



Estado del arte y factibilidad de una vacuna contra la Enfermedad de Chagas

Universidad de la República, Facultad de Medicina
Monografía del Ciclo de Metodología Científica II año 2016

Tutor: Prof. Agdo. Carlos Robello

Estudiantes:

Br. Lucía Bonilla

Br. Lucía Centena

Br. Florencia De Polsi

Br. Lucía Fernández

Br. Verónica Guatini

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Justificación	3
Marco teórico	4
<i>Trypanosoma cruzi</i> : Un protozoo complejo	
<i>T. cruzi</i> presenta múltiples mecanismos de internalización a las células hospedadoras	
Respuesta inmune del hospedador frente a <i>T. cruzi</i> :	
- Elementos de la inmunidad adaptativa frente a <i>T. cruzi</i>	
- Elementos de la inmunidad innata frente a <i>T. cruzi</i>	
- Autoinmunidad: ¿Proceso perpetuador de las manifestaciones clínicas crónicas?	
Objetivos	12
Estado del arte en el desarrollo de una vacuna contra la Enfermedad de Chagas	13
Conclusiones y perspectivas	21
Referencias bibliográficas	24
Agradecimientos	32
Anexos	33

JUSTIFICACIÓN

En el año 2000 la Organización de Naciones Unidas reunida en Nueva York celebró la Cumbre del Milenio. Este hito histórico marcó un antes y un después para todos sus Estados miembros, ya que de dicha convención surgen los Objetivos del Milenio⁽¹⁾. Para una disciplina como la medicina esto tiene una importancia sustancial, e implicó reevaluar la visión que los Estados le daban a sus Sistemas de Salud. Uno de estos objetivos es afrontar las llamadas Enfermedades Tropicales Olvidadas o Desatendidas. Estas son un conjunto de enfermedades, muchas de ellas infecciosas, sobre todo parasitarias, que tienen como característica común estar directamente vinculadas con la pobreza, determinando la perpetuación de la misma. Estas enfermedades están particularmente extendidas en América Latina y el Caribe, así como también en Asia y África, afectando a un sexto de la población mundial⁽²⁾. Dentro de estas se encuentra la Enfermedad de Chagas, que tiene una prevalencia estimada de 7 a 8 millones de personas infectadas, de las cuales la mayoría se encuentran en Latinoamérica. Producto de las grandes corrientes migratorias la incidencia en Europa y Estados Unidos también ha aumentado, (teniendo en cuenta que este último presenta casos autóctonos)⁽³⁾. La Enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una infección producida por un protozoo flagelado denominado *Trypanosoma cruzi* transmitido a los humanos por insectos triatomíneos (vinchucas). Los mismos son animales hematófagos y digenéticos. Se encuentran presentes sobre todo en poblaciones rurales, vinculados a residencias de paredes de barro y techos de paja, sin embargo, la migración campo-ciudad ha aumentado la prevalencia en centros urbanos. Si bien la forma más frecuente de transmisión es la vectorial, también existen otras formas de transmisión como la transplacentaria y la transfusional⁽⁴⁾. La enfermedad presenta una fase aguda con sintomatología que suele ser muy inespecífica, un largo periodo de latencia y un estado de cronicidad que puede cursar de manera asintomática o puede llegar a causar graves cuadros miocardiopáticos, gastrointestinales y neurológicos con elevada morbimortalidad⁽⁵⁾. En la actualidad, la mayoría de los países centran el tratamiento en el control de la replicación del parásito, en particular de sus formas amastigotas, ya que se sabe que este hecho retarda, e incluso frena, la progresión de la enfermedad. En lo que se refiere a la prevención de la misma, la política de los Estados se ha centrado en el control del vector, lo que ha generado una disminución notable de la incidencia de 18 millones a 5.7 millones en el período 1991-2010⁽³⁾. Más allá de esto consideramos importante plantear nuevas estrategias de prevención primaria, que eviten la propagación de la afección. En este sentido, creemos importante investigar la viabilidad de una vacuna que prevenga el desarrollo de infecciones parasitarias.

Palabras clave: Chagas, Vacuna, avances.

MARCO TEÓRICO

La Enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una zoonosis parasitaria causada por el protozooario parásito *Trypanosoma cruzi*, y transmitida por insectos triatomíneos. Fue descrita por Carlos Chagas en 1909 en Brasil. Este médico, fue el primer investigador en describir de forma completa la enfermedad, así como el vector, el hospedador y el parásito de la misma⁽⁶⁻⁷⁾.

Según el informe anual 2016 de la Organización Mundial de la Salud⁽⁸⁾, se estima que hay entre seis y siete millones de personas infectadas con *T. cruzi*. Se encuentra principalmente en zonas endémicas países de América Latina, pero como consecuencia de las grandes migraciones de poblaciones se ha generado un aumento de la distribución geográfica, afectando a países de Europa y a Estados Unidos. Las políticas de control de vector adoptadas por algunos Estados han logrado reducciones importantes, tanto en el número de casos agudos así como la disminución de los vectores domiciliarios. El número estimado de muertes anuales en todo el mundo disminuyó de 45.000 personas en la década de 1980 a cerca de 12.000 personas en el año 2008⁽³⁾. A nivel nacional, el último estudio epidemiológico de 2001 indica una franca disminución del área endémica, consecuencia de los programas de control vectorial, de transformaciones socioeconómicas y culturales, cambios demográficos dados por las migraciones desde el medio rural al urbano⁽⁹⁾.

Los vectores biológicos que transmiten la Enfermedad de Chagas al ser humano son insectos hemípteros *reduviidae*, subfamilia *Triatominae*. Las tres especies más importantes en la transmisión son *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Tanto los estadios ninfales como los adultos son hematófagos y capaces de transmitir la enfermedad. Además de humanos, *T. cruzi* puede afectar a más de 150 especies de mamíferos domésticos (ej. perros, gatos) y silvestres (ej. roedores, marsupiales, armadillos), estableciéndose ciclos solapantes domiciliario, peridomiciliario y silvestre. Su agente causal presenta un complejo ciclo de vida, y tres aspectos morfológicos fundamentales. El tripomastigota, fusiforme, con un flagelo en su extremidad anterior, que se encuentra presente en la sangre de mamíferos (circulantes o derivados de células) y en el intestino de la vinchuca (metacíclicos). Es la forma infectante. Epimastigota, fusiforme y con flagelo libre, es la forma de multiplicación en el intestino del insecto. Por último amastigotas, redondeado y con un corto flagelo no emergente, es la forma de multiplicación del parásito dentro de las células de los mamíferos⁽¹⁰⁾.

Con respecto al ciclo, el insecto hematófago se infecta al ingerir sangre de mamíferos con tripomastigotes derivados de células. En su intestino medio los parásitos se multiplican por fisión binaria en su forma epimastigota. Posteriormente se desarrollan tripomastigotes

metacíclicos en el intestino posterior. Cuando el insecto pica a los mamíferos emite deyecciones con tripomastigotes metacíclicos que pueden ingresar al sitio de picadura mediante el rascado. Estos se introducen en las células de los mamíferos donde se transforman en amastigotas, que se multiplican por fisión binaria y repletan las células del hospedero hasta que ésta se lisa. Los parásitos vuelven a circular en la sangre en forma de tripomastigotes derivados de células, diseminándose por los tejidos y repitiendo el ciclo. Finalmente los tripomastigotes derivado de células son ingeridos por triatomas hematófagos para cerrar el ciclo de transmisión (ver anexo 1). Existen otras formas de transmisión además de la vectorial, que cobran importancia en los países en los que hay un control importante del vector o en el que no hay presencia del mismo, como son la transmisión vertical vía transplacentaria, por trasplantes, donación de sangre e incluso vía oral. En nuestro país producto de las políticas de control en banco de sangre y órganos sólo cobra relevancia la transmisión vertical⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

En relación a su presentación clínica, abarca desde una enfermedad asintomática hasta patologías graves que pueden provocar la muerte. Se caracteriza por presentar dos fases bien diferenciadas; una aguda con síntomas sobre todo inespecíficos, seguida de una fase crónica largamente asintomática que puede llegar a durar entre 15 a 20 años. Cuando se manifiestan síntomas, siendo característico la aparición de miocardiopatía chagásica crónica cuya manifestación típicas es la cardiomegalia, y digestivas, principalmente megacolon y megaesófago, pudiéndose observar más raramente en otros órganos⁽³⁾.

El diagnóstico se basa en el trípede clínico, epidemiológico y de laboratorio. En la fase aguda se utilizan métodos directos como el xenodiagnóstico, mientras que en la fase crónica son utilizados métodos indirectos como Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, Inmunofluorescencia Indirecta o Hemoaglutinación indirecta⁽³⁾.

El tratamiento de la Enfermedad de Chagas está dirigido a eliminar el parásito, evitar la aparición o progresión de lesiones viscerales e interferir en la transmisión de la misma. Varios estudios han demostrado que los fármacos más eficaces para el tratamiento de la enfermedad causada por *T. cruzi* son Nifurtimox y Benznidazol⁽¹²⁻¹³⁾. A pesar de que actualmente se utilizan estos tratamientos mencionados, los mismos no son ideales, presentan múltiples efectos secundarios y presentan altos niveles de toxicidad para el organismo. Por lo tanto es necesario mejorar los tratamientos farmacológicos existentes y desarrollar medicamentos más efectivos y seguros, así como vacunas para el control de la enfermedad.

En el año 1997 un grupo de expertos internacionales pertenecientes a la Iniciativa Intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans*, declararon interrumpida la transmisión vectorial en Uruguay⁽¹⁴⁾. Esto se dio gracias a la implementación de diferentes medidas de prevención primaria dentro de las cuales se encuentra la educación de la población,

el ataque sistemático a los vectores que infectan las viviendas que son aptas para la colonización del vector con insecticidas con efectos residuales⁽¹⁵⁾. Así mismo, se realizaron planes para reemplazar o mejorar las viviendas a efectos de evitar que los insectos se alojen en las mismas, abordando los determinantes sociales de la enfermedad, como también la educación en torno a buenas prácticas en la manipulación de alimentos en áreas donde se producen brotes por ingestión de alimentos contaminados⁽¹⁵⁾. Además la transmisión transfusional se encuentra controlada a través del tamizaje con pruebas serológicas de sangre y órganos de donantes⁽¹⁶⁾. Una vez contraída la enfermedad en embarazadas, el riesgo de transmisión congénita es de un 4%, por lo que en el año 1995 se incluyó dentro de los exámenes de control obstétrico la serología para Chagas⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

Trypanosoma cruzi: Un protozoo complejo.

T. cruzi es un organismo unicelular, diploide, con un polimorfismo genético marcado en el que se destacan seis genotipos diferentes. El contenido haploide es de 67Mb con aproximadamente 12.000 genes. En su genoma existe hasta un 50% de secuencias repetidas, de las cuales la mayoría son familias de genes que codifican proteínas de superficie como mucinas y transalidasas (TS), generando una gran diversidad de secuencias y diferentes tipos de proteínas de superficie. Dada su condición de parásito obligatorio de múltiples hospedadores, *T. cruzi* debió adquirir a lo largo de su evolución una alta plasticidad de expresión génica y gran capacidad de adaptación a micro ambientes cambiantes. Esta necesidad de respuesta rápida frente a cambios abruptos parecería contradecirse con los múltiples y estrictos mecanismos de regulación génica de organismos eucariotas⁽¹⁹⁾. En lo que respecta a los genes de *T. cruzi*, estos se encuentran en tándem, sin intrones, no relacionados funcionalmente entre sí, y no se ha logrado reconocer la presencia de promotores canónicos para cada gen como sucede en una célula eucariota típica. La transcripción es policistrónica, formándose un pre-ARNm de genes no relacionados juntos que durante el proceso de maduración son escindidos en diferentes ARNm por un proceso llamado trans-splicing, en el cual los diferentes genes transcriptos son separados y a cada uno de ellos se le agrega una secuencia consenso (secuencia líder) una cap 5' y una cola poly A. Este proceso que lleva de un pre-ARNm policistrónico a varios ARNm monocistrónicos, de los cuales no todos van a ser traducidos, está regulado por diferentes mecanismos, destacándose la unión de proteínas que pueden estabilizar el ARNm y darle una vida media más larga o desestabilizarlo y permitir su degradación. Esto permite la regulación de la expresión génica y le brinda al parásito un pool de pre transcriptos de diferentes genes accesibles para su rápida utilización⁽¹⁹⁾.

Existen una serie de genes que sufrieron una gran expansión génica que codifican fundamentalmente proteínas de superficie del parásito, de gran importancia para la relación del mismo con los múltiples medios y células que está en contacto. Estas son las superfamilias o familias multigénicas. La primer superfamilia a destacar es la de las TS, proteínas que se encuentran ancladas a la membrana parasitaria por glicosylfosfatidilinositol (GPI). Se piensa que la expansión de las TS es debida a la gran presión del sistema inmune humoral y celular a las que se exponen. Debido a que el parásito es incapaz de sintetizar ácido siálico *de novo*, la principal función de las TS es la transferencia del mismo desde las células del hospedero con la consiguiente unión de éstos a los residuos β -Gal de las mucinas del parásito⁽²¹⁾.

Otra superfamilia corresponde a las mucinas, siendo éstas los componentes expresados en mayor número en la superficie de *T. cruzi* con mayor expansión en el genoma del parásito (863 genes). Estas proteínas, poseen dos funciones principales: proveer al parásito de protección contra el vector y/o mecanismos defensivos del hospedador y asegurar el anclaje y la invasión en células y tejidos específico⁽²⁰⁻²¹⁾.

Otra superfamilia es la de las Proteínas de Superficie Asociadas a Mucina “MASP”. Esta familia fue descrita luego de la secuenciación del genoma de *T. cruzi* y se le adjudicó ese nombre ya que se sitúa entre grandes agrupaciones de genes correspondientes a las TS y las mucinas previamente descritas. Aunque no se sabe el papel exacto de esta familia de proteínas, es posible que sean resultado de la adaptación del parásito a las múltiples situaciones de stress que provoca la ampliación del número de proteínas de superficie para interactuar con las células del hospedador, generando variabilidad antigénica⁽²¹⁾.

Finalmente, la familia DGF-1 (Dispersed Gene Family-1) codifica una serie de proteínas que se localizan en la superficie de tripomastigotas y en el citosol de amastigotas, se cree que tienen actividad similar a las integrinas⁽²¹⁾.

El anexo 2 es una imagen ilustrativa de las proteínas de superficie de importancia para los procesos de adhesión a las células hospederas, varias de ellas siendo expresión de las familias multigénicas.

Otro elemento importante a destacar son las proteínas paraflagelares (PFRs), que forman el filamento paraxial o paraflagelar, un complejo de entramado de filamentos de 150 nm que se sitúa paralelo al axonema en la mayoría de los flagelos de los tripanosomátidos, esencial para la movilidad y viabilidad del parásito. Se han identificado dos principales PRFs en diversas especies de tripanosomátidos PRF1 y PRF2, son altamente conservadas en las especies. En *T. cruzi* se han descrito dos proteínas PFR adicionales, PFR3 y PFR4. Las PFR en *T. cruzi* proporcionarían una elevada inmunogenicidad que estimula la respuesta protectora⁽²²⁾.

T. cruzi presenta múltiples mecanismos de internalización a las células hospedadoras

Las proteínas de superficie parasitarias previamente descritas son de gran importancia para la adhesión parasitaria con el fin de que se produzca el proceso de internalización a las células del hospedero. A su vez, la cruzipaina (CZ), una proteasa secretada por *T. cruzi*, es importante para abrir paso al parásito hacia la célula hospedera blanco. La CZ tiene varias funciones, entre ellas la digestión lisosomal de proteínas, la protección contra la respuesta inmune del hospedador por destrucción del fragmento Fc de las inmunoglobulinas ligadas a antígenos, y un papel en la penetración del parásito ya que el bloqueo de la CZ inhibe la misma⁽²³⁾. El proceso de internalización, se produce a través de diferentes vías que abarcan mecanismos endocíticos como fagocitosis clásica y por solapamiento, macropinocitosis, autofagia, endocitosis mediada por dominios de membrana (destacándose caveolina y flotilina) y endocitosis dependiente de clatrina. A su vez, este proceso puede ser calcio dependiente o independiente. El proceso calcio dependiente consiste en la exocitosis de lisosomas en el sitio de entrada del parásito con la consiguiente fusión y formación de la vacuola parasitófora. Durante mucho tiempo se lo consideraba el único método de ingreso del parásito, actualmente se conoce que más del 50% se produce por mecanismos no dependientes de calcio. Una vez culminado el proceso de adhesión e internalización, se produce la formación de endosomas tempranos con la consiguiente maduración hacia endosoma tardío produciéndose la vacuola parasitófora. Ha sido demostrado que el 50% o más de las tripomastigotas utilizan la membrana de la célula hospedera durante la formación de la vacuola parasitófora y se ha sugerido que este proceso es facilitado por la despolimerización de la actina de la célula hospedera⁽²⁴⁻²⁵⁾.

Respuesta inmune del hospedador frente a *T. cruzi*:

- **Elementos de la inmunidad innata frente a *T. cruzi***

Durante la fase aguda de la infección, la inmunidad innata actúa mediante la inducción de diversos mediadores pro inflamatorios, siendo la IL12 uno de los mediadores clave en la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares, al inducir el desarrollo de las células Th1 y la activación de las células natural killer (NK). En los macrófagos activados, el INF γ , induce la expresión de la iNOS responsable de la producción de NO que actúa como un citostático para los microorganismos intracelulares. Durante la infección, estas moléculas actúan iniciando una respuesta inmune que controla la replicación intracelular del parásito. A través de la proteína de respuesta primaria mieloide (MyD88) se desencadenan cascadas de señalización corriente abajo conduciendo a la activación de factores de transcripción responsables de la expresión de genes

de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que participan en las respuestas antimicrobianas. Componentes derivados de *T. cruzi* inducen una respuesta inflamatoria asociada con la resistencia del hospedero a la infección por parásitos a través de la activación de la inmunidad innata y la posterior diferenciación de células T CD4⁺ vírgenes a efectoras Th1. El GPI, y, glicoproteínas tipo mucina ancladas en la superficie de la membrana de las formas tripomastigotas de *T. cruzi*, induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias y NO en células de la inmunidad innata. Todos los eucariotas tienen GPI anclado a la membrana, pero algunos parásitos como *T. cruzi*, expresan de 10 a 100 veces más GPI, el cual además es estructuralmente diferente al de la célula del hospedero. Componentes derivados de *T. cruzi* mediante el anclaje a GPI inducen la activación de NF-κB mediante la señalización dependiente de TLR2 específicamente. Además de las GPI-ancladas, la proteína Tc 52 liberada por *T. cruzi*, ha sido identificada como un potente inductor de la activación de TLR2 en las células inmunes innatas humanas y de ratón. TLR2 y TLR9 son los principales TLRs implicados en el reconocimiento de *T. cruzi* en la vía dependiente de MyD88. La activación de la vía independiente, a través de TLR3 y TLR4, lleva a la inducción de interferones de tipo I (IFNs). Existen mecanismos independientes de TLR para el reconocimiento de diversos patógenos. La liberación de oligopeptidasa-B y CZ, provoca cambios transitorios y repetitivos de calcio intracelular en las células hospederas, lo que llevará a la maduración de células dendríticas e IFN γ independientemente de TLR, que producirán liberación de IL12. También se estimula la inmunidad innata a través de los receptores tipo NOD⁽²⁶⁾. Los tripanosomas evaden la vía clásica y la vía dependiente de lectina del complemento uniéndose a la convertasa de C3 que es esencial para poder producir la lisis celular por estas vías. *T. cruzi* es capaz de inactivar la vía de las lectinas mediante la neutralización de la unión de la lectina de unión a Manosa (MBL) a los carbohidratos de la superficie del parásito. Otras moléculas relevantes en la evasión del complemento son la calreticulina y las mucinas que le confieren protección contra este tipo de defensa⁽²⁷⁾.

- **Elementos de la inmunidad adaptativa frente a *T. cruzi***

T. cruzi invade y se replica en la mayoría de las líneas celulares de los hospedadores, por lo que la inmunidad celular es de gran importancia para resolver la infección. La depleción de CD8 o CD4 tiene como resultado parasitemia sostenida y un curso más severo en modelos animales ya que una depleción de CD8⁺ *in vivo* genera un curso de la enfermedad más exacerbado. Se han descrito varios epítopes en antígenos de TS de *T. cruzi* que produce la inducción de la respuesta inmune por células CD8⁽²⁸⁾. Otro punto a destacar es el rol de la coestimulación CD28-CD80/86. La deficiencia en la molécula CD28 o el bloqueo simultáneo de

CD28-CD80/86 tiene como resultado un aumento de la susceptibilidad en la infección contra *T. cruzi*, con descenso de INF γ ⁽²⁹⁻³⁰⁾. Se piensa que el estímulo más fuerte para iniciar la respuesta inmune frente a *T. cruzi* ocurre luego del primer ciclo de replicación del parásito y de la muerte de las primeras células hospedadoras a partir del día cuatro o cinco post infección, a través de la activación de linfocitos T CD8+ (LTCD8+), permitiendo así un tiempo de replicación sin ningún tipo de respuesta adaptativa de aproximadamente una semana⁽²⁹⁾.

Respecto al establecimiento de la infección, una de las hipótesis planteadas es que los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) del parásito no son expuestos durante el comienzo de la infección, por lo que los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PPRs) no interactúan con los mismos. Cuando los PAMPs son expuestos al sistema inmune del hospedero, luego de un primer ciclo de replicación en las células del mamífero, la carga parasitaria es alta y el sistema inmune no es capaz de controlar la infección. Esta hipótesis está sustentada por el hecho de que la expresión de PAMPs exógenos genera una respuesta inmune inmediata e intensa⁽³¹⁾.

- **Autoinmunidad: ¿proceso perpetuador de las manifestaciones clínicas crónicas?**

El papel que juega la autoinmunidad en la patogenia de la Enfermedad de Chagas no está completamente dilucidado y en algunos aspectos es aún muy controvertido. Se han propuesto diversos mecanismos que explican la forma en la que procesos autoinmunes influiría en el desarrollo de las manifestaciones crónicas de la enfermedad. Si bien en la actualidad hay consenso de que este factor juega un rol preponderante, la discrepancia que se plantea es si la misma es consecuencia de la presencia directa del parásito o de alguna toxina del mismo en los tejidos o si se desarrolla como un mecanismo independiente. Este último planteo se sustenta en el hallazgo de manifestaciones cardíacas en ausencia de tejido con contenido parasitario. En relación a los mecanismos concretos que se proponen, se destaca el infiltrado de células mononucleares que dañan de forma directa los miocardiocitos y las células T periféricas que desarrollan respuestas contra el tejido cardíaco. Se han propuesto tres mecanismos que podrían involucrarse en el desencadenamiento de la respuesta autoinmune. La *exposición a antígenos* descrito tanto en la fase aguda como en la crónica, se debe a la exposición que sufren los miocitos a proteínas intracelulares, sumado a la activación de la inmunidad innata y a la respuesta inflamatoria del miocardio. El *mimetismo molecular*, sostiene que las células B y T reconocen antígenos parasitarios que presentan este fenómeno con epítopes antigénicos del hospedador, generando respuestas autoinmunes con reacción cruzada. Finalmente se han descrito fenómenos de *activación policlonal* en animales de experimentación, en donde la infección aguda induce la producción de anticuerpos que no se encuentran presentes en *T. cruzi*,

esto incluye autoantígenos que actúan destruyendo las neuronas del sistema autónomo de las vísceras huecas, lo que explica los agrandamiento que sufren por ejemplo el corazón, el colon, etc⁽³²⁾.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Realizar, a través de una revisión bibliográfica, un análisis del estado de situación y determinar la posibilidad de que se desarrolle una vacuna contra la Enfermedad de Chagas.

Objetivos específicos.

- Evaluar los aspectos más relevantes de la Enfermedad de Chagas, con especial énfasis en su epidemiología, ciclo vectorial, manifestaciones clínicas, tratamiento y prevención de la misma.
- Desarrollar los aspectos más relevantes de la biología del protozoo *Trypanosoma cruzi*, así como sus mecanismos de adhesión e invasión.
- Detallar los elementos más destacados de la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero mamífero así como caracterizar los posibles mecanismos autoinmunes implicados en la patogenia de la enfermedad.
- Revisar los principales modelos de vacunas que se encuentran en desarrollo actualmente para la Enfermedad de Chagas.
- Establecer perspectivas en relación a cuáles estrategias permitirían desarrollar vacunas tanto profilácticas como terapéuticas para esta enfermedad.

ESTADO DEL ARTE EN EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La vacunología ha sido un campo de desarrollo científico primordial durante los últimos dos siglos, erradicando múltiples enfermedades con elevada morbimortalidad. Sin embargo la constante evolución del conocimiento científico y la lucha frente a nuevas enfermedades y organismos más complejos, han comenzado a dejar obsoleta la estrategia inicial de elaboración de vacunas siguiendo un procedimiento empírico, dado por el aislamiento del organismo en estudio, su atenuación o inactivación y su posterior inoculación al hospedero, a un cambio en el paradigma de creación de vacunas apoyándose en el desarrollo constante de nuevas áreas del conocimiento a nivel molecular y nuevas estrategias que incluyan la variabilidad interpersonal de la inmunidad y la alta tasa de variabilidad y mutación de patógenos para la generación de estrategias terapéuticas más efectivas. Dentro de este cambio de paradigma se vuelve imprescindible el conocimiento del genoma del organismo en estudio, para luego a partir de este poder reconocer y expresar antígenos que puedan ser importante en la respuesta inmune. Entre estos nuevos modelos se destaca: las vacunas recombinantes, utilizando como vectores plásmidos o virus (adenovirus), las vacunas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) o la formación de proteínas recombinantes. Otro avance fundamental es la creación de nuevos adyuvantes más efectivos y con menos efectos secundarios. La búsqueda de una vacuna profiláctica o terapéutica para las enfermedades causadas por protozoos y en particular para la Enfermedad de Chagas tiene una larga historia, pudiendo reconocer como dificultades, la falta de un conocimiento claro y certero respecto a la fisiopatología de la enfermedad y de los mecanismos determinantes en la evolución de la misma. Igualmente se han estudiado múltiples estrategias de vacunación evaluadas en ratones, cerdos y perros, pero sin haber llegado ninguna a testearse en humanos. En líneas generales es necesario definir los epítopes ideales a utilizar, los adyuvantes más adecuados y la vía de administración más eficaz. Los primeros estudios utilizaron fracciones celulares de *T. cruzi*, tanto en su forma tripomastigota, como epimastigota, pero estos no fueron efectivos ya que la respuesta inmune generada fue subóptima. Posteriormente se utilizaron parásitos atenuados, pero estos tampoco tuvieron los resultados esperados, ya que si bien la respuesta inmune era fuerte, el riesgo de reversión del estado atenuado al virulento era alto. Luego se utilizaron proteínas purificadas, entre las que destacamos PFRs, CZ y Proteínas de Superficie de Amastigotas 2 (ASP-2), las cuales sí generaron una fuerte respuesta humoral, si bien no fueron tan efectivas en modular la respuesta Th1. En los últimos años se probaron vacunas con combinaciones de diferentes proteínas, pero éstas no han demostrado superioridad. Por último actualmente los estudios están enfocados a la generación de vacunas con nuevas estrategias, plásmidos, adenovirus, ADN y proteínas recombinantes⁽³³⁾.

En base a los artículos analizados nos detendremos en la descripción de tres estrategias experimentales cuyos resultados han generado aportes sustanciales en el campo desarrollo de vacunas para la Tripanosomiasis Americana, y permiten recorrer la situación actual del tema. En el anexo 3 se encuentra una tabla en base a la selección de artículos que estudian diferentes formulaciones de vacunas. A continuación se comentan cinco de los artículos incluidos en la tabla que permiten recorrer brevemente la situación actual.

El trabajo de Resende y colaboradores⁽³⁴⁾, refiere a una vacuna compuesta por un vector de Adenovirus 5CD4 recombinante de replicación defectiva (rAd) que transporta consigo dos antígenos de *T. cruzi* (rAdVax): la proteína de superficie de amastigotas 2 (rAdASP2) y la transialidasa (rAdTS), estudiando los efectos de su administración profiláctica (inmunización previa a la infección) y terapéutica [administración 120 días post infección, “dpi” en que los ratones C57BL6 (C6) ya presentaban cardiomiopatía chagásica]. Respecto a la vacunación profiláctica, se propusieron objetivar si la misma producía respuesta humoral y celular, si reducía la carga parasitaria a nivel cardíaco e injuria miocárdica en fase aguda. Para la vacunación terapéutica, se determinó si la vacuna podría enlentecer y revertir la cardiomiopatía chagásica y si esto se asociaba a una reprogramación en el perfil de respuesta inmune. En una primera instancia se comprobó que la inmunización con rAdVax reducía la concentración de parásito a nivel cardíaco y la injuria miocárdica en la fase aguda. Se procedió a administrar tres tipos de formulaciones a grupos de ratones. Un grupo control se les inyectó suero salino, otro grupo se inyectó Adenovirus 5 recombinante defectivo sin los antígenos (rAdCtrl) y al tercer grupo se les administró rAdVax. La profilaxis con rAdVax no alteró la curva de parasitemia ni la esplenomegalia inducida por *T. cruzi* respecto a los ratones que no se les administró ninguna formulación. Sin embargo, se redujo significativamente la carga parasitaria en el tejido cardíaco durante la fase aguda. A su vez, la profilaxis no alteró el número de células CD4⁺ ni de macrófagos F4/80 pero redujo significativamente el número de células CD8⁺ que infiltran el miocardio a los 50 dpi. Además, la inmunización profiláctica con rAdVax disminuyó la incidencia de arritmia sinusal (ART) y bloqueo aurículo ventricular de primer y segundo grado del 100% en los ratones inyectados con solución salina o con rAdCtrl, a 20% en ratones inmunizados con rAdVax. Respecto a la vacuna terapéutica, se comprobó que rAdVax era capaz de enlentecer la progresión e incluso revertir la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC). Para llegar a dicha conclusión, se estudió en ratones 120 dpi la presencia de alteraciones electrocardiográficas (prolongación de la onda P y disminución de la frecuencia cardíaca) detectándose que 80% de los ratones infectados tenían alteraciones en el electrocardiograma (ECG). A los 160 dpi, el 100% de los grupo control (suero salino y rAdCtrl) presentaron alteraciones en el ECG mientras que sólo el 40% de los ratones inmunizados con rAdVax

presentaba alteraciones electrocardiográficas. Por otra parte mientras que el 80% de los ratones presentaba alteraciones en el ECG previo a la inmunización, sólo el 40% de los ratones vacunados con rAdVax presentaba ART y BAV 2 a los 230 dpi. La fase crónica de la CCC en los ratones infectados se caracteriza por injuria miocárdica dada por la desorganización de la connexina 43 (Cx43) y depósito de fibronectina, así como un aumento en la actividad CK-MB sérica (enzima que se libera en presencia de situaciones que generan lesiones miocárdicas). Se comprobó la hipótesis de que la vacuna podría llegar a revertir la injuria miocárdica, analizando el tejido cardíaco de ratones sacrificados 120 dpi previo a la administración de rAdVax para realizar comparaciones posteriores. No hubo diferencia en la sobrevivencia de los ratones que se les administró suero salino o rAdCtrl, todos ellos habían muerto a los 200 dpi (correspondiente a 70 días post-terapia), a diferencia de los inmunizados con rAdVax que habían sobrevivido el 87%. Los ratones sobrevivientes se analizaron con ECG a los 230 dpi (110 días post-terapia) y luego sacrificados para estudiar los tejidos cardíacos, bazo y plasma. Se detectó una disminución significativa de la esplenomegalia inducida por *T. cruzi*. De forma similar al estadio pre-terapia, la carga parasitaria a nivel cardíaco y sérico era baja. Sin embargo, la inmunoterapia redujo de forma significativa el depósito de fibronectina en el miocardio y se revirtió la desorganización de Cx43. Respecto a los niveles de CK-MB eran menores en comparación con el estadio pre-terapia. Se comprobó que los efectos beneficiosos de la terapia con rAdVax en los ratones infectados crónicos se asociaba a una reducción de la activación policlonal anómala que se observa en los ratones con infección crónica cambiando la respuesta inmune a un perfil protector ya que los ratones inmunizados con rAdCtrl presentaron una intensa respuesta de IFN γ con estimulación de células mononucleares con anti-CD3 y CD28 (marcadores de infección crónica), y este tipo de respuesta fue suprimida en los ratones tratados con rAdVax. A su vez, se estudió la presencia de LTCD8+ con expresión CD107a (marcador de desgranulación usado para evaluar la actividad citotóxica). Los ratones infectados con *T. cruzi* presentan un aumento de CD8 que expresan cd107a y este aumento fue suprimido por la administración de rAdVax. El óxido nítrico (NO) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) están asociados con la injuria miocárdica en la cardiomiopatía chagásica. Los ratones vacunados con rAdVax mostraron un descenso significativo en los niveles séricos de NO en comparación con los vacunados con rAdCtrl. Por otro lado, la expresión de ARNm de iNOS/NOS2 en el tejido cardíaco de los ratones infectados en fase crónica se redujo significativamente.

El segundo trabajo que se pretende destacar, producido por Farrow y colaboradores⁽³⁵⁾, tiene como objetivo determinar la eficacia y magnitud de la respuesta inmune celular y humoral específica frente a *T. cruzi* utilizando como vector un adenovirus, la innovación de esta investigación radica en primer lugar en la utilización de un serotipo de un nuevo adenovirus

Ad48, frente al previamente utilizado Ad5, ya que este último presenta una alta tasa de inmunidad preexistente en la población por lo que se plantea que la utilización de un nuevo serotipo podría ocasionar una respuesta inmune más efectiva. En segundo lugar los Ad construidos en este trabajo tienen la capacidad de expresar los antígenos incorporados en la cápside del virus. Se utilizaron como antígenos las ASP-2, ASP-C (epítotope de la región c-terminal de ASP-2) y gp-83, unidas a la región de un gen menor de cápside pIX de Ad5 y Ad48 y se inmunizaron ratones C6. Al medir la respuesta celular específica y las citoquinas inflamatorias frente a ASP-2, hubo un aumento significativo de las mismas en los ratones inmunizados con el ADN recombinante del serotipo 48 frente a los ratones con el serotipo 5 y con el grupo control, mientras que no hubo una respuesta celular significativa frente al antígeno ASP-C en ninguno de los tres grupos. Respecto a la respuesta humoral, no hubo diferencias significativas en los niveles de IgG frente a las diferentes formulaciones administradas, sin embargo luego de la dosis refuerzo el incremento de IgG fue significativo en los ratones inmunizados con AD48-pIX-GP83.

Los dos estudios descritos anteriormente⁽³⁴⁻³⁵⁾ plantean la utilización de Ad como vector para la producción de una vacuna para la Enfermedad de Chagas. En el primer estudio se utiliza el serotipo 5 perteneciente al grupo de Ad C, se estima que entre un 50 a 90% de la población presenta inmunidad pre existente frente a este serotipo, lo cual podría reducir su efectividad, sin embargo en el estudio se citan investigaciones en las que se utilizaron Ad5 contra Malaria y Tuberculosis con éxito en lo que respecta a la efectividad. El cambio a un serotipo menos prevalente como Ad48 podría ser una buena opción, aunque la prevalencia real del mismo no está claramente establecida. El trabajo que utiliza rAdVax mide la efectividad del tratamiento tanto de forma profiláctica como terapéutica, ambas con buenos resultados: aumento de la respuesta celular y humoral frente a antígenos, disminución de alteraciones cardíacas (eléctricas y estructurales) asociadas a una reprogramación en el perfil inmunológico. Sin embargo no disminuye la parasitemia planteándose la interrogante de si es condición *sine qua non* la disminución de la parasitemia para el control de la progresión de la enfermedad o esta se puede lograr mediante la modulación de la respuesta inmune. La investigación de Farrow y colaboradores⁽³⁶⁾ demuestra que la incorporación de antígenos de *T. cruzi* en la superficie del vector puede inducir por sí misma inmunidad en el hospedero, aunque no se estudia si esta respuesta inmune es eficaz en presencia de infección.

Otro trabajo seleccionado, desarrollado por Morell y colegas⁽³⁶⁾ tiene como objetivo evaluar la respuesta inmunológica generada contra las PFR de *T. cruzi* PFR2 y PFR3 en ratones BALB/c y C6 que se inmunizaron con plásmidos de ADN que contenían los genes PFR2 y PFR3 solos o fusionados con el gen HSP70 de *T. cruzi*, y los refuerzos se realizaron con las

proteínas recombinantes. Se determinaron las concentraciones de IgG en sangre, así como la presencia de focos inflamatorios en el tejido cardíaco de los ratones. La razón por la que se consideraron vacunas de ADN, es que según los autores en estudios previos las mismas permitieron desarrollar respuestas inmunes de células T citotóxicas, particularmente con tipos de respuestas Th1, a su vez también consideran que apoyándose en trabajos previos este tipo de respuesta se ve beneficiada cuando se potencia con adyuvantes como la proteína parasitaria HSP70⁽³⁷⁾. La elección de las proteínas PFR está fundamentada en que las mismas son componentes esenciales del flagelo del parásito, tanto para su movilidad como para lograr su adhesión a las células del hospedador, sumado a que en reportes recientes el uso de estas proteínas, particularmente las PFR2 y PFR3 combinadas con otros adyuvantes fueron capaces de lograr una respuesta inmune protectora⁽³⁸⁾. Para el estudio se usaron ratones BALB/c y ratones C6, a los que se les administró de forma intramuscular un plásmido (pCMV4). A cada ratón se le administró un plásmido diferente y a cada espécimen se le inmunizó cuatro veces en intervalos de 3 semanas, midiéndose luego la respuesta inmune celular en cada uno. Otros ratones BALB/c se utilizaron para medir el daño cardíaco que se había generado, y para esto se les administró tripomastigotas atenuados, luego de 10 semanas de la última inmunización. La primera conclusión que obtiene el presente trabajo es que los ratones reportados en este estudio muestran que la respuesta humoral inducida por los plásmidos es significativa y que la misma es independiente del haplotipo y particularmente alta comparada con la inducida por otros antígenos de *T. cruzi*⁽³⁹⁻⁴²⁾. Además se vio que la respuesta inmune era dosis dependiente y sostenida en el tiempo, obteniendo los máximos valores a las seis semanas luego de la cuarta inmunización. La respuesta de IgG aparece más temprano en los ratones BALB/c que en los C6, y los anticuerpos generados se mantienen en el tiempo, particularmente los que son generados por la inmunización PFR2-HSP70. El estudio⁽³⁸⁾ señala que para que la respuesta inmune pueda ser desencadenada, la presencia de los genes PFRs producen proliferación celular. La misma se midió al evaluar tejido esplénico de los ratones. En este sentido se observó que cuando se administró la proteína fusionada, los índices de estimulación celular fueron ligeramente más bajos que cuando se administró PFR aisladamente. Estos resultados son compatibles con estudios previos en los que la proteína HSP70 fue administrada fusionada con KMP11 y la proteína ribosomal L14 de *Leishmania brasiliensis*⁽⁴³⁾. Los datos también muestran que los valores de INF γ y IL12 (indicadores de Th1) fueron significativamente altos en los esplenocitos de los ratones inmunizados con el gen fusionado PFR2-HSP70 que en los que fueron inmunizados aisladamente con PFR2 o PFR3. Por el contrario, en los ratones inmunizados únicamente con PFRs los valores de IL4 (indicador de Th2) fueron significativamente mayores que en los que se administró los genes fusionados. Por otro lado, los datos muestran que las

vacunas con genes fusionados conducen a producir linfocitos T citotóxicos específicos contra proteínas PFRs. Estas células T citotóxicas no estaban presentes en los ratones inmunizados solamente con genes PFRs. Se propone como explicación para este fenómeno en otros estudios^(39,45) que la presencia de HSP70 es capaz de inducir la maduración de células dendríticas. Con respecto a prevenir el daño en la fase crónica de la enfermedad se evaluó el tejido cardíaco de los ratones que sobrevivieron. Esto muestra que los ratones inoculados con PFRs presentaban menor daño cardíaco, y el número de lesiones asociadas con la miocardiopatía era menor. Específicamente de los ratones inoculados con el gen fusionado PFR2-HSP70, el 75 % no presentó ningún daño tejido cardíaco, y el 25% presentó pocos y débiles focos inflamatorios. En conclusión el presente trabajo evalúa la capacidad de una vacuna contra la infección de *T. cruzi* en su fase crónica, usando genes de proteínas PFRs y proteínas HSP70 como adyuvante, en la forma de genes fusionados. El aporte radica en que los especímenes previamente inmunizados con genes fusionados PFR2-HSP70 presentaron una disminución significativa de los daños a nivel del tejido cardíaco y en mucho de los casos la ausencia completa de daño.

En otro trabajo a destacar⁽⁴⁶⁾ se utiliza CZ como parte de la formulación de vacunas profilácticas. Por un lado se evalúa la respuesta inmune diferencial en ratones C6 y BALB/c a la CZ. La inmunización de la cepa de ratones BALB/c con el antígeno CZ, enzimáticamente inactiva, genera una respuesta autoinmune celular y humoral a nivel del músculo esquelético y cardíaco conduciendo anormalidades funcionales en ambos tejidos. El rol de la carga genética del hospedero que influyen sobre la resistencia y susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* no es del todo conocida, y el presente trabajo tuvo como finalidad el esclarecimiento de los mecanismos patogénicos y de protección de la autoinmunidad cardíaca, para lo cual se determinó la naturaleza y el nivel de la respuesta inmune innata. Se utilizaron como antígenos, CZ purificada de las formas epimastigota de *T. cruzi Tulahuen* y la proteína recombinante transialidasa (rTS) producida en plásmido de *E. coli*. Se utilizaron extractos ricos de la miosina cardíaca de ratón (M-HM). Se inmunizaron ratones B6 y BALB/c mediante inyección intradérmica con la CZ inactivada o rTS, y un grupo control se inmunizó con ovoalbúmina (OVA), usando adyuvante de Freund en todos los casos. Se analizaron las diferentes respuestas de la inmunidad humoral específica y la respuesta inmune celular. En los ratones B6 no se detectaron anticuerpos anti miosina cardíaca luego de la inmunización con CZ, pero en los ratones BALB/c se encontraron todos los isotipos de IgG. En ambos tipos hubo proliferación de las células esplénicas luego de la estimulación con CZ, pero la tasa de proliferación fue menor en los B6, y en estos los esplenocitos no proliferaron contra los antígenos propios M-HM, mientras que los BALB/c mostraron una respuesta proliferativa significativa. Luego de la estimulación con CZ, los esplenocitos de los B6 liberan altos niveles de $INF\gamma$ y bajos niveles de

IL4, por lo que la inmunización produce una marcada regulación de citoquinas proinflamatorias, mientras que en los ratones BALB/c la inmunización produjo una regulación en más de las citoquinas Th2. El perfil de citoquinas se relaciona con los genes y el tipo de antígeno. La expresión de GATA-3, un factor de transcripción para la expresión de citoquinas T2 en CD4+, fue insignificante en las células de B6 inmunizadas con CZ, mientras que fue regulada en más en esplenocitos de ratones BALB/c, y esta regulación se asocia a los altos niveles de IL4 en esta cepa. El mayor número de los linfocitos B inducidos por CZ en ratones BALB/c estaría relacionado con la presencia de anticuerpos autorreactivos contra la M-HM y el receptor muscarínico de acetilcolina M2 por lo que habría una activación diferencial de células B. Los ratones B6 con falta de respuesta cardíaca autoinmune y celular no mostraron cambios significativos en los niveles marcadores bioquímicos de daño tisular (CPK y LDH) y no se encontró evidencia de anormalidades electrocardiográficas o en cortes histológicos en el corazón. La ausencia de la autoinmunidad cardíaca y de daños en la cepa B6 se puede explicar en parte por el alto nivel de TGF β ya que tiene un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis inmune y la auto-tolerancia. Los altos niveles de IFN γ son acompañados por altos niveles de TGF β y ausencia de respuesta autoinmune, TGF β actúa como una citocina inmunomoduladora que mantiene el equilibrio entre los efectos protectores y patogénicos de la respuesta inflamatoria. No se encontraron cambios significativos en los esplenocitos de ratones B6. Sólo la cepa de ratón que desarrolló cardiomiopatía mostró un aumento del número de esplenocitos Mac-1 y CD11c que juegan un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa, así como en la autoinmunidad.

En otro estudio con CZ⁽⁴⁷⁾ se estudian los efectos a nivel sistémico y a nivel de la mucosa en ratones BALB/c, con la cepa *Tulahuén* de *T. cruzi* en estadio tripomastigota. Posteriormente, se prosiguió a la generación de líneas de células T y a la comprobación de su respuesta frente a la infección del parásito *in vitro*, líneas de células T específicas para CZ fueron obtenidas a partir de ratones BALB/c infectados. Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con IL12 al día durante 18 días, estos ratones también fueron inyectados por vía intraperitoneal con anti-IL4 neutralizante. En el día 4, los ratones fueron infectados con tripomastigotas metacíclicos. Dos meses después de la infección, se recogieron los bazo de estos ratones, y células T CD4+ se purificaron, las células T CD4+ se estimularon con CZ recombinante en presencia de células de bazo irradiadas como células presentadoras de antígeno. Una semana después, las células se expandieron en presencia de IL2. Esta programación alterna de la estimulación antigénica y la expansión de IL2 se repitió cada dos semanas. Para generar líneas de células Th1-OVA específica de control negativo, CD4+ se purificaron las células T del bazo de un ratón transgénico. Se añadió IL12 para mejorar aún más

la generación de células Th1-OVA específica. Los resultados obtenidos mostraron que las células T específicas produjeron IFN γ pero no IL4 en respuesta a la CZ, lo que confirma que se trata de células T de la línea Th1. También se comprobó que las células Th1 específicas para CZ inducen NO al co-cultivarlas con macrófagos infectados, resultando en la disminución de la replicación del parásito intracelular. Por otro lado se estudió también cuál era la vía más eficaz de IL12 para inducir las respuestas inmunes. Para esto, se compararon diferentes rutas de administración de la misma: por vía subcutánea e intraperitoneal. Luego se recogieron células de bazo de los ratones inducidos y se estimularon *in vitro* con lisado de parásito, el resultado de esto mostró que por la vía subcutánea se indujeron respuestas de IFN- γ más potentes que por vía intraperitoneal. Para evaluar las respuestas del sistema inmune frente a la inmunización con CZ se inyectó CZ recombinante a un grupo de ratones y otro grupo se mantuvo sin tratamiento. A su vez en ambos grupos, se inocularon *T. cruzi*, y se evaluaron los valores de parasitemia encontrando una considerable disminución de la parasitemia de los ratones inmunizados con CZ. Posteriormente, se inyectaron ambos grupos con una cepa más virulenta de *T. cruzi* evaluando la supervivencia en ambos grupos. Esto mostró una reducción mayor tanto de la parasitemia como de la mortalidad en el grupo inmunizado con CZ que en el grupo control. Todos los ratones no inmunizados murieron dentro del mes de la infección, mientras que el 80% de los ratones inmunizados con CZ sobrevivieron durante más de 10 semanas después de la inoculación. Tampoco se identificaron efectos tóxicos ni alteraciones miocárdicas por el uso de las vacunas con CZ a pesar de que en otros estudios si se la ha relacionado como posible causa de ese tipo de alteraciones. Por otro lado se investigaron los efectos a nivel de las mucosas de los ratones al inyectarles una vacuna recombinante atenuada de *salmonella*-CZ por vía intranasal cuatro veces. Un mes después de la última vacunación, los ratones fueron contaminados por vía oral con tripomastigota metacíclico. Días después de la exposición, se estudiaron los niveles del ADN *T. cruzi* y el contenido de parásitos a nivel del jugo gástrico. El resultado de esto fue una disminución muy significativa de ADN *T. cruzi* y de los parásitos en los ratones vacunados, en comparación con los ratones control. Por lo tanto, esto fortalece la idea de que CZ también puede inducir la protección de la mucosa antígeno-específica contra *T. cruzi*.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A lo largo de este trabajo y a partir de una intensa revisión bibliográfica, se pudo desarrollar un consistente marco teórico y contextualizar el impacto de la Enfermedad de Chagas, tanto a nivel nacional como regional y mundial. En relación a lo anterior podemos concluir que la Tripanosomiasis Americana, si bien en términos de incidencia ha tenido una notable disminución, su expansión geográfica, sobre todo a países de Europa y Norteamérica, consecuencia principal de las corrientes migratorias, también ha sido importante. Este hecho marcó un hito en torno a la puesta en marcha de nuevas investigaciones en relación a las características del parásito y la enfermedad y las posibilidades terapéuticas de la misma, ya que aparejó un estado de alerta de países con un desarrollo económico mayor, situación antes impensable debido a que *T. cruzi* afecta mayoritariamente a poblaciones de bajos recursos en países empobrecidos, lo que justificaba que estuviera caracterizada como una de las enfermedades desatendidas y por consiguiente destinada al olvido. Si bien es claro que ha habido un sustancial avance en lo que respecta al área de la biología molecular, al conocimiento del parásito y su interacción con el hospedero, y que los mecanismos de patogenicidad del mismo se encuentran cada vez más claros, sigue siendo de vital importancia tomar la enfermedad con un doble enfoque sanitario; por un lado continuar y profundizar las políticas de prevención primaria, con estrategias de control y erradicación del vector, siendo la medida que mayor repercusión ha tenido en la disminución de su incidencia, y paralelamente enfocar recursos materiales y humanos para la investigación y el desarrollo de estrategias profilácticas o terapéuticas. Con la mira puesta en las medidas de vacunación, a partir de lo antes expuesto puede concluirse que *T. cruzi* es un organismo complejo por su alta variabilidad, su capacidad de invadir la mayoría de los tejidos y su persistencia dentro del organismo, siendo indetectable para el sistema inmune durante largos periodos de tiempo y generando a su vez reacciones de tipo autoinmune, capaces de generar daños que incluyen riesgo de vida, lo que pone en evidencia que para encontrar medidas terapéuticas eficaces deben ser consideradas todas las variables mencionadas previamente.

A partir de la revisión realizada, la primer interrogante planteada es qué tipo de vacuna es la más adecuada: profiláctica o terapéutica, es decir, una vacuna que impida contraer la infección o una que evite la progresión de la misma y/o las secuelas crónicas. Con el desarrollo de una vacuna profiláctica se evitaría el desarrollo de manifestaciones clínicas y, a su vez se podría detener la transmisión de la misma. La gran capacidad que presenta el parásito para infectar células y permanecer dentro de ellas, es de los principales obstáculos para el desarrollo de una vacuna profiláctica. La formulación terapéutica sería una estrategia útil para la

disminución de las manifestaciones clínicas, que en compañía de las estrategias de erradicación del vector podría tener un importante impacto a nivel poblacional.

Respecto a los resultados esperados de la vacunación se pueden plantear dos grandes objetivos: por un lado la cura parasitológica, concepto que alude a la eliminación del parásito, y por otro lado la cura clínica, esto incluye la desaparición de síntomas y elementos de remodelación de órganos del hospedador sin la eliminación completa del parásito. Estas alternativas se encuentran relacionadas ampliamente con el enfoque previamente mencionado en relación a las formulaciones profilácticas y terapéuticas. El desarrollo de la cura parasitológica puede ser de mayor utilidad como objetivo de las vacunas profilácticas. Sin embargo, el principal problema de salud pública de la Enfermedad de Chagas son las manifestaciones crónicas de la enfermedad, donde la carga parasitaria circulante es baja, por lo que es necesario el desarrollo de una vacuna que sea capaz de generar una regresión de la enfermedad o el pasaje a un estado asintomático de la enfermedad. La desventaja de la misma, es que los portadores pueden seguir transmitiendo la enfermedad de forma vertical o mediante el vector.

Los vectores virales son una herramienta eficaz para generar estimulación del sistema inmune al simular una infección natural y el uso de adenovirus es una herramienta no despreciable en la perspectiva de formulación futura de una vacuna para la Enfermedad de Chagas. Para la selección del serotipo de adenovirus más adecuado, se debería contar con la prevalencia real de inmunidad del hospedador frente a los mismos que pudiera disminuir la efectividad de la vacuna. Adenovirus 5 ha sido ampliamente utilizado como modelo de vector biológico, por lo que planteamos que sería una nueva línea de trabajo generar estudios como los de Farrow y colaboradores donde los antígenos de *T. cruzi* se integran a la cápside del virus, siendo algo novedoso que permitirá exponer los antígenos fácilmente a los PPRs.

Respecto a los antígenos, la tendencia de estudios apuntan a generar formulaciones que incluyan más de un antígeno. Esto se justifica en el sentido de la gran diversidad de antígenos que posee *T. cruzi* y la capacidad que tiene para infectar múltiples células, por lo que es posible que diferentes proteínas de superficie estén relacionadas con la invasión a diferente tipos de células. Por tanto una formulación con un único antígeno probablemente no sea suficiente para generar una respuesta efectiva contra *T. cruzi*. A su vez, consideramos que estos antígenos deberían ser proteínas de superficie del parásito pertenecientes a las diferentes familias de expansión multigénicas ya que son las más abundantes del parásito. Por otro lado, las vacunas con fines terapéuticos deberían tener efectos inmunomoduladores considerando el gran componente que tiene los efectos del sistema inmune sobre las manifestaciones clínicas crónicas de la enfermedad.

La mayoría de los adyuvantes utilizados hasta el momento en las formulaciones no son viables en humanos, por lo que es necesario continuar el estudio de nuevas propuestas de adyuvantes ya enfocados en la seguridad de los mismos. El HSP70 ha comenzado a utilizarse y creemos que es una buena alternativa que debe continuar siendo desarrollado en el diseño de una formulación.

Es de destacar que las investigaciones realizadas hasta el momento han seguido diversas líneas de trabajo y se han evaluado distintas estrategias de resultados alentadores, si bien ninguna ha logrado avanzar a una siguiente fase de estudio. Parece importante entonces, a partir de todos los resultados ya obtenidos, generar consorcios colaborativos de investigación, para poder diseñar estrategias racionales hacia formulaciones más eficaces hacia una vacuna contra la Enfermedad de Chagas.

Las bases están sentadas y el momento es muy prometedor, mediante el esfuerzo colectivo, 107 años después de que Carlos Chagas en Brasil abriera los conocimientos de la Trypanosomiasis Americana al mundo, esperamos se logre finalmente considerar a este padecimiento historia pasada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ONU. United Nations Millennium Declaration [Internet].ONU. 2000 [citado 14 Junio 2016]. Disponible en: <http://www.un.org/millennium/declaration/ares552e.htm>
2. Ehrenberg J Ault S. Neglected diseases of neglected populations: Thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. BMC Public Health. 2005;5(1).
3. Longo D Bern C. Chagas' Disease. New England Journal of Medicine. 2015;373(5):456-466.
4. Salvatella R. Enfermedad de Chagas. Informe de situación en Uruguay. Rev Med Uruguay. 1993;9:65-66.
5. La Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2016 [citado 14 Junio 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
6. Coura Borges J. Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Tropica. 2010;115(1-2):5-13
7. Moncayo Á. Carlos Chagas: Biographical sketch. Acta Tropica. 2010;115(1-2):1-4
8. Miles M. Control of chagas disease. Report of a WHO expert committee. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1993;87(6):713-714
9. Rosa R, Basmadján Y, González Murguiondo M, González Arias M, Salvatella R. Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la Enfermedad de Chagas en Uruguay. Rev Med Uruguay. 2001;(17):125-132.
10. Atias A. Parasitología Médica. Chile: Mediterráneo; 1990; 251-252
11. Atias A. Parasitología Médica. Chile: Mediterráneo; 1990; 258-262
12. Maguire J. Treatment of Chagas' Disease — Time Is Running Out. New England Journal of Medicine. 2015;373(14):1369-1370.
13. Ministerio de Salud Pública [Internet]. 2016 [citado 14 Junio 2016]. Disponible en: http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/CHAGAS-MSP_%5BModo_de_compatibilidad%5D.pdf
14. WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000 : Brasilia BOrganization W. Control of Chagas disease : second report of the WHO expert committee. Geneva : World Health Organization [Internet]. 2002 [citado 14 Junio 2016];. Diponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/4244>
15. Panamerican Health Organitation [Internet]. 2016 [citado 16 Julio 2016]. Disponible en: <http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/CD50.R17-s.pdf>

16. Revistas.ufg.br [Internet]. Revistas.ufg.br. 2016 [citado 16 Junio 2016]. Disponible en: <https://revistas.ufg.br/iptsp/article/viewFile/14574/9141>
17. David L. Heymann. El Control de las enfermedades transmisibles, 18va. Edición. Organización Panamericana de la Salud; 2005.
18. Salvatella R. Chagas en Uruguay, 1937-2016. Información básica para su prevención, control y atención. Arch Pediatr Urug. 2016;87(1):49-52.
19. Daniels J, Gull K, Wickstead B. Cell Biology of the *Trypanosome* Genome. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS. 2010;74(No. 4):552–569.
20. De Pablos LOSuna A. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. Infection and Immunity. 2012;80(7):2258-2264.
21. Osuna Carrillo de Albornoz A. Análisis global de la familia multigenica MASP (MucinAssociated Surface Proteins) de *Trypanosoma cruzi* [Director]. Granada; 2010.
22. Woodward R, Carden M, Gull K. Molecular characterisation of a novel, repetitive protein of the paraflagellar rod in *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology. 1994;67(1):31-39.
23. Academia Nacional de Medicina[Internet]. 2016 [citado 14 Julio 2016]. Disponible en: http://www.medicinabuenosaires.com/demo/revistas/vol59-99/supl2/v59_s2_7_10.pdf
24. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. PLoSNeglTropDis (2011) 5(2):e953. doi:10.1371/journal.pntd.0000953
25. Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl PD, Isola EL. Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of non-phagocytic cells by the endocytically active GTP ases dynamin, Rab5, and Rab7. Biochem Biophys Res Commun (2002) 291(3):516–21. doi:10.1006/bbrc.2002.6474
26. Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes and Infection. 2010;12(7):511-517.
27. Ramírez T. G, Tapia V, Galdames P. Mecanismos de evasión del sistema del complemento utilizados por *Trypanosoma cruzi*. Avances en Ciencias Veterinarias. 2013;27(2).
28. Miyahira Y. *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8+ T cell immunity — An infection model for developing T cell vaccine. Parasitology International. 2008;57(1):38-48.

29. Miyahira Y, Katae M, Kobayashi S, Takeuchi T, Fukuchi Y, Abe R et al. Critical Contribution of CD28-CD80/CD86 Costimulatory Pathway to Protection from *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and Immunity*. 2003;71(6):3131-3137.
30. Saavedra Hernández D. La molécula CD28 y su función en la activación de células T. *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2013;29(4):359-367.
31. Tarleton R. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Seminars in Immunopathology*. 2015;37(3):233-238.
32. Bonney K, Engman D. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *The American Journal of Pathology*. 2015;185(6):1537-1547.
33. González-Romo FPicazo J. El desarrollo de nuevas vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015;33(8):557-568.
34. Resende Pereira I, Vilar-Pereira G, Marques V, da Silva A, Caetano B, Moreira O et al. A Human Type 5 Adenovirus-Based *Trypanosoma cruzi* Therapeutic Vaccine Re-programs Immune Response and Reverses Chronic Cardiomyopathy. *PLoS Pathog*. 2015;11(1):e1004594.
35. Farrow A, Peng B, Gu L, Krendelchtchikov A, Matthews Q. A Novel Vaccine Approach for Chagas Disease Using Rare Adenovirus Serotype 48 Vectors. *Viruses*. 2016;8(3):78.
36. Morell M, Thomas M, Caballero T, Alonso C, López M. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2006;24(49-50):7046-7055.
37. Planelles L, Thomas M, Alonso C, Lopez M. DNA Immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 Fused to the KMP11 Protein Elicits a Cytotoxic and Humoral Immune Response against the Antigen and Leads to Protection. *Infection and Immunity*. 2001;69(10):6558-6563.
38. Luhrs K, Fouts D, Manning J. Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2003;21(21-22):3058-3069.
39. Planelles L, Thomas M, Alonso C, Lopez M. DNA Immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 Fused to the KMP11 Protein Elicits a Cytotoxic and Humoral Immune Response against the Antigen and Leads to Protection. *Infection and Immunity*. 2001;69(10):6558-6563.
40. Sepulveda P, Hontebeyrie M, Liegeard P, Mascilli A, Norris K. DNA-Based Immunization with *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein Elicits

- Complement Lytic Antibodies and Confers Protection against *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and Immunity*. 2000;68(9):4986-4991.
41. Garg N Tarleton R. Genetic Immunization Elicits Antigen-Specific Protective Immune Responses and Decreases Disease Severity in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and Immunity*. 2002;70(10):5547-5555.
 42. Costa F, Franchin G, Pereira-Chiocola V, Ribeiro M, Schenkman S, Rodrigues M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*. 1998;16(8):768-774.
 43. Thomas M, Garcia-Perez J, Alonso C, Lopez M. Molecular Characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi* : A Cytoskeleton-Associated Protein Regulated at the Translational Level. *DNA and Cell Biology*. 2000;19(1):47-57.
 44. Gonzales A, Thomas M, Martinez-Carretero E, Carmelo E, Lopez M, Valladares B. Molecular and immunological characterization of L14 ribosomal protein from *Leishmania braziliensis*. *Parasitology*. 2004;128(2):139-147.
 45. Basu S, Binder R, Ramalingam T, Srivastava P. CD91 Is a Common Receptor for Heat Shock Proteins gp96, hsp90, hsp70, and Calreticulin. *Immunity*. 2001;14(3):303-313.
 46. Guiñazú N, Pellegrini A, Giordanengo L, Aoki M, Rivarola H, Cano R et al. Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microbes and Infection*. 2004;6(14):1250-1258.
 47. Schnapp A, Eickhoff C, Sizemore D, Curtiss III R, Hoft D. Cruzipain Induces Both Mucosal and Systemic Protection against *Trypanosoma cruzi* in Mice. *Infection and Immunity*. 2002;70(9):5065-5074.
 48. Ann E, Eakin S, Mills III A, Harthn G. The Sequence, Organization, and Expression of the Major Cysteine Protease (Cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1992;267:7411-7420.
 49. S Cazorla, P Becker, Frank: Oral Vaccination with *Salmonella enterica* as a Cruzipain-DNA Delivery System Confers Protective Immunity against *Trypanosoma cruzi*
 50. Zuñiga C, Palau T, Penin P, Gamallo C, Diego J. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine & International Health*. 1997;2(5):482-487.
 51. Basso B, Moretti E, Fretes R. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(4):370-374.

52. De Alencar B, Araújo A, Penido M, Gazzinelli R, Rodrigues M. Cross-priming of long lived protective CD8+ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection: Importance of a TLR9 agonist and CD4+ T cells. *Vaccine*. 2007;25(32):6018-6027.
53. Hoft D, Eickhoff C, Giddings O, Vasconcelos J, Rodrigues M. Trans-Sialidase Recombinant Protein Mixed with CpG Motif-Containing Oligodeoxynucleotide Induces Protective Mucosal and Systemic *Trypanosoma cruzi* Immunity Involving CD8+ CTL and B Cell-Mediated Cross-Priming. *The Journal of Immunology*. 2007;179(10):6889-6900.
54. Giddings OK, Eickhoff CS, Sullivan NL, Hoft DF. Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG Adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun* 2010; 78:1333-8; PMID:20048046; DOI:10.1128/IAI.00278-09.
55. Cazorla S, Frank F, Becker P, Arnaiz M, Mirkin G, Corral R et al. Redirection of the Immune Response to the Functional Catalytic Domain of the Cystein Proteinase Cruzipain Improves Protective Immunity against *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(1):136-144.
56. Eickhoff C, Giddings O, Yoshida N, Hoft D. Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(5):687-691.
57. Miyahira Y, Takashima Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Takeuchi T, Ohyanagi-Hara M et al. Immune Responses against a Single CD8+-T-Cell Epitope Induced by Virus Vector Vaccination Can Successfully Control *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and Immunity*. 2005;73(11):7356-7365.
58. Machado A, Cardoso J, Claser C, Rodrigues M, Gazzinelli R, Bruna-Romero O. Long-Term Protective Immunity Induced Against *Trypanosoma cruzi* Infection After Vaccination with Recombinant Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 and Trans -Sialidase. *Human Gene Therapy*. 2006;0(0):060913044654004.
59. Duan X, Yonemitsu Y, Chou B, Yoshida K, Tanaka S, Hasegawa M et al. Efficient protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection after nasal vaccination with recombinant Sendai virus vector expressing amastigote surface protein-2. *Vaccine*. 2009;27(44):6154-6159.
60. Garg N, Tarleton R. Genetic Immunization Elicits Antigen-Specific Protective Immune Responses and Decreases Disease Severity in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and Immunity*. 2002;70(10):5547-5555.

61. Araujo A, de Alencar B, Vasconcelos J, Hiyane M, Marinho C, Penido M et al. CD8⁺-T-Cell-Dependent Control of *Trypanosoma cruzi* Infection in a Highly Susceptible Mouse Strain after Immunization with Recombinant Proteins Based on Amastigote Surface Protein 2. *Infection and Immunity*. 2005;73(9):6017-6025.9.
62. Chou B, Hiromatsu K, Hisaeda H, Duan X, Imai T, Murata S et al. Genetic immunization based on the ubiquitin-fusion degradation pathway against *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;392(3):277-282.
63. Eickhoff C, Vasconcelos J, Sullivan N, Blazevic A, Bruna-Romero O, Rodrigues M et al. Co-Administration of a Plasmid DNA Encoding IL-15 Improves Long-Term Protection of a Genetic Vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e983.
64. Limon-Flores A, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona J, Ek-Macias L, Sánchez-Burgos G, Ramirez-Sierra M et al. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: Role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Vaccine*. 2010;28(46):7414-7419.
65. Gupta S, Garg N. Prophylactic Efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in Mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e797.
66. Rigato P, de Alencar B, de Vasconcelos J, Dominguez M, Araujo A, Machado A et al. Heterologous Plasmid DNA Prime-Recombinant Human Adenovirus 5 Boost Vaccination Generates a Stable Pool of Protective Long-Lived CD8⁺ T Effector Memory Cells Specific for a Human Parasite, *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 2011;79(5):2120-2130.
67. Dumonteil E, Escobedo-Ortegon J, Reyes-Rodriguez N, Arjona-Torres A, Ramirez-Sierra M. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infection with DNA Vaccines in Mice. *Infection and Immunity*. 2003;72(1):46-53.2.
68. Dumonteil E, Escobedo-Ortegon J, Reyes-Rodriguez N, Arjona-Torres A, Ramirez-Sierra M. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infection with DNA Vaccines in Mice. *Infection and Immunity*. 2003;72(1):46-53.
69. Sanchez-Burgos G, Mezquita-Vega R, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra M, Arjona-Torres A, Ouaisi A et al. Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007;50(3):333-341.
70. Limon-Flores A, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona J, Ek-Macias L, Sánchez-Burgos G, Ramirez-Sierra M et al. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and

therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: Role of CD4+ and CD8+ T cells. Vaccine. 2010;28(46):7414-7419.

71. Vázquez-Chagoyán J, Gupta S, Garg N. Vaccine Development Against *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. Advances in Parasitology. 2011;:121-146.

Bibliografía consultada.

Coura JBorges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Tropica. 2010;115(1-2):5-13.

Rassi A, Rassi A, Marin-Neto J. Chagas disease. The Lancet. 2010;375(9723):1388-1402.

Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1(2):159-218.

WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000 : Brasilia BOrganization W. Control of Chagas disease : second report of the WHO expert committee. Geneva : World Health Organization [Internet]. 2002 [citado 14 Junio 2016];. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/4244>

Daniels J, Gull K, Wickstead B. Cell Biology of the Trypanosome Genome. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS. 2010;74(No. 4):552–569.

Barrias E, de Carvalho T, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. Front Immunol. 2013;4.

De Souza W, de Carvalho T, Barrias E. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. International Journal of Cell Biology. 2010;2010:1-18.

Sibley L Andrews N. Cell Invasion by Un-Palatable Parasites. Traffic. 2000;1(2):100-106.

Alves M Colli W. *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the Host Cell and Intracellular Survival. IUBMB Life. 2007;59(4):274-279.

Luis Miguel de Pablos Análisis global de la familia multigénica MASP (Mucin Associated Surface Proteins) de *Trypanosoma cruzi*. <http://hera.ugr.es/tesisugr/18896650.pdf>

Cunha-Neto E, Teixeira P, Nogueira L, Kalil J. Autoimmunity. Advances in Parasitology. 2011;:129-152.

Teixeira M, Gazzinelli R, Silva J. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology*. 2002;18(6):262-265.

Geiger A, Bossard G, Sereno D, Pissarra J, Lemesre J, Vincendeau P et al. Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. *Front Immunol*. 2016;7.

Machado F, Dutra W, Esper L, Gollob K, Teixeira M, Factor S et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in Immunopathology*. 2012;34(6):753-770.

Kurup STARleton R. Perpetual expression of PAMPs necessary for optimal immune control and clearance of a persistent pathogen. *Nature Communications*. 2013;4.

Tarleton R. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*. 2007;19(4):430-434.

Cazorla S, Frank F, Becker P, Corral R, Guzmán C, Malchiodi E. Prime-boost immunization with cruzipain co-administered with MALP-2 triggers a protective immune response able to decrease parasite burden and tissue injury in an experimental *Trypanosoma cruzi* infection model. *Vaccine*. 2008;26(16):1999-2009.

Eguia A, Thomasa C, Morella M, Marañóna C, Carrilerob B, Segoviab M et al. *Trypanosoma cruzi* paraflagellar rod proteins 2 and 3 contain immunodominant CD8+ T-cell epitopes that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients. *Molecular Immunology*. 2012;52(2012):289–298.

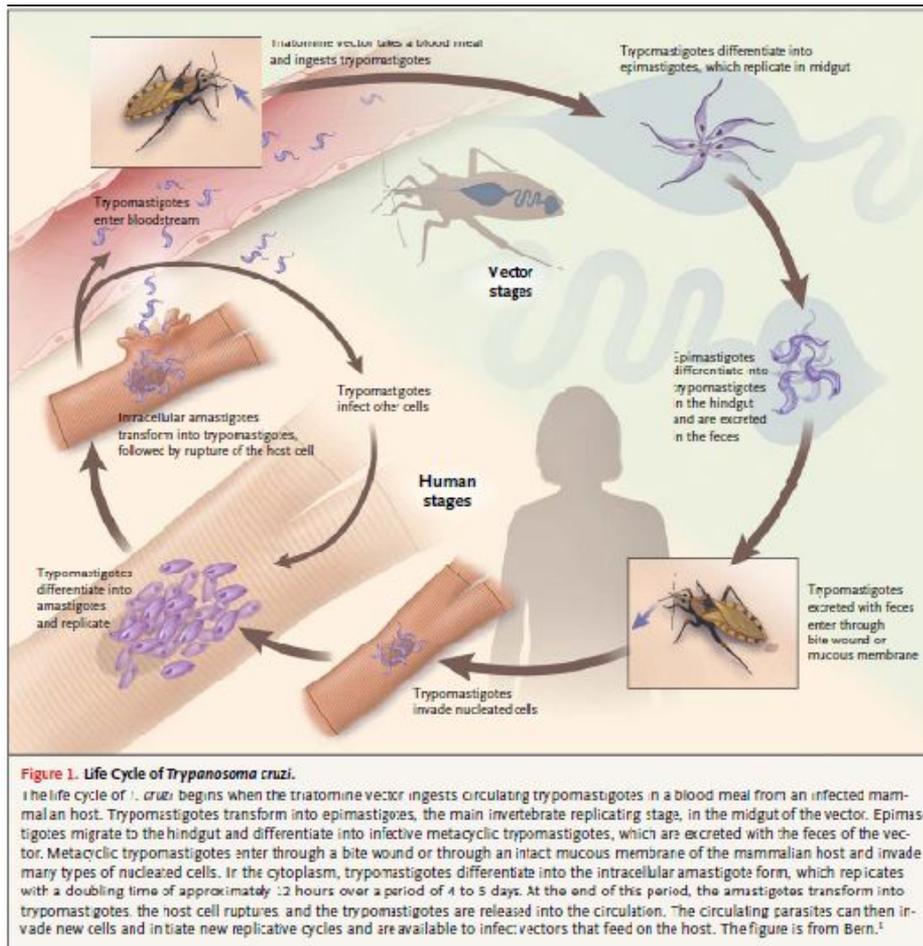
Cazorla S, Frank F, Malchiodi E. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Review of Vaccines*. 2009;8(7):921-935.

AGRADECIMIENTOS

Esta monografía representa el comienzo del cierre de una etapa en nuestras vidas, nuestra carrera universitaria está llegando a su fin, y queremos aprovechar esta oportunidad para agradecer a nuestras familias por todo el apoyo a lo largo de estos años, a los docentes que logran inspirarnos y hacer que esta profesión nos apasiona, a los usuarios de los servicios de salud que permiten que podamos llevar nuestra formación adelante y en esta ocasión especial a nuestro tutor Carlos Robello, por la confianza y guía en este emprendimiento, trabajar contigo ha sido nuestro privilegio.

ANEXOS

Anexo 1: Ciclo biológico de *T. cruzi*



Extraído de: Longo D Bern C. Chagas' Disease. New England Journal of Medicine. 2015;373(5):456-466

Anexo 2: Proteínas de superficie de membrana de *T. cruzi* y receptores de la célula hospedera que participan en los procesos de adhesión e internalización celular.

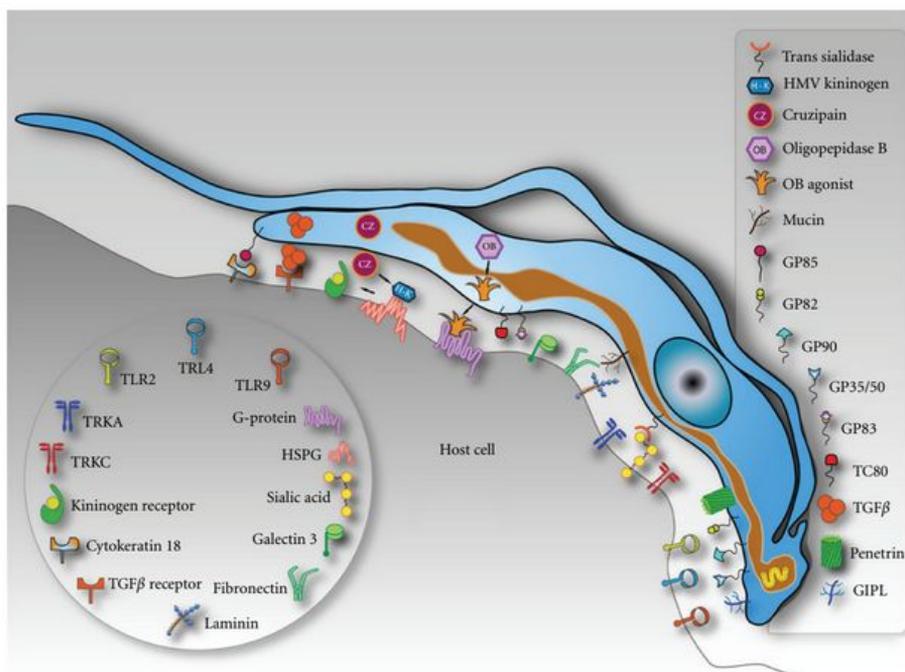


FIGURE 2: Schematic model summarizing the molecules involved on parasite-host cell interaction process and exposed on the surface of a hypothetical host cell and in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*.

Extraído de: De Souza W, de Carvalho T, Barrias E. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. International Journal of Cell Biology. 2010;2010:1-18

Anexo 3: Tabla de revisión

Antígeno	Formulación	Adyuvantes	Modelo	Tipo de Respuesta	Parasitemia/ Carga parasitaria	Histopatología cardíaca/ Alteración en ecg	Sobrevida	Referencia Bibliográfica
Cz	Proteína recombinante (rTS)	Freund	C57BL/6 / BALB/c	Th1/IgG	SD	Sin alteraciones	SD	46
Cz	Proteína recombinante (rTS)	Freund	BALB/c	IgG	SD	Aumento de marcadores (CK y LDH)/ Alterado	SD	46
Cz	Proteína	Freund	C57BL/6	Th1-Th2	SD	SD	SD	48
Cz	Proteína	CpG-oligodeoxynucleotide	C57BL/6	Th1	Baja/ SD	SD	100 %	48
Cz	Proteína recombinante	MALP-2 de <i>M. fermentans</i>	C57BL/6	Th1	SD	SD	60 %	48
Cz	Proteína recombinante	CpG	C57BL/6	Th1	Muy baja/ SD	Sin alteraciones/ SD	SD	48
Plásmido de Cz-ADN	Vector de ADN en base a <i>S. entérica</i>	GM-CSF, CpG-ODN o MALP-2	murino	Th1 en menor medida	SD	SD	SD	49
<i>T. cruzi</i> atenuado	Organismo entero	SD	murino	SD	Disminuidas	SD	SD	50
<i>T. rangeli</i>	Organismo entero	SD	murino	SD	Disminuidas	Sin cambios/SD	Incrementada	51
r-ASP-2	Proteína recombinante	Aluminio o CpG ODN	murino	INF γ	Disminuida/SD	SD	Incrementada	52
rTS	Proteína recombinante	CpG ODN	murino	IgA, IgG y INF γ	SD/Disminuida	SD	Incrementada	53-54
Cz	Proteína recombinante	CpG ODN	murino	Humoral y celular, INF γ y actividad lítica	Disminuida/SD	Disminución de la inflamación en musculo esquelético/SD	SD	55
GP 82	Proteína recombinante	CpG ODN		INF γ	SD	SD	Variable	56
Adenovirus o virus vaccinia que expresa epitopes TSSA CD8	Vector Viral	SD		INF γ	Disminuida/SD	SD	Incrementada	57
Adenovirus que expresan TS y ASP-2	Vector Viral	SD		Anticuerpos y actividad citolítica	Disminuida/SD	SD	Incrementada	58
Virus sendai que expresa ing ASP-2	Vector Viral	SD		INF γ y CD8+	Disminuida/SD	SD	Incrementada	59
TSA-1, ASP-1 ASP-2	ADN	IL-12 y GM-CSF		Anticuerpos y actividad citolítica	Disminuida/SD	Disminución de la inflamación /SD	Incrementada	60
ASP-2 o UB-ASP-2	ADN	SD		INF γ , CD8+, actividad citolítica	Disminuida/SD	SD	Incrementada	61-62
TS	ADN	IL-15		INF γ y CD8+	SD	SD	Incrementada	63
TSA-1 y Tc 24	ADN	SD		SD	Disminuida/SD	Disminución de la inflamación/SD	SD	64
TcVac2+ IL-12+GM-CSF ADN y proteína recombinante boost+ saponina	Heterologous prime- boost	SD		Respuesta humoral y celular, INF γ y CD8	SD/Disminuida	Aumento de alteraciones/ SD	no reportada	65
AND+ adenovirus que expresan TS y ASP-2	Heterologous prime- boost	SD		INF γ , CD8+, actividad citolítica	Disminuida/SD	SD	SD	66
rSA85-1,1	Proteína recombinante	SD		Aumento de niveles de Ac	SD	Sin exacerbación/ SD	SD	67
TSA-1, Tc24 y Tc52	ADN	SD		Aumento de INF γ y CD8	Disminuidas	Disminución de la inflamación /SD	Aumentada	68-70
ASP-2 like clone 9 y TS	ADN	SD		SD	Sin efectos	Sin efectos/ SD	Sin efecto	69
PRF2-HSP-70 y PRF3-HSP70 fusionadas y PRFs solas	Proteínas recombinantes + plásmido (paraflagelar)	HSP70	BALB/c / C57BL/6	Th1 (INF- γ y IL12) y Th2	SD	Menor respuesta inflamatoria con PFR2-HSP70 recombinada en 25% Sin daño cardíaco en 75%	SD	36
Adenovirus 48 + gp83	Vector viral con incorporación de ag en cápside	Sin adyuvante	C57BL/6	CD4, CD8, Ac	SD	SD	SD	35
Adenovirus 48 + ASP-2	Vector viral con incorporación de Ag en cápside	Sin adyuvante	C57BL/6	CD4, CD8, Ac	SD	SD	SD	35
rAdVax	Adenovirus 5 + ASP2 + TS	Sin adyuvante		CD4, CD8, Ac	Disminuidas	Disminuye carga; detiene y retrocede cardiomiopatía/mejora alteraciones del ECG	SD	34
PRF2-PRF3	Plásmido	HSP70/Sin adyuvante	BALB/c / C57BL/6	Th1, Th2, IgG	Disminuida/ SD	Disminuye la inflamación en presencia de adyuvante/ SD	Aumentada en presencia de adyuvante	71

Espacio en blanco y SD: Sin dato