determinada, que contribuyen a la desaparición de los tripomastigotes pues sirven como opsoninas para fagocitosis, activación del complemento y/o inductores de citotoxicidad mediada por Acs, en tanto que en la fase crónica por ser intracelular se estimula la citotoxicidad mediada por células T CD8+ , la producción de Interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) como mecanismos de resistencia a la infección (Katae y col., 2002), y es por ello, que es muy difícil lograr que una sola molécula antigénica sea capaz de estimular al tiempo una respuesta inmune celular y humoral efectora. El panorama se complica aún más, pues se sabe 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 (Marañón., 2000). El equilibrio que alcanza esta relación huésped parásito, se debe a que el parásito ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune (Rottenberg y col., 1995). Estas dificultades se han convertido en el gran reto de los investigadores y diferentes tipos de vacunas han sido ensayadas usando como Ags parásitos completos (Andrews, 1985), antígenos purificados (Wrightman, 1985), fracciones proteicas (Valenzuela, 1998), hasta llegar a proteínas asociadas al kinetoplasto (Schnapp, 2002), y creación de moléculas quiméricas de ADN y expresión de genes de interés vacunal transfectados en plásmidos (Ouassii A, 2002; Garg and Tarleton, 2002), hasta las moléculas de ADN y relacionados que son uno de los objetivos de este trabajo.

A nivel del uso de moléculas de ADN para inmunización, varios autores han trabajado con genes individuales siendo relevantes entre otros, los trabajos con la inoculación del gen que codifica para la proteína cruzipain (Schnapp., 2002), el cual en modelos animales induce respuestas tipo B y T citotóxica específica después de la inmunización (Schnapp y col., 2002; Rodríguez y col., 2002), trabajos con plásmidos que contienen las proteínas ASP-1, ASP-2 y TSA-1 (Garg y col., 2002, Gill., 2009, Wize., 1998), inmunizaciones de ratones con plásmidos que expresaban el gen que codifica para el antígeno de superficie de *T. Cruzi* (Katae y col., 2002), los cuales en modelos animales murinos de ratones BALBc inducen respuesta T citotóxica específica. Igualmente, se ha reportado la inducción de anticuerpos que inhiben la actividad enzimática Tran-sialidasa al inmunizar con plásmidos que contienen genes para TS de *T. cruzi* (Fujimara y col., 2001, Rodríguez., 1999) y se ha demostrado inmunoprotección en modelos murinos al inmunizar con la proteína reguladora complementaria (CRP, del inglés complement regulatory protein) de *T. cruzi* (Sepúlveda y col., 2000).

Una de las estrategias para el diseño de vacunas DNA se centra en el estudio de moléculas que sean abundantes en la superficie de los parásitos y generen respuesta inmune protectora contra la infección. Como *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado, este se replica en el interior de las células, lo que conlleva a una respuesta mediada por células T CD8+ y activación de la respuesta inmune celular, que en estudios mencionados tienen una gran importancia también en la fase crónica de la infección (Katae., 2002). Es por esto que la idea inicial de una vacuna en la Enfermedad de Chagas apuntaría entonces a obtener una respuesta de células T CD8+. En la búsqueda de esta vacuna contra *T. cruzi* se han propuesto varias estrategias incluyendo virus recombinantes que portan Ag específicos o Ag dianas, líneas de péptidos, lipopéptidos y las vacunas DNA. Con el fin de profundizar en los candidatos vacunales para la enfermedad de Chagas se hace mención de las proteínas y moléculas más importantes y estudiadas en la investigación (ver tabla. 1).

Al inmunizar con plásmidos que contienen genes para las TS, en modelos experimentales se ha encontrado una supresión de la parasitemia y creación de protección contra la infección letal en la enfermedad de Chagas. La respuesta celular mediada por células T CD4+ y CD8+ induce una respuesta inmune protectora para TS lo que indica la importancia de las mismas en la resolución de la enfermedad (Fujimura., 2001). Otra proteína de ha venido tomando importancia para creación de vacunas DNA es la proteína KMP-11 de la membrana de kinetoplastidos la cual es una glicoproteína de 11 kDa presente en todos los estadios de vida de los kinetoplastidos, con una mayor abundancia en las formas parasitarias que interactúan con el insecto vector (Diez., 2004). Su importancia radica en la reactividad inmunológica que posee lo que hace de esta proteína un blanco atractivo para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia contra las enfermedades. La KMP-11 posee una relevancia inmunológica debido a que está involucrada en tres papeles inmunológicamente definidos: 1. Inmunoestimulación de células B: Estudios muestran que los Linfocitos B de pacientes con Leishmaniasis visceral (reactividad cruzada entre la KMP- 11 de *T. cruzi* y de *Leishmania*) reconocen la KMP-11 y dicha reactividad disminuye, además también demuestran la aparición de subclases de inmunoglobulinas IgG1, IgG3, IgG2 e IgG4 lo que genera una respuesta protección (Thomas et al., 2001). 2. Inmunoestimulación de linfocitos T: La KMP-11 ha tenido gran interés, dada su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T. Estudios realizados en 2001, evidencian como la inmunización de ratones transgénicos A2/Kb con una proteína de fusión, integrada por la proteína de choque térmico HSP70 y la KMP-11 de *T. cruzi*, induce una respuesta citotóxica contra células humanas que expresan la KMP-11 del parásito (Marañón et al., 2000). 3. Inmunoprotección en modelos animales: La KMP-11 fusionada a la HSP70 de *T. cruzi* induce una respuesta inmune tanto citotóxica como humoral en ratones, que permite la protección de dichos

animales (Planelles et al., 2002). Otra proteína candidata es la cisteínil proteínasa cruzipaín, que se expresa en todas las formas de desarrollo y cepas de los parásitos, además de ser un estimulador potente de la respuesta humoral y celular, lo que la sugiere como candidata para la utilización en el desarrollo de vacunas DNA, estimula la producción de una respuesta de células T CD4 Th1, las cuales producen una gran cantidad de Interferón gamma lo que potencializa la respuesta inmune celular (Schnapp., 2002). Otros candidatos utilizado para la inmunización de ratones de diferentes cepas, son lo genes que codifican el antígeno perteneciente a la superfamilia de antígenos de superficie de tripomastigotes, el antígeno de superficie de tripomastigotes 1 (Trypomastigote Surface Antigen 1, TSA-1), pertenecientes al grupo I y II de esta superfamilia, respectivamente. El antígeno TSA-1 es uno de los blancos de los linfocitos T citotóxicos CD8+ en la infección humana y experimental (Wizel y col., 1997; Wizel y col., 1998) siendo utilizado este antígeno en inmunización génica. Induce producción de anticuerpos, citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8+ y protección parcial (Wizel y col., 1998). Como se observa en la Tabla 1 hay muchos candidatos que pueden ser utilizados para la creación de vacunas DNA y su estudio es amplio para cada una de ellas.

TABLA. 1 Candidatos vacúnales para la creación de vacunas ADN

Autor	Año de la publicación	Molécula usada para vacuna	Resultado en la respuesta inmune
Diez	2004	Glicoproteína gp 60	Asociadas a la protección parcial del huésped
Katae Fujimura	2002 2001	Trans/sialidasas (TS)	Estimula la respuesta inmune protectora. Estimulación de células T CD4+ y células T CD8 +
Ouaissi	2002	Proteína Tc52	Induce inmunosupresión asociada a infección aguda y provoca una respuesta inmune específica, mediada por células dendríticas (CD)
Schnapp	2002	Cisteínil proteínasa	La cisteína proteínasa se caracteriza por presentar un a extensión C-terminal. Lo que estimula la respuesta inmune protectora. Mediada por células T CD4+ y células T CD8 +
Planelles Cuervo Marañón	2002 2004 2000	Proteína de Choque- térmico 70kDa HSP70	Proteína altamente inmunogénica e induce una fuerte respuesta humoral. Además esta asociada a un efecto estimulador sobre células de bazo y de ganglio de ratones <i>naive</i> , lo que da lugar a una rápida estimulación de linfocitos T seguidos de un

			proceso de internalización de los receptores CD3+ y TCRab y un proceso de apoptosis no dependiente de Fas/L, mecanismos que pueden ser relacionados con la capacidad de generar memoria
Luhrs Wrightsmann	2003 1995	Antígeno flagelar Rod (PAR)	Respuesta humoral y celular. Posee impacto en la inmunidad protectora. Participación de las células T en la respuesta inmune protectora en estudios con ratones inmunizados con PAR.
Wizel	1997 y1998	Antígeno de superficie de los tripomastigotes (TSA)	inducción de anticuerpos, citotoxicidad mediada por linfocitos T(CD8+) y protección parcial
Díez Berberich Thomas	2004, 2007 1998 2000	Antígeno de superficie del kinetoplasto KMP-11	Tres papeles inmunológicos claramente definidos: • Inmunoestimulador de células B. • Inductor de linfoproliferación y respuesta Citotóxica. • Inmunoprotector en modelos animales.
Schnapp	2002	Proteína cruzipain	Estimula potentemente de la respuesta inmune humoral y celular durante la infección

6.7 BIOINFORMATICA Y LA MOLECULA IDONEA PARA VACUNACION

Con el fin de cumplir el primer objetivo específico se hizo una revisión acerca del papel de la Bioinformática para el desarrollo de vacunas a partir de moléculas de DNA. La Bioinformática se define como una disciplina en la cual la adquisición, procesamiento, almacenamiento, distribución, análisis e interpretación de la información biológica se conjugan las herramientas y técnicas de tres áreas del saber como son las matemáticas, las ciencias computacionales y las ciencias biológicas con el objetivo de explicar el significado biológico de los datos (De Groot, 2007). Uno de los grandes logros alcanzados por la Bioinformática es tener la información sobre la secuenciación completa de los genes de diversos microorganismos patógenos, información que proporciona suficientes datos que pueden ser aplicados en el diseño de nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas (Flower., 2004). Estos datos han permitido el desarrollo de un elevado número de programas computacionales basados en algoritmos que permiten la identificación de moléculas candidatos a vacunas (análisis "*In silico*"), los cuales implementan estrategias basadas en la información genómica y que unidas a varios

algoritmos y el análisis crítico y objetivo de la información generada, son esenciales para seleccionar el mejor Ag a utilizarse como molécula inmunomoduladora o de vacuna en una enfermedad (Mora et al., 2003, Flower, 2004) (Davies y Flower., 2007) . Entre los programas de mayor utilización en el mercado y disponibles en diferentes direcciones de internet tenemos *Bases de Datos* como GenBank, EMBL, EBI disponibles en <http://www.ncbi.nih.gov/Genomes/>, <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>, programas para el *Análisis de Similitud de Secuencias* como FASTA, ClustalW, TIGR, GOGs, BLAST disponibles en servidores <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>, <http://www.sanger.ac.uk/Software/ACT>, herramientas para *predicción de características estructurales* MOTIFS, Prosite, InterPro Scan, SignalP 3.0,PSport, DGPI disponibles en <http://www.psort/index.html>, <http://www.imtech.res.in/raghava/pslpred>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>, Servidores para *identificación de características inmunológicas* como IMTECH, EpiMatrix, RANKPEP, HLA bind entre muchos otros disponibles en <http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>, <http://www.jenner.ac.uk/mhcpred/>, <http://imtech.res.in/raghava/im.html> (Ferreira y Porco., 2008). Tabla 2.

TABLA 2. Programas y bases de datos disponibles en internet para el análisis de secuencias de DNA y proteínas

NOMBRE DEL PROGRAMA O BASE DE DATOS	FUNCIÓN	DIRECCIÓN DE INTERNET
<i>Base de datos</i> GenBank	Por homología búsqueda de ORFs (<i>open Reading frame</i>)	http://www.ncbi.nih.gov/Genomes/
<i>Base de datos</i> EMBL	Base de datos secuenciación completa del genoma	http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html
<i>Base de datos</i> EBI	Base de datos secuenciación completa del genoma	http://www.ddbj.nig.ac.jp
FASTA	Programas para el Análisis de Similitud de Secuencias	http://www.ebi.ac.uk/fasta33
ClustalW	Herramientas para la predicción de características proteínicas. Alineamiento de secuencias	http://www.sanger.ac.uk/Software/ACT

múltiples		
TIGR	Programas de secuenciación completa del genoma	http://www.tigr.org/
GOGs	Programas de secuenciación completa del genoma	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GOG/
BLAST	Herramienta para la predicción de la secuencia de proteína en particular y proporciona un listado de todos los microorganismos que tienen esa proteína.	http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/
MOTIFS	Herramientas para predicción de características estructurales	http://www.mofit.genome.jp/
Prosite	Servidor que permite la descripción de dominios de proteína, familias y sitios funcionales así como modelo asociado y perfiles para identificarlos	http://au.expasy.org/prosite/
InterPro Scan	Herramienta que permite identificar la proteína en estudio y las semejanzas con otras Su proteína y sus características Bioquímicas.	http://expasy.org/tools/
SignalP3.0	Permite identificar características de las proteínas. Péptidos señal	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
PSport	Permite identificar características de las proteínas. Lipoproteínas.	http://www.psort/index.html
DGPI	Servidor que permite inferir los sitios de anclaje y clivaje del GPI.	http://www.expasy.ch/tools/
IMTECH	Servidor para identificación de características	http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html

inmunológicas.		
EpiMatrix	Permite la identificación de epítropes. Epítropes de células T.	http://www.jenner.ac.uk/mhcpred/
RANKPEP	Permite la identificación de epítropes. Unión al MHC I Y II-	http://imtech.res.in/raghava/im.html
HLA bind	Permite la identificación de epítropes. Unión al MHC I Y II.	http://bimas.dcr.t.harvard.edu/Tools/rankpep.html
<u>Base de datos</u>	Servidor en donde se encuentran todos los programas computacionales y proporciona información de cada uno.	http://ca.expasy.org/tools/
Expasy Tools		

A partir de las bases de datos el desarrollo de una vacuna comienza con la identificación de proteínas en las regiones codificantes dentro de la secuencia genómica. Las proteínas definidas por estas regiones codificantes son entonces examinadas con herramientas bioinformática para determinar aquellas que tengan las mejores posibilidades como potenciales candidatos vacunales para la enfermedad que se esté investigando. Una vez predichas las regiones codificantes, se debe realizar el análisis de las secuencias aminoacídicas de las proteínas seleccionadas por medio de los diferentes algoritmos computacionales que puedan predecir con exactitud si dicha proteína cumple con la función hipotética que se le está asignando (Grandi., 2003). En el caso de Chagas, debe analizarse inmunogenocidad, protección, estímulo de respuesta inmune intracelular, localización de la proteína, sistemas de secreción de la misma, reconocimiento de secuencias señales específicas, y respuesta inmune que induce. Dado que la composición de la secuencia de una proteína y las características estructurales y funcionales arrojadas por programas computacionales no son suficientes para predecir el potencial de una región codificante particular como candidato vacunal, estas secuencias deben ser comparadas con bases de datos de secuencias o motivos de las secuencia similares a la examinada, con el fin de realizar una aproximación hacia la funcionalidad que se espera obtener (Chakravarti., 2001). Sin embargo, aunque una proteína o una región de un gen cumpla hipotéticamente con las características que debería tener una vacuna, debe asegurarse que esta una vez introducida en un huésped por un método de inmunización debe cumplir su función *In vivo* y tener una respuesta protectora. Para mirar si la molécula cumple con este requisito, el último paso en la

obtención de un candidato vacunal a través de la bioinformática va muy ligado a la respuesta inmune del huésped ante el proceso infeccioso específico que se esté analizando y por ello debe analizarse si el péptido/proteína seleccionado tiene funciones inmunológicas de ser inmunoestimulador, inmunoregulador y/o identificar si es epítope celular, epítope humoral, epítope citotóxico, fijador de complemento, procesamiento y presentación Ag dentro del contexto de HLA, y reconocimiento de receptores entre otros, siendo estos datos los de mayor peso dentro del análisis bioinformático pues por óptimas que sean las características estructurales y funcionales, el péptido/proteína solo debe ser aceptado para su uso si logra una respuesta inmune efectora eficiente (Zagursky., 2003).

Aunque no forma parte de los objetivos y solo con el fin de enriquecer el trabajo se realizó un ensayo con una de las moléculas que se han trabajado en la Enfermedad de Chagas para analizar su potencial uso como vacuna y/o inmunomodular y es la proteína KMP-11 que presenta como característica relevante su capacidad de inducir linfoproliferación de linfocitos T, estimular producción de anticuerpos en pacientes chagásicos y presentar un efecto inmunoprotector en modelos murinos (Thomas et al., 2001, Berberich et al., 2003, De Carvalho et al., 2003, Planelles., 2002). Al aplicar el análisis de diferentes programas sobre el gen y la proteína mencionada, se encontró que en los diferentes tripanosomátidos está conformada por 90-92 aminoácidos (Translate Tool) tiene un punto isoeléctrico 5,96 y peso de 11055,4 daltons, la composición de aminoácidos de la proteína refleja ausencia de los aminoácidos cisteína, triptófano y valina, así como también una alta proporción de aminoácidos cargados (www.expasy.ch), tiene 2-4 sitios posibles de fosforilación, 2 dependientes de la proteína quinasa C (PROSITE), tiene estructura secundaria conformada por dos alfas hélices conectadas por un segmento al azar (GOR 1), es presentada dentro del contexto HLA 0201 (HLA bind), y comparada con la secuencia de otros tripanosomátidos entre sí, tiene 80-88% de similitud en su secuencia de nucleótidos y 90- 97% de identidad en su secuencia deducida de aminoácidos (L-ALIGN, ClustalW), datos que al ser comparados con otras proteínas de *T. cruzi* muestran que esta proteína puede ser un excelente candidato para vacunación.

Es importante puntualizar que la bioinformática solo permite acortar el tiempo para el descubrimiento de una vacuna limitando el número de candidatos a ser probados y reduciendo costos, pero que esto no asegura la eficiencia de la misma, pues las herramientas bioinformática no contemplan en ningún momento la reacción del huésped, y por ello una vez determinada la molécula a utilizarse, esta debe ser fabricada In vitro y experimentarse In vivo, realizando para ello pruebas de potencia, inocuidad y eficacia de acuerdo a la respuesta inmune del huésped y las características clínicas de la enfermedad problema.

6.8 METODOLOGIA DE VACUNAS INVERSAS Y PROCESO DE INMUNIZACION

Con el fin de cumplir con el segundo objetivo específico y aplicar la competencia a nivel de bacteriología/microbiología industrial se hizo una revisión de sobre las estrategias para la inmunización con ácidos nucleicos y la aplicación de las vacunas reversas como alternativa de inmunización. Es así, como a partir de la secuencia de ADN se pueden realizar análisis que predicen si una proteína es buen antígeno, el tipo de respuesta inmune que induce, el tipo de unión hacia el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la presencia de epitopes celulares y humorales, propiedades que en conjunto van a determinar si una secuencia de ADN es codificante para una proteína que puede llegar a ser considerada como un buen candidato a vacuna (Ferreira y Porco., 2008). A partir de dicha secuencia deben realizarse una serie de procesos básicos como pruebas de amplificación como PCR, clonación y construcción de ADN recombinante con posterior expresión de proteínas, y utilizar ya sea directamente un gen que codifica para una proteína antigénica en las células de un animal, donde se sintetizará el antígeno que provoca la respuesta inmune o introducir la proteína expresada a partir del ADN amplificado y clonado (Danzing., 2005). (Figura 4). Es a este proceso que parte del ADN para llegar a la proteína con carácter inmunizante, al que denominamos vacuna reversa o vacuna inversa (Ferreira y Porco., 2008).

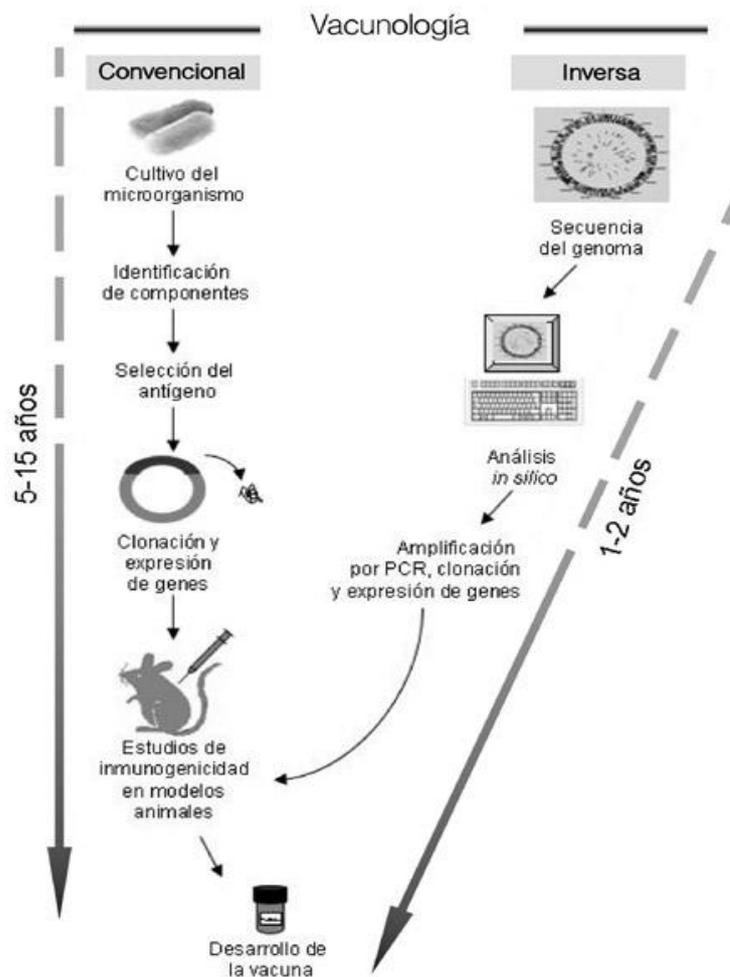


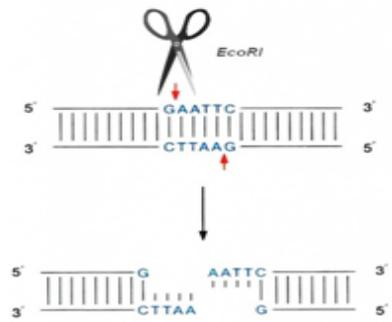
Figura. 4 Comparación entre vacuna convencional y inversa (Ferreira y Porco., 2008)

En la vacunología inversa inicialmente debe generarse un constructo de ADN, el cual corresponde a una molécula obtenida por la técnica del ADN recombinante, y posteriormente, dicha molécula debe ser introducida en el huésped en el cual se busca inmunizar.

El termino ADN recombinante hace referencia a la creación de nuevas combinaciones de segmentos o de moléculas de ADN que no se encuentran unidas de forma natural, donde las moléculas de ADN producidas por la unión de segmentos que proviene de diferentes fuentes biológicas (Needleman., 2007). La utilización de ADN recombinante se ha convertido en una herramienta muy poderosa en la Biología molecular ya que se pueden tener aislamientos de poblaciones puras de secuencias específicas de DNA a partir de una población de secuencias mezcladas. (Cultek., 2006, Gómez., 2000). El

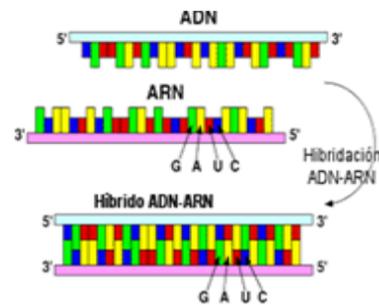
proceso básico incluye una serie de pasos (Figura. 5) los cuales permiten la obtención de información genética a partir de la hibridación y posterior clonación de material genético de importancia. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y la clonación molecular han aportado sofisticados procedimientos que permiten el aislamiento, purificación y replicación de fragmentos específicos de ADN. La finalidad de la clonación molecular es aislar gran cantidad de genes específicos, en forma pura. (Gómez., 2000).

Figura 5. Proceso de ADN recombinante (Cultek., 2006)

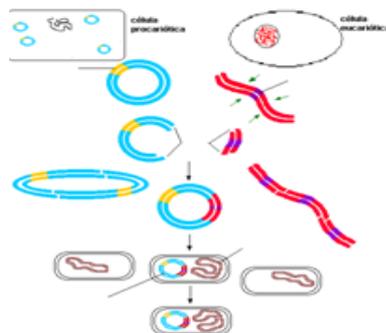


1. Ruptura específica del ADN mediante nucleasas de restricción, que facilita el aislamiento y la manipulación de los genes individuales

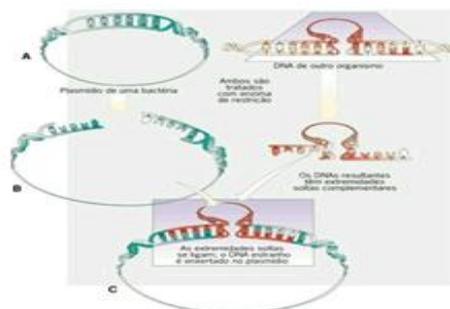
2. La secuenciación rápida de todos los nucleótidos de un fragmento purificado de ADN, posibilita determinar los límites de un gen y la secuencia de aminoácidos que codifica



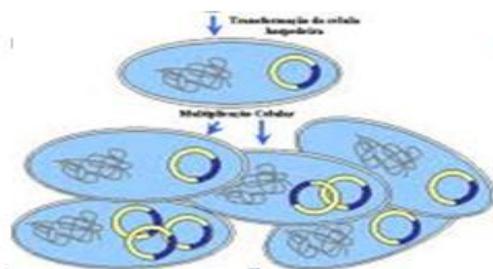
3. Hibridación de los ácidos nucleico que hace posible localizar secuencias determinadas de ADN o ARN, utilizando la capacidad que tienen estas moléculas de unirse a secuencias complementarias de otros ácidos nucleico



4. Clonación del ADN, mediante la cual obtienen un fragmento de ADN se integre en un elemento génico autor replicante (plásmido o virus) que habita en una bacteria, de tal manera que una molécula simple de ADN puede ser producida generando muchos miles de millones de copias idénticas



5. La ingeniería genética mediante la cual se pueden alterar secuencias de ADN produciendo versiones modificadas de los genes, los cuales se pueden insertar a células u organismos.



Si retrocedemos en la historia de las primeras inmunizaciones exitosas fueron las vacunas atenuadas, elaboradas mediante múltiples procesos en cultivos celulares, ejemplo de estas fueron el virus de la varicela o el virus del polio entre otros, además de estas, también se elaboraban vacunas atenuadas que se inactivaban a base de calor o con componentes químicos, aunque esta no respondió muy bien ya que el fin de la inmunización es inducir una respuesta inmunitaria tanto de tipo humoral como celular (Cultek 2006).

Cuando se da todo el proceso de Recombinación del ADN (Figura. 5) este es introducido a la célula y es translocado directamente en su núcleo, donde es sintetizado y llevado al citoplasma. Las proteínas recién sintetizadas se degradan y se transportan al retículo endoplasmático mediante un sistema de proteínas transportadoras (TAP-I y TAP-II), posterior a esto se vinculan con las moléculas de MHC clase I donde luego entran en vías secretorias posteriormente se da un acoplamiento con el receptor de T (TcR) presente en la superficie de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) para inducir su activación. Las proteínas exógenas que se endocitan o fagocitan (presentación cruzada en la inmunización con ADN) entran a la vía endosómica y en ella se degradan en pequeños péptidos que luego se vinculan con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y se translocan hacia la superficie de la célula, donde se presentan y unen a los TcR en los linfocitos T cooperadores (CD4+); todo ello tiene como consecuencia su activación y expansión. De esta forma se induce la respuesta inmunitaria tipo humoral y celular. (Mota-Sánchez., 2009).

El sistema de inmunización se basa en el principio básico de la sinapsis inmunológica. Donde se activa una serie de vías de señalización cuando hay un reconocimiento de la proteína extraña. La señal 1 se da entre la unión del complejo MHC-péptido y TcR, en las Células presentadoras de antígenos (APC) y linfocitos T, esta es insuficiente para generar una respuesta inmunitaria, por lo que se presenta la señal 2 inducida por moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de las APC (en su mayor parte células dendríticas). Para que todas estas vías de señalización se activen debe existir una señal 0 donde se indican citoquinas inflamatorias, proteínas de choque térmico (HSP), estimuladas por los antígenos del patógeno lo que conlleva la sobreexpresión de moléculas de MHC y coestimuladoras para que se de el reconocimiento y posterior activación de la respuesta inmune. (Dumonteil E y col., 2004). Seguido de la etapa de activación se inicia la etapa efectora; los linfocitos T activados dejan los ganglios linfáticos hacia la periferia y siguen un gradiente de quimiocinas hasta llegar al lugar donde se necesitan y tras la unión de sus TcR con los antígenos expresados en el contexto de MHC apropiado comienzan su etapa efectora mediante la secreción de sustancias tóxicas, como las perforinas (células CD8+) o interleucinas con actividad

inflamatoria como el INF-g (células CD4+). Por otro lado, los linfocitos B se activan mediante su receptor (BcR) por los antígenos que se sintetizan y secretan o presentan en la superficie de las células que se transfectaron en la inmunización con el ADN. Con posterioridad, los linfocitos B activados cambian de isotipo; las secuencias que codifican a la región variable de las inmunoglobulinas sufren hipermutación y las clonas con un receptor con mayor afinidad por el antígeno se seleccionan y expanden. Los linfocitos B activados se diferencian al final hacia células de memoria o células plasmáticas; estas últimas pueden: a) continuar la síntesis de anticuerpos o b) establecerse en la médula ósea y continuar también la producción de anticuerpos; por lo tanto, es posible encontrar anticuerpos presentes en el suero y mucosas por largos periodos. (Mota-Sánchez., 2009).

7 DISCUSIÓN

El desarrollo de una vacuna parte de la identificación de moléculas y/o estructuras celulares del microorganismo que potencialmente pueden ser usadas como dianas antigénicas, que al ser introducidas en el huésped estimulan la respuesta inmunológica ya sea a nivel humoral y/o celular, induciendo una inmunidad adquirida activa frente a determinadas enfermedades infecciosas (Stern y Markel., 2005). Con las técnicas convencionales, éste puede ser un proceso lento y costoso, pues se basa en el ensayo y error hasta encontrar la molécula que puede ser un candidato potencial a utilizarse como vacuna, y los ensayos se circunscriben a verificar las dos grandes propiedades que deben reunir las vacunas como son la eficacia o poder inmunógeno del antígeno y la inocuidad o no patogenicidad del producto, sin tomar en cuenta las modificaciones industriales por producción a gran escala, la facilidad o no de obtener el antígeno (Ag) y la respuesta efectora real al aplicarla en el huésped humano (Rappuoli, 2001). Con el desarrollo y optimización de nuevas tecnologías se han logrado grandes progresos en la creación de vacunas, y muchas de las variables en su producción han mejorado notablemente, pero es la biotecnología quien ha permitido obtener avances a todo nivel tanto en la industria como en la salud, pues a partir del Proyecto Genoma Humano se logró la completa automatización de la técnica de secuenciación del ADN, lo que conllevó a completar el conocimiento no solo del genoma del hombre sino de numerosos microorganismos generando un gran número de bases de datos y el surgimiento de la bioinformática como una valiosa herramienta computacional para el análisis de la información biológica siendo un gran apoyo para la investigación (Lesk., 2002), entre ellos el análisis de posibles moléculas candidatos a vacuna (Rappuoli, 2001). A pesar de todos los avances en la investigación y creación de programas computacionales que permiten estudiar las características de una Proteína o de una molécula de ADN, no se ha podido crear una vacuna ADN contra la enfermedad de Chagas debido a que se

presentan desventajas a nivel de respuesta inmunológica, y también a sus altos costos para su producción (Tabla. 3)

TABLA 3. Ventajas y desventajas de las vacunas DNA

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Estimulan tanto la respuesta inmune humoral como la celular	Pocas vacunas recombinantes han sido aprobadas para uso veterinario y ninguna de ellas se emplea en humanos todavía.
Estabilidad de los vectores plasmídicos a diferentes temperaturas, lo cual permite disminuir costos en el proceso de elaboración, transporte y administración	Poca reproducibilidad de modelos murinos a humanos.
Los vectores plasmídicos utilizados para vacunación con DNA son fabricados con facilidad. Fácilmente modificados.	Uso de las vacunas de ADN en modelos preclínicos muestra la inducción de una respuesta inmunitaria baja.
Expresa in situ el antígeno clonado	Altos costos para su investigación en un país en desarrollo como Colombia
La presencia de secuencias que balancea la respuesta hacia un subtipo Th1 y su simplicidad de manipulación expresan in situ el antígeno clonado	Los resultados <i>In vivo</i> son poco alentadores, existe el inconveniente que en modelos animales no se ha podido reproducir la enfermedad de Chagas en su fase crónica
La presencia de secuencias que balancea la respuesta hacia un subtipo Th1 y su simplicidad de manipulación, que permite la construcción de quimeras e introducción de secuencias codificantes para moléculas estimuladoras /moduladoras de la respuesta inmune	Depende de la respuesta inmune del huésped, no hay un patrón único de respuesta ya que el parásito presenta estadios tanto extracelulares como intracelulares, lo que hace que la enfermedad presenta diferentes fases clínicas
Se postulan como vehículos extremadamente adecuados para inducir protección frente a esta parasitosis y por tanto debe de primar su investigación	Desconocimiento de las rutas de inmunización, el tipo de adyuvantes y los esquemas de inmunización para obtener protección.

8 CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

Aunque las vacunas de ADN resultan ser una estrategia alternativa versátil y segura, falta mucho por investigar para poder alcanzar un grado óptimo de eficiencia y protección en su aplicación en el ser humano. Pueden diseñarse plásmidos para moléculas potencialmente candidatas a vacunas en la enfermedad de Chagas, pero se desconoce

mucho todavía de las rutas de inmunización, el tipo de adyuvantes y los esquemas de inmunización para obtener protección. La aplicación de la tecnología basada en la vacunación con ADN, para países como Colombia donde tendrían un mayor impacto, puede representar inicialmente un alto costo económico porque no se posee con la infraestructura necesaria que la soporte. Sin embargo, dichas vacunas representan una herramienta para el diseño y desarrollo de nuevas estrategias en la lucha contra las enfermedades infecciosas.

La investigación nos permite inferir que muchos antígenos del parásito han sido caracterizados y examinados para estudiar su capacidad de estimulación del sistema inmune, pero pocos han demostrado tener respuesta inmune protectora lo que dificulta la búsqueda de un candidato ideal para la creación de Vacunas ADN reversas en la enfermedad de Chagas. Aun así, todavía queda mucho por investigar para poder alcanzar en seres humanos el éxito obtenido en modelos animales. El gran potencial de las vacunas de ADN residen en múltiples características como lo es en su gran parte la versatilidad, la realidad de las vacunas reversas en la enfermedad de Chagas es incipiente, debido a que esta muy sujeta a la respuesta inmune del huésped y no hay un patrón único de respuesta ya que el parásito presenta estadios tanto extracelulares como intracelulares, lo que hace que la enfermedad presenta diferentes fases clínicas y por consiguiente dificultad la obtención de un molécula idónea para proteger en todos los períodos que presenta la enfermedad, por esta razón las investigaciones para la creación de una vacuna contra la enfermedad de Chagas sigue siendo un reto en la investigación. Aunque es bien sabido que el descubrimiento de la vacunología inversa, cambió completamente la forma en la que se venían realizando el diseño de vacunas, debido al descubrimiento de nuevos antígenos que han podido ser identificados por las técnicas convencionales, no ha sido suficiente su utilización en la enfermedad de Chagas por lo anteriormente mencionado.

Por otro lado el desarrollo de este informe permite inferir la importancia que tiene la enfermedad de Chagas tanto a nivel clínico como Industrial, debido a su incidencia en la población mundial, por tal motivo es importante tener mecanismos de prevención y control de la propagación del insecto vector responsable de la transmisión del *Trypanosoma cruzi*, además de la importancia a nivel de salud pública que posee la enfermedad es importante resaltarla también a nivel clínico- patológico, la relación hospedero- parásito, así como el comportamiento inmunológico que presentan los pacientes para de esta manera buscar la forma de atacar al parásito y eliminarlo a través de una posible vacuna. La creación de vacunas es una herramienta importante a nivel del desarrollo de la investigación industrial, ya que nos permite la creación de diseños bioinformático y la utilización de la biología molecular que avanza a pasos agigantados

en los tratamientos de enfermedades de importancia mundial como lo es la enfermedad de Chagas y el VIH, entre otras.

Por ultimo el desarrollo de herramientas bioinformática y el descubrimiento de las vacunas ADN reversa han facilitado el estudio, comportamiento y caracterización antes no conocidas de los microorganismos en este caso de *Trypanosoma cruzi*, aunque en este informe se hace una revisión bibliográfica de la literatura encontrando diversos estudios relacionados con la respuesta inmune y la creación de vacunas para la enfermedad de Chagas, no es posible concluir de una manera satisfactoria debido a que a pesar de que se tiene muchos candidatos vacunales contra el mismo, no se ha podido lograr de manera definitiva una vacuna contra la enfermedad. Por lo anteriormente discutido, se sugiere profundizar más en los candidatos vacunales ya que en este trabajo solo se nombran algunos y llevarlo a nivel experimental, con el fin de lograr un mejor entendimiento del comportamiento de los mismos en modelos murinos y poder así de esta manera a través de la investigación llevarlo a los seres humanos.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altcheh, J., Biancardi, M., Lapeña, A., Ballering, G., Freilij, H. 2005. Enfermedad de Chagas congénita: experiencia del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (II): 41-5.
2. Andrews NW, Alves MJ, Shumacher RI, Calli W. 1985. *Trypanosoma cruzi*. Protection in mice immunized with 8-methoxy-psoralen-inactivated trypomastigotes. *Exp Parasitol* 1985; 60:225-62.
3. Apt B W., Heitmann G. I., Jercic L.M., Jofré M. L., Muñoz P., Noemí H. I., San Martín V. A., Sapunar P. J., Torres H. M., Zulantay A. I., 2008. Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la Enfermedad de Chagas. Chile. *Rev Chil Infect*; 25 (5): 384-389.
4. Berberich, C., Ramírez-Pineda, J.R., Hambrecht, C., Alber, G., Skeyki, Y., Moll, H. 2003. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigen. *J Immunol*. 170: 3171-3179.
5. Betancor. L., M. Gadea, K. Flores. 2000. Genética bacteriana: pág. 59-80.

6. Camargo, E., O. Cruz. 2009. Perspectives of vaccination in Chagas disease revisited. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 (1): 275-280.
7. Castillo., Riquelme, M., Guhl, F., Turriago, B., Pinto, N., Rosas, .F, Martínez, MF., Fox-Rushby, J., Davies, C., Campbell-Lendrum, D. 2008. The costs of preventing and treating Chagas disease in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e336.
8. Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, Zagursky RJ., 2001. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine*; 19:60112.
9. Cuellar, A., Rojas, F., Bolaños, N., Diez, H., Thomas, M., Rosas, F., Velasco, V., López, MC., González, JM., Puerta, C. 2009 Natural CD4(+) T-cell responses against *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chronic chagasic patients. *Immunol Cell Biol.* 87:149-53.
10. Cuervo, C., Mayorga D., Pavía P., López M., Puertas C., 2004. Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. Bogota, Colombia. Asociación Colombiana de infectología, vol. 8, p, 268-278.
11. Cultek., S.L.U. 2006. Tecnología del DNA recombinante. Pág. 1-28.
12. De Carvalho, L.P., Soto, M., Jerónimo, S., Donji, B., Bacellar, O., Luz, V., Orge, O., Alonso, C., Jesús, A.R., Carvalho, E.M., 2003. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect.* 5: 7-12.
13. De Groot, A., Moise, L., 2007. New tools, new approaches and new ideas for vaccine development. *Expert Review of Vaccines* Vol. 6, No. 2, Pages 125-127 , DOI 10.1586/14760584.6.2.125.
14. De Castro, AM., Luquetti, AO., Rassi, A., Chiari, E., Galvão, LM. 2006. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res*; 99:379-83.

15. Davies, MN., Flower, DR., 2007. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. May; 12(9 10):389-95. Epub. Apr 6.
16. Dazing. L., 2005. Reverse vaccinology — In search of a genome-derived meningococcal vaccine. Available online 5 February.
17. Díez, H., Guzmán, F., Alba, M.P., Cuervo, A., Thomas, M.C., Lopez, M.C., Rosas, F., Velasco, V., González, J.M., Patarroyo, M.E. & Puerta, C.J. 2007. Immunological and structural characterization of an epitope from the *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein. Peptides 28(8), 1520-1526.
18. Díez, H., López, M., Thomas, M., Puerta C. 2004. KMP-11: proteína 11 de Membrana de Kinetoplástidos. Universitas Scientiarum Vol 9, 29-44.
19. Dos Santos, FM., Caldas, S., de Assis, Cáu, SB., Crepalde, GP., de Lana, M., Machado-Coelho, GL., Veloso, VM., Bahia, MT.2008. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance in vivo and its modulation by in vitro culturing and mice infection. Exp Parasitol 120:385-90.
20. Dumonteil E, Escobedo, Ortegon J., Reyes, Rodriguez, N., Arjona-Torres A, Ramirez-Sierra MJ. 2004. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. Infect Immun. 72:46-53.
21. Fernández., Gómez, R., Esteban, S., Gómez., Corvera, R., Zoulika, K. y Ouaiissi, A. 1998. *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expresión of nitric oxide synthase and nitric oxid production by macrophages. J. Immunol. 160, 3471-3479.
22. Ferreira, J., Porco, A. 2008. Vacunas derivadas del análisis de los genomas: vacunología inversa. 33(5):353-358.
23. Flower, DR., 2004. Vaccines in silico, the growth and power of immunoinformatics. The Biochemist; August:17-20.
24. Fujimura AE, Kinoshita SS, Pereira-Chiocola VL, Rodrigues MM. 2001. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA.

25. Garg N, Tarleton RL. 2002. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*; 70:554.
26. Gill, IA., Hyde SC., 2009. Progress and Prospects: The design and production of plasmid vectors. *Gene Therapy* 16, 165–171. Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0969-7128.
27. Gómez. M., Echenique V., 2000. Herramientas básicas de ingeniería genética. Capítulo 3. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Pag 43-60.
28. Grandi G. 2003. Rational antibacterial vaccine design through genomic technologies.
29. Guhl F., Nicholls R., Montoya R., Rosas F., Velasco V., Mora E., Herrera C., Santacruz M., Pinto N., Aguilera G., Salcedo P., Zipa N., Florez J., Olarte A., Castillo G., 2005. Rápida negativización serológica después del tratamiento etiológico para Enfermedad de Chagas en un grupo de escolares colombianos, Bogotá, Colombia. Universidad de los Andes. Curso de Diag. 7-13.
30. Hoyos. R., Pacheco. L., Agudelo, L., Zafra G., Blanco, P., Triana, O. 2007. Seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas y factores de riesgo asociados en una población de Morroa, Sucre. *Biomédica*: Vol. 7, suplemento 1, pp. 130-136.
31. Ibañez, C., F., Affranchino, J. and Frasch, A.C.C., 1987. Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 25, 175-184.
32. Katae M, Miyahira Y, Takeda K, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. 2002. Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infect Immun*.70:4833-40.
33. Kubata B.K, Kabututu Z, Nozaki T, Munday C.J, Fukuzumi S, Ohkubo K, Kazarus M et al. 2002. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*; 196:1241-1251.
34. Lesk, AM. 2002. Introduction to Bioinformatics. Oxford University Press. New York, NY, EEUU. pp. 255.

35. Luhrs KA, Fouts DL, Manning JE. 2003. Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*;21:3058-69.
36. Marañón., C, Planelles., L, Alonso., C, López., M. 2000. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *International Immunology*, Vol. 12 No 12 pp 1685-1693.
37. Marin-Neto, JA., Rassi, A Jr., Morillo, CA., Avezum, A., Connolly, SJ., Sosa-Estani, S., Rosas, F., Yusuf, S. 2008. Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 156:37-43.
38. Michailowsky V, Luhrs K, Rocha MO, Fouts D, Gazzinelli RT, Manning JE. 2003. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect Immun*;71:3165-71.
39. Miller, M.J., Wrightsman, R.A. y Manning, J.E. 1996. *Trypanosoma cruzi*: Protective immunity in mice immunized with paraflagellar Rod proteins is associated with a T-helper type 1 response. *Exp. Parasitol.* 84, 156-167.
40. Meléndez-Herrada, E., Ramírez, M., Sánchez, G., Cervantes, E. 2010. Aportaciones de la genómica y la Bioinformática al nuevo virus de la influenza A (H1N1) y su impacto en la medicina. *Rev Fac Med UNAM* Vol. 53 No. 2.pag: 76-82.
41. Mora, M., Vegg,i D., Santini, L., Pizza, M., Rappuoli, R. 2003. Reverse vaccinology. *Drug Disc.*8: 459-464.
42. Morell., M, García-Pérez., JL, Thomas., MC, López., MC. 2005. Identificación in silico, caracterización molecular y análisis de expresión de la proteína de filamento para flagelar PFR3 del *Trypanosoma brucei*. *Ars Pharm*; 46 (1): 73-84.
43. Mota-Sánchez J. 2009. Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Publica Mex* 51 (3):s463-S469.

44. Needleman D., 2007. Plasmid Segregation: Is a Total Understanding within Reach?. Pag: 12.047.
45. Nogueira, FB., Ruiz, JC., Robello, C., Romanha, AJ., Murta, SM., 2009. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res*; 104:835-44.
46. Organización Mundial de la Salud (OMS) / Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2006 A. Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/HDM/CD/425-06.
47. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2002. El control de la Enfermedad de Chagas. Segundo informe del Comité de expertos de OMS. Serie de Informes Técnicos. Organización Mundial de la Salud; Ginebra: 2002; P: 1-107.
48. Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N et al. 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol*. 168:6366-74.
49. Palau M., 2000. Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi*. *MVZ-Cordoba*; 5:(1), 33-37.
50. Perdigo B., Cotta-de-Almeida V., Araújo-Jorge T. 2002. Benznidazole Treatment following Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Triggers CD8⁺ T-Cell Expansion and Promotes Resistance to Reinfección. *Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, p. 3790–3796.
51. Planelles, L., Thomas, MC., Pulgar, M., Marañón, C., Grabbe, S., López MC., 2002. *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein 70kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells. *Inmunology and Cell Biology* 80:241-247.
52. Rappuoli, R. 2001. Reverse vaccinology, a genome- based approach to vaccine development. *Vaccine* 19: 2688-2691.

53. Reyes PA., Vallejo M. 2005. Fármacos tripanocidas para la fase crónica de la enfermedad de Chagas sintomática (infección por *Trypanosoma cruzi*), Oxford. La Biblioteca Cochrane Plus.
54. Rodríguez M.M, Soares MB., 2002. Vasconcelos JR. Endogenous interleukin-4 downregulates the type 1 CD4 T cell-mediated immune response induced by intramuscular DNA immunization. J Interferon. Cytokine Res; 22:1137-41.
55. Rodrigues, M.M., Ribeiro, M., Pereira-Chiocola, V., Renia, L. y Costa, F. 1999. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. Infect. Immun. 67, 3855-3863.
56. Romanha A., Castro S., Correia M., -Vieira J.,Ribeiro J., Talvani A., BourdinB., Blum B., Olivieri B., Zani C., Spadafora C., Chiari E., Chatelain E., Chaves G., Calzada J., Bustamante J., Freitas-Junior L., Romero L., Bahia M., Lotrowska M., Soares M., Andrade S., Armstrong T., Degrave W., Andrade Z. 2010. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. Vol. 105(2): 233-238.
57. Rottenberg ME, Riante A, Sporrang L, Altcheh J, Petray P, Ruiz AM. et al. 1995. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/ or CD8. Immunol Lett;45:53-0.
58. Silveira. A., Rojas, A., Segura, E., Gullén, G., Russomando, G., Schenone, H.2002. El control de la Enfermedad de Chagas en los países del Cono sur de América. Historia de una iniciativa internacional.
59. Schnapp AR, Eickhoff CS, Scharfstein J, Hoft DF., 2002. Induction of B- and T-cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect 2002; 4: 805-13.
60. Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore D, Curtiss R 3rd, Hoft DF. 2002. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. Infect Immun; 70:5065-74.

61. Sepulveda P, Hontebeyrie M, Liegeard P, Mascilli A, Norris KA. 2000. DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection.
62. Sosa. Estani S., Armentia., Araujo G., Viotti R., Lococob., Ruiz Verab., Vigliano C., M. de Rissio A., Segura E. 2004. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas con benznidazol y acido tioctico. Buenos aires, Argentina. medicina; 64: 1-6, ISSN 0025-7680.
63. Stern, AM., Markel, H. 2005. "The history of vaccines and immunization: familiar patterns, new challenges". Health Aff 24 (3): 611–21.
64. Thomas, MC., Longobardo, M. V., Carmelo, E., Marañón, C., Planelles, L., Patarroyo, M.E., Alonso, C., López, M. C. 2001. Mapping of the antigenic determinants of the *T.cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. Clin Exp Immunol. 123:465-471.
65. Valenzuela JG, Ribeiro JM. 1998. Purification and cloning of the salivary nitrophorin from the hemipterian Cimex lecturalius. J Exp Biol; 201:2659-64.
66. Villar J. C., Villar L A., Marin-Neto J.A., Ebrahim S, Yusuf S. 2002. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. In: The Cochrane Library, 4. Oxford. Update Software. CD003463.
67. Wizel, B., Garg, N. y Tarleton, R.L. 1998. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 66, 5073-5081.
68. Wizel, B., Nunes, M. y Tarleton, R. 1997 Identification of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses. J. Immunol. 159, 6120-6130.
69. Wrightsman RA, Miller MJ, Saborio JL, Manning JE. 1995. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun; 63:122-5.
70. Zagursky RJ, Olmsted SB, Russell DP, Wooters JL. 2003. Bioinformatics: how it is being used to identify bacterial vaccine candidates. Expert Rev. Vaccines; 2:89-108. 4.

ANEXO 1. SELECCIÓN DE ARTICULOS SEGÚN CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Año de publicación 2000-2009	Autor	Idioma Español/ingles	Tipo articulo: Carácter experimental/ Revisión de tema	Temas claves: Prevalencia de la enfermedad de Chagas, Impacto en la Salud publica, Creación de vacunas inversas a través de programas computacionales	Proteínas conservadas De importancia para la creación de posibles vacunas contra la enfermedad de Chagas.
2005	Altcheh	Español	Caso clínico	Enfermedad de Chagas congénita	-
2009	Camargo, E.	Ingles	Revisión del tema	Epidemiología Enfermedad de Chagas	Vacunas recombinantes. modelos animales,
2008	Castillo-Riquelme, M., Guh	Ingles	Revisión de casos	Prevención Enfermedad de Chagas	-
2009	Cuellar, A., Rojas, F., Bolaños	Ingles	Carácter experimental	Respuesta inmune contra <i>T. cruzi</i>	-
2004	Cuervo C, Mayorga D	Español	Carácter experimental	<i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Trypanosoma rangeli</i>	Proteína de choque térmico HSP70
2003	De Carvalho, L.P., Soto, M	Ingles	Carácter experimental	-	Antígenos recombinantes
2007	Díez, H, Guzmán, F	Ingles	Revisión literaria	Epidemiología Respuesta inmune contra <i>T. Cruzi</i>	Proteína KMP-11 Candidato vacunal
2004	Diez. H, Lopez. M, Thomas. M	Español	Carácter experimental	Respuesta inmune contra <i>T. Cruzi</i>	Proteínas KMP-11
2004	Dumonteil E, Escobedo-Ortegon J	Ingles	Carácter experimental	Inmunoterapia contra la infección con <i>T. Cruzi</i>	-
2008	Ferreira., J. Porco., A	Español	Carácter experimental	Vacunas derivadas del genoma DNA recombinante	-
2001	Fujimura AE, Kinoshita SS	Ingles	Carácter experimental	Vacunas DNA contra <i>T. cruzi</i> Respuesta inmune	-
2004	Flower DR	Ingles	Carácter experimental	Vacunas Creación de vacunas	Inmuno informática

2002	Garg N, Tarleton RL.	Ingles	Carácter experimental	Inmunización genética. Respuesta inmune	-
2005	Guhl F, Nicholls R, Montoya R	Español	Revisión de Casos	Tratamiento etiológico para Enfermedad de Chagas	-
2007	Hoyos. R, Pacheco. L	Español	Carácter experimental	Enfermedad de Chagas prevalencia en Colombia	-
2002	Katae M, Miyahira Y, Takeda K	Ingles	Carácter experimental	Respuesta inmune	-
2002	Kubata B.K, Kabututu Z, Nozaki T	Ingles	Carácter experimental	Drogas usadas para E. Chagas.	-
2003	Luhrs KA, Fouts DL	Ingles	Carácter experimental	Inmunización PRA	-
2000	Marañón. C Planelles. L Alonso	Ingles	Carácter experimental	Respuesta inmune HP70	-
2008	Marin-Neto, JA., Rassi, A Jr., Morillo	Ingles	Revisión de casos	Tratamiento contra la Enfermedad de Chagas.	-
2010	Meléndez. Enrique, Ramirez M.	Español	Carácter experimental	Genómica y Bioinformática	-
2003	Michailowsky V, Luhrs K, Rocha MO,	Ingles	Carácter experimental	respuesta inmune celular y humoral	-
2009	Nogueira, FB., Ruiz, JC., Robello	Ingles	Carácter experimental	Caracterización Molecular. Resistencia a tratamientos	-
2002	OMS	Español	Revisión de casos	Epidemiología de Enfermedad de Chagas	-
2006	OMS / OPS	Español	Revisión de casos	Epidemiología de Enfermedad de Chagas	-
2002	Ouaisi A, Guilvard E, Delneste	Ingles	Carácter experimental	Respuesta inmune. Tc52	-
2000	Palau M	Español	Revisión literaria	Relación hospedero-parasito	-
2002	Planelles, L., Thomas, MC., Pulgar	Ingles	Carácter experimental	HPS70 y KMP-11	-
2001	Rappuoli. R	Ingles	Carácter experimental	Vacuna reversa	-
2005	Reyes PA., Vallejo M	Español	Revisión de casos	Fármacos. Fase crónica	-
2002	Schnapp	Ingles	Carácter	Cruzipain	-

	AR, Eickhoff CS, Scharfstein J		experiment al	Induction respuesta immune cruzipain	
2002	Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore	Ingles	Carácter experiment al	Cruzipain mucosas	-
2000	Sepulveda P, Hontebeyri e M, Liegeard P	Ingles	Carácter experiment al	DNA Inmunización Regulación de proteínas	-
2002	Silveria. A, Rojas. A	Español	Revisión de la literatura	Epidemiología Enfermedad de Chagas	-
2001	Thomas, MC., Longobardo, M. V., Carmelo	Ingles	Carácter experiment al	KMP-11 Determinación del mapa antigénico	-
2002	Villar J. C, Villar L A	Ingles	Revisión de Casos	Tratamiento Fase asintomática	-
2003	Zagursky RJ, Olmsted SB	Ingles	Carácter experiment al	Candidatos vacúnales	Bioinformática