



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

Vacunas de DNA contra parásitos
hemoflagelados: *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania ssp.*

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:
RICARDO HERNANDEZ PANAMA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

AÑO 2005

m. 345063



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Ricardo Hernández
Panamá
FECHA: 03-06-2005
FIRMA: [Firma]

Jurado asignado:

Presidente

Prof. MAGDALENA ACOSTA SEGURA

Vocal

Prof. ABEL GUTIERRES RAMOS

Secretario

Prof. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

1er. Suplente

Prof. MA. GUADALUPE REYES GARCIA

2º. Suplente

Prof. JOSE CORDERO HERNANDEZ

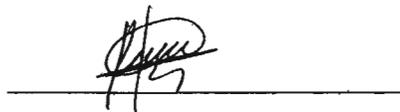
Sitio donde se desarrolló el tema:

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Investigaciones Biomédicas



Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez



Ricardo Hernández Panamá

ÍNDICE

Tema	paginas
I.- Introducción.....	6
I.1.- Importancia de los parásitos hemoflagelados.....	6
I.2.- Objetivo.....	8
I.3.- Criterios rectores para el desarrollo del trabajo.....	8
II.- Antecedentes.....	9
II.1.- Clasificación de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
II.2.- Ciclo de vida.....	11
II.3.- Espectro clínico.....	12
II.4.- Diagnóstico.....	14
II.5.- Inmunidad a <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
II.6.- Antígenos presentes en los parásitos hemoflagelados del género <i>Trypanosoma</i>	17
II.7.- Vacunas contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
II.1.1.- Clasificación de <i>Leishmania ssp</i>	26
II.2.2.- Ciclo de vida.....	27
II.3.3.- Espectro clínico.....	30
II.4.4.- Diagnóstico.....	31
II.5.5.- Inmunidad a <i>Leishmania ssp</i>	32

II.6.6.- Antígenos presentes en los parásitos hemoflagelados del género <i>Leishmania</i>	33
II.7.7.- Vacunas contra <i>Leishmania ssp</i>	37
III.- Importancia de las vacunas de DNA	42
III.1.- ¿Qué son las vacunas de DNA?.....	43
III.2.- Componentes de las vacunas de DNA.....	44
III.3.- Vehículos e inmunoestimuladores que acompañan a las vacunas de DNA.....	45
III.4.- Principios de las vacunas de DNA.....	47
IV.- Vacunas de DNA contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
IV.1.- Vacuna de DNA-genoteca de <i>T. cruzi</i>	50
IV.2.- Vacuna de DNA-KMP11/HSP70.....	51
IV.3.- Vacuna de DNA-trans-sialidasas.....	52
IV.4.- Vacuna terapéutica de DNA.....	55
V.- Vacunas de DNA contra <i>Leishmania ssp</i>	57
V.1.- Vacuna de DNA-subgenoteca de <i>L. amazonensis</i>	57
V.2.- Vacuna de DNA-cisteína proteinasa.....	58
V.3.- Vacuna de DNA-papLe22.....	59
V.4.- Vacuna de DNA-cisteína proteinasa A2.....	60
V.5.- Vacuna de DNA-TSA/LmST11.....	61
V.6.- Vacuna de DNA-META 1.....	62
V.7.- Vacuna de DNA-nucleasa P4.....	63

V.8.- Vacuna terapéutica de DNA.....	64
V.9.- Vacuna de DNA-gp63.....	64
V.10.- Vacuna de DNA-LACK.....	66
VI.- Discusión.....	68
VII.- Conclusiones.....	75
VIII.- Bibliografía.....	76

I. INTRODUCCIÓN

I.1. IMPORTANCIA DE LOS PARÁSITOS HEMOFLAGELADOS

Dentro de los parásitos hemoflagelados que infectan al ser humano se encuentran organismos de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, éstos son causantes de dos parasitosis de gran importancia en América Latina, ya que en los países afectados por ellas son un gran problema de salud pública. Se estima que de 20 a 25 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi* (Brooks et al., 2002), disminuyendo notablemente su esperanza de vida. También la OMS reporta 100, 000 casos anuales de leishmaniasis, siendo la leishmaniasis cutánea la manifestación más común en América (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/microbiologia.html>).

Para el control de estas enfermedades es necesario educar a las personas pertenecientes a comunidades con alto riesgo, sobre las características de cada enfermedad, sus formas de presentación clínicas, empleo de formas de protección, tales como ropa protectora y repelente para moscos y el uso de insecticidas para el control de los vectores, ya que no hay un tratamiento que sea capaz de eliminar completamente estos parásitos del organismo.

El nifurtimox (Bayer 2502) y el benznidasol (Rochagan) son dos fármacos que pueden acortar la fase aguda y reducir, o eliminar la

parasitemia de los pacientes con tripomastigotes de *T. cruzi*, si éstos se utilizan inmediatamente después de la infección, (Brooks et al., 2002). Mientras que para *Leishmania*, los antimoniales pentavalentes son los fármacos de primera elección (Brooks et al., 2002). Además, el fármaco pentamidina (Lomidina), seguido por un ciclo de antimonio, o de INF- γ humano recombinante más antimonio, es útil para el tratamiento de la leishmaniasis visceral resistente al gluconato sódico de antimonio. El pamoato cicloguanilo en aceite (Camolar) y la anfotericina B (Fungizona) se emplean para el tratamiento de la leishmaniasis mucocutánea o nasobucal y la aplicación diaria de ketoconazol (Nizoral) durante 4 a 8 semanas se emplea para la leishmaniasis cutánea (Brooks et al., 2002). En cuanto a la existencia de vacunas, no se cuenta en la actualidad con preparaciones que confieran protección total contra *T. cruzi* y *Leishmania ssp*, ya que algunos de los antígenos presentes en estos parásitos son capaces de inducir una respuesta autoinmune en el hospedero o no inducen una respuesta inmune celular de tipo TH₁, que es necesaria para eliminar parásitos intracelulares. Sin embargo, se han intentado varias formas de inmunización en modelos animales, utilizando vacunas de parásitos vivos o muertos, vacunas atenuadas, vacunas de subunidad, vacunas de vectores vivos o sintéticos, vacunas recombinantes y recientemente las vacunas de DNA que han mostrado ser capaces de inducir una respuesta inmune celular de tipo TH₁ y TH₂

(Dumonteil, 2000), probándose con éxito en diferentes enfermedades ocasionadas por bacterias, virus y protozoarios (Rangarajan, 2002). Estas vacunas además de ser preventivas sirven como tratamiento terapéutico a la infección (Dumonteil, 2000).

I.2. OBJETIVO

El propósito de este trabajo fue realizar una revisión general de las publicaciones que detallan los esfuerzos por producir vacunas, en particular de DNA, contra parásitos hemoflagelados de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, discutir sobre su importancia y mencionar con cuales vacunas se han tenido mejores resultados. Los conocimientos que aquí son referidos podrán servir como base para desarrollar proyectos relacionados con el tema.

I.3. CRITERIOS RECTORES

Los criterios rectores para el desarrollo de esta revisión se enlistan a continuación:

- 1) Describir los antígenos de los parásitos que son utilizados para construir las vacunas de DNA.
- 2) Analizar las vacunas de DNA contra *T. cruzi* y *Leishmania ssp* que actualmente se emplean en modelos animales;

revisando el tipo de respuesta inmune inducida por las vacunas de DNA.

3) Discutir sobre las vacunas de DNA más promisorias para ser utilizadas en la protección contra *T. cruzi* y *Leishmania ssp.*

4) Concluir sobre la utilidad y el futuro del empleo de las vacunas de DNA.

II. ANTECEDENTES

II.1. CLASIFICACIÓN DE *Trypanosoma cruzi*

Reino: PROTISTA

Phyllum: SARCOMASTIGOPHORA

Subphyllum: MASTIGOPHORA

Clase: ZOOMASTIGOPHOREA

Orden: KINETOPLASTIDAE

Familia: TRYPANOSOMATIDAE

Género: *Trypanosoma*.

Especie: *cruzi*.

Este parásito es el causante de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas que únicamente se encuentra en Latinoamérica. Presenta diferentes estadios morfológicos durante su ciclo de vida,

(Figura 1). Es transmitido por insectos hematófagos denominados triatomas, los cuales se encuentran en las viviendas rurales y se alimentan de sangre cuando los individuos se encuentran durmiendo. Este es el mecanismo más común de adquirir el parásito, pero también puede ser contraído por transfusiones sanguíneas, transplantes de órganos y puede atravesar placenta por lo que la transmisión se llevará a cabo de la madre al feto (Guzman-Bracho, 2001).

Varias especies de triatomas son importantes en México entre ellos: *Triatoma barbieri*, *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma dimidiata* (Guzman-Bracho, 2001 y Flores et al., 2001); *Triatoma longipennis* (Flores et al., 2001); *Triatoma phyllusoma* (Flores et al., 2001); *Triatoma picturata* (Flores et al., 2001), (Figura 2).

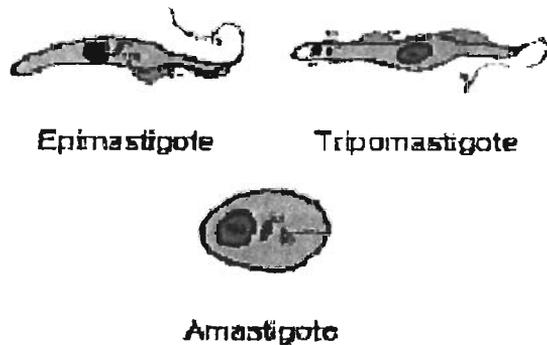


Figura 1. Estadios morfológicos de *T. cruzi*: Tripomastigote, Epimastigote y Amastigote. Tomada y modificada de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/microbiologia.html>



Figura 2. *Triatoma dimidiata* insecto transmisor de *T. cruzi* y complejo oftálmico - ganglionar o signo de Romaña causado por la entrada de *T. cruzi*. Tomada de <http://www.e-morelos.gob.mx/e-salud/e0110120020070.htm> y <http://www.tierra.delfuego.org.ar/funcardio/hiper98.html>

II.2. CICLO DE VIDA

El insecto al picar a un animal infectado adquiere el parásito en el estadio de tripomastigote. En el tracto digestivo del triatoma, se transforman en epimastigotes que se replican por fisión binaria, más adelante en el recto del insecto el parásito adquiere el estadio de tripomastigote metacíclico. La infección de los mamíferos se inicia cuando un insecto infectado se alimenta de la sangre y al mismo tiempo deyecta, liberando tripomastigotes los cuales entran al organismo por el

orificio ocasionado por el piquete del insecto o mucosas, invadiendo rápidamente a varios tipos de células hospederas. Dentro de éstas los tripomastigotes pierden su flagelo y se convierten en amastigotes, en donde se replican por fisión binaria. Éstos se transforman en tripomastigotes procíclicos y se liberan a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo por lisis de la célula hospedera. Los tripomastigotes que fueron liberados tienen la habilidad de infectar macrófagos, células musculares y células cardíacas, ocasionando diferentes manifestaciones clínicas en el hospedero. El ciclo se cierra cuando un triatoma no infectado consume sangre de un mamífero infectado que tiene tripanosomas circulando, (Figura 3).

II.3. ESPECTRO CLÍNICO.

La infección por *T. cruzi* tiene un periodo de incubación de 4 a 10 días, casi siempre sin síntomas, posteriormente puede presentar tres fases (Neva y Brown, 1994).

Fase aguda:

Puede durar de uno a cuatro meses, cuando ocurre en niños puede ser desde asintomática, o por el contrario presentarse sintomatología grave o fatal, que se caracteriza por fiebre variable, malestar general, dolor de cabeza, hepatomegalia, esplenomegalia, cardiomegalia e infarto ganglionar. Cuando la inoculación del parásito es cerca del área ocular se produce inflamación local y edema en los

párpados fenómeno conocido como signo de Romaña, (Figura 2). Si el piquete es en otro sitio, a la inflamación se le conoce como Chagoma.

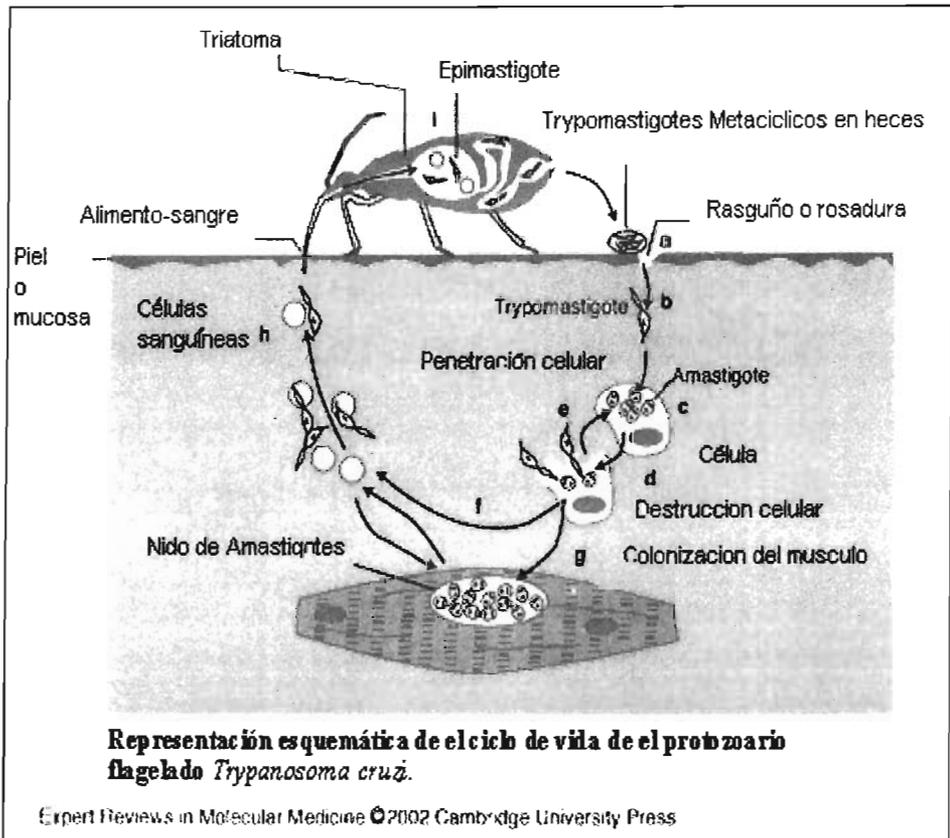


Figura 3. La figura representa el ciclo de vida del protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. a). Tripanosomas metacíclicos están presentes en las heces del insecto. b). Tripomastigote penetra por la herida ocasionada por el piquete del triatoma. c). El tripomastigote entra a la célula hospedera y se trasforma a amastigote. d). Reproducción y lisis en la célula hospedera. e). Amastigote libre pasa a la forma de tripomastigote. f,g). Los tripomastigotes libres colonizan células de tejidos como el muscular o células del sistema inmune como macrófagos. h). el insecto consume sangre con tripomastigotes circulantes.

Fase indeterminada:

En esta fase no hay ningún síntoma de la enfermedad pero las pruebas serológicas son positivas, indicando la presencia de una respuesta inmune contra el parásito.

Fase crónica:

Las manifestaciones aparecen casi siempre en personas de 20 a 50 años de edad, donde se observan órganos agrandados especialmente el corazón, esófago y el colon.

II.4. DIAGNÓSTICO

Durante la fase crónica e indeterminada es de importancia el diagnóstico de laboratorio ya que se puede demostrar la presencia de anticuerpos generados por la infección de *T. cruzi*.

En la fase aguda y crónica se puede realizar el xenodiagnóstico (es un método que permite detectar tripomastigotes, mediante el empleo de los triatomas) que debe ser realizado por personal altamente capacitado.

Las pruebas diagnósticas utilizadas son: examen directo y tinción de extendidos de sangre, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, ELISA indirecta y análisis PCR ([http://www .facmed.unam.mx/deptos/ microbiologia/ microbiologia. html](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/microbiologia.html)). Se deben realizar al menos dos pruebas para dar un diagnóstico confiable.

II.5. INMUNIDAD A *Trypanosoma cruzi*

Durante la infección aguda *in vivo* se presenta una intensa activación policlonal de linfocitos T y B. En donde los linfocitos T muestran una marcada reducción de su reactividad (inmunosupresión) contra antígenos de *T. cruzi* y activadores policlonales *in vitro*, marcando a esto como una estrategia del parásito para evadir la respuesta inmune y persistir en el hospedero (DosReis, 1997).

En el hospedero infectado con *T. cruzi* la respuesta inmune protectora involucra principalmente la producción de anticuerpos específicos y la activación de células fagocíticas. La inmunidad humoral se caracteriza por una respuesta a una gran cantidad de antígenos. Las inmunoglobulinas (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) pueden ser observadas en pacientes chagásicos crónicos con daño cardíaco y se relacionan con una respuesta mixta de linfocitos TH₁ y TH₂. Además, las inmunoglobulinas IgG₂ anti-*T. cruzi* se relacionan con el grado de cardiomegalía, mientras que las inmunoglobulinas A se observan en pacientes con daños digestivos (Hernández-Becerril et al., 2001).

Los macrófagos juegan un papel importante en la inmunidad contra *T. cruzi* ya que son células capaces de presentar antígenos del parásito por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I y II activando células T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente. En donde las células T CD8⁺ destruyen células infectadas por microorganismos

intracelulares y las células T CD4⁺ activan linfocitos B y otros macrófagos.

En la infección aguda la respuesta inmune por células TH₁ es estimulada por la producción de IL-12 e IFN- γ la cual se relaciona con protección. En esta fase la parasitemia es controlada, pero el parásito no es eliminado de los tejidos (DosReis, 1997).

El IFN- γ tiene la capacidad de reducir la infección experimental en ratones y activar macrófagos infectados inhibiendo el desarrollo de los parásitos intracelulares por la producción de metabolitos de óxido nítrico. La IL-12 estimula la secreción de IFN- γ por la células NK que son un elemento en la respuesta inmune innata contra el parásito (DosReis, 1997).

Una respuesta de tipo TH₂ inducida por la IL-4 e IL-10 hace más susceptible a la infección por *T. cruzi*. Estas citocinas son potentes bloqueadores de diversas funciones de los macrófagos (DosReis, 1997).

También se ha descrito un fenómeno de autoinmunidad que daña al mismo hospedero. La autoinmunidad se presenta en la fase crónica de la infección con el parásito, debido a la alteración de la regulación inmune dando como resultado pérdida en la tolerancia a los antígenos propios. Otro origen de esta autoinmunidad podría ser, por la reacción cruzada de los antígenos de *T. cruzi* con determinantes antigénicos de las células del hospedero (Montiel y Díaz, 2002).

La respuesta que tienen los linfocitos T y B contra los epitopes de numerosos antígenos de *T. cruzi*, ha permitido desarrollar vacunas capaces de brindar protección contra la infección.

II.6. ANTÍGENOS PRESENTES EN LOS PARÁSITOS HEMOFLAGELADOS DEL GÉNERO *Trypanosoma*

Una de las estrategias para el diseño de vacunas se centra en el estudio de las moléculas que son abundantes en la superficie de los parásitos y generan respuesta inmune protectora contra la infección (Diez et al., 2004).

En *T. cruzi* se han estudiado moléculas como las trans-sialidasas, los antígenos del tallo flagelar, los antígenos de superficie de los tripomastigotes (TSA), las mucinas, proteínas de 58 kD, el antígeno KMP-11, la cruzipaina y las proteínas de choque térmico (HSP70) entre otros.

Familia de Trans-sialidasas

Las trans-sialidasas (TS) catalizan la transferencia de residuos de ácido siálico entre glicoconjugados. *T. cruzi* utiliza estas enzimas para adquirir el producto maduro de los glicoconjugados presentes en el hospedero y transferirlo a las mucinas que se encuentran en su superficie (Buscaglia, 2002). La familia de genes TS comprende un mínimo de 140 miembros que son clasificados en tres grupos de acuerdo

a la estructura y función de sus proteínas codificadas. Las trans-sialidasas de 85 kD pueden recibir diversos nombres tales como TSA-1, SA85, Tt34, ASP, Tc-85, Tc-13, TS-85, (Frasch, 2000).

Las trans-sialidasas constan de una región catalítica en el extremo terminal amino, un extremo terminal carboxilo y una región antigénica con repeticiones de 12 aminoácidos en tandem, (Figura 4). Este dominio repetitivo es altamente inmunogénico y es llamado SAPA (por Shed Acute-Phase Antigen) y participa en la evasión del sistema inmune evitando que se formen anticuerpos contra la región catalítica. Estas proteínas expresadas por vacunas de DNA, han mostrado conferir protección a modelos animales e inducir una respuesta inmune citotóxica.

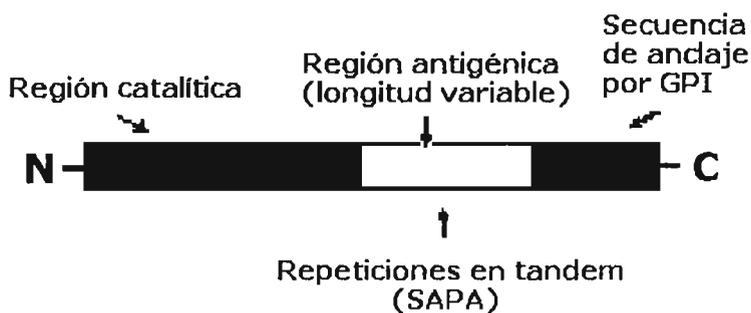


Figura 4. Representación esquemática de el gen que codifica para las trans-sialidasas de *T. cruzi*: N y C, extremos amino y carboxilo terminal respectivamente. Tomado de (Buscaglia, 2002).

Grupo TS Y TS1

Estos antígenos son expresados por tripomastigotes, están unidos a la membrana celular por un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que promueve su secreción al medio extracelular por acción de fosfolipasas específicas. Los miembros de estos dos grupos difieren en el extremo terminal amino. Las TS tienen actividad trans-sialidasa mientras que las TS1 muestran poca actividad debido a una mutación Tyr342-His (Frasch, 2000).

Grupo TS-e

Esta es otra trans-sialidasa de 85 kD que tiene una región catalítica de más o menos 640 aminoácidos. Está presente en la forma parasitaria de epimastigote y tienen actividad de trans-sialidasa (Frasch, 2000).

Familia de proteínas parecidas a las trans-sialidasas (The TS-like)

Estas proteínas se clasifican en tres grupos de acuerdo a la secuencia, peso molecular y otras características. Son proteínas que se encuentran en la superficie como componentes mayoritarios de tripomastigotes y amastigotes. Los antígenos expresados en amastigotes son blancos para una respuesta celular citotóxica (CD8⁺). Mientras los expresados en tripomastigotes inducen una respuesta de anticuerpos y

una respuesta potente de células T CD4⁺ que pueden volverse anérgicas (Frasch, 2000).

Proteína Tc-85

Es una proteína de 85 kD que contiene de 750-850 aminoácidos, algunos miembros de este grupo contienen en el extremo terminal carboxilo repeticiones de aminoácidos. Se encuentran en los estadios de tripomastigotes y amastigotes con la función de adhesión celular. Este antígeno provoca una respuesta inmune celular de linfocitos T citotóxicos y una respuesta de anticuerpos contra el parásito en el hospedero (Frasch, 2000).

Proteína F1/CFA/CRP

Es una proteína de 160 kD que contiene arriba de 1000 aminoácidos, que se encuentra en la superficie de los tripomastigotes y parece limitar la activación de las rutas clásica y alterna del complemento. Desencadena una respuesta inmune humoral en el hospedero (Frasch, 2000).

Mucinas

Son glicoproteínas O-glicosiladas con azúcares anclados a residuos de Ser/Thr. Son moléculas que evitan la respuesta inmune mediante mimetización de componentes del hospedero, inhibiendo la proliferación de linfocitos T, con inducción de respuestas autoinmunes. Un grupo de mucinas de 35 a 50 kD se expresan por las formas

parasitarias epimastigote y tripomastigote en el insecto vector y otro grupo de 80 a 200 kD se expresa en tripomastigotes que derivan de células hospederas.

Las mucinas estimulan la producción de anticuerpos anti- α -galactosil, funcionan como componentes de adhesión a macrófagos y estimulan la producción de óxido nítrico y citocinas (Frasch, 2000 y Freire et al., 2002).

El antígeno HSP70

Es una proteína de choque térmico, que se encuentra en la membrana de *T. cruzi*, es un antígeno dominante en la infección humana, existiendo un alto nivel de anticuerpos contra éste en pacientes chagásicos. Induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos específica de antígeno, en presencia de macrófagos peritoneales a través de la secreción activa de IFN- γ (Montiel y Díaz, 2002). La administración del antígeno HSP70 recombinante y la vacuna de DNA que expresa al mismo antígeno en modelos animales, provocan una respuesta inmune de linfocitos T citotóxicos.

Cruzipaina

Es una enzima tipo cisteína proteinasa de membrana cuya respuesta en el hospedero está implicada en la patogénesis de la enfermedad de Chagas experimental. Es el mayor componente antigénico de *T. cruzi*. Este antígeno provoca esplenomegalia e induce altos niveles

de interleucinas de origen TH₂ como IL-4, IL-10 y niveles bajos de IFN- γ e IL-12 (Montiel y Díaz., 2002).

Proteínas flagelares de 24 kDa dependientes de Ca²⁺

Estas proteínas son muy conservadas (97% de similitud) entre cepas de *T. cruzi* o con otros cinetoplástitos y están relacionadas con la motilidad del flagelo y con el almacenamiento del Ca²⁺ (Maldonado et al., 1997).

Antígeno KMP-11

La proteína KMP-11 es una proteína altamente conservada en la mayoría de los cinetoplástitos, incluyendo leishmanias y tripanosomas. Se localiza a lo largo y en la base del flagelo de los parásitos. Está implicada en la movilidad de los parásitos y en la adhesión celular al hospedero. La proteína KMP-11 tiene cuatro papeles inmunológicos establecidos: Inmunomodulador de células B, inductor de linfoproliferación, inductor de respuesta citotóxica e inmunoprotector en modelos animales (Marañón et al., 2001 y Diez et al., 2004). La administración en ratones con una vacuna de DNA que expresa a la proteína KMP-11, induce una respuesta inmune humoral y una respuesta inmune celular citotóxica.

II.7.- VACUNAS CONTRA *Trypanosoma cruzi*

Vacuna de proteínas del tallo flagelar

El antígeno flagelar de *T. cruzi* se administró a ratones utilizando diferentes adyuvantes como el de Freund (emulsión que contiene aceite mineral y lanolina), aluminio (sales de aluminio, con iones monovalentes de NH_4^+ , Na^+ y K^+), Ribí-700 (monofosforil lipido A, más trehalosa dimycolate), QS-21 (extracto de *Quillaja saponaria*) e IL-12. Se encontró que la administración subcutánea del antígeno flagelar con los adyuvantes de Freund y Aluminio redujeron la parasitemia aproximadamente 70% y 49% respectivamente, en los ratones que fueron desafiados con 10^3 tripomastigotes de la cepa Perú. Además se encontró una mayor producción de IgG_1 , $\text{IFN-}\gamma$ e IL-2 respecto a las demás formas de administración, sugiriendo una respuesta inmune celular de tipo TH_1 como principal mecanismo de protección (Miller et al., 1996). En un estudio posterior, la administración de la proteína flagelar fue acompañada con aluminio o IL-12 recombinante o IL-12 expresada en un adenovirus. Estas preparaciones también mostraron conferir protección contra el desafío a la infección con 10^2 tripomastigotes de la cepa Perú, observándose reducción de más de 90% de la parasitemia en los ratones. Denuovo, la protección en los ratones estuvo relacionada con la inducción de una respuesta inmune celular de tipo TH_1 (Wrightsmán et al., 2000).

Vacuna con cruzipaina

El antígeno cruzipaina recombinante mostró ser un fuerte inductor de la respuesta inmune celular en ratones. La vacuna fue administrada 3 veces por vía subcutánea a ratones, con intervalos de 2 semanas de separación. La primera y la segunda dosis fueron administradas con IL-12 y la tercera dosis con antígeno solo. Seis semanas después de la tercera inmunización, los ratones fueron desafiados con 5, 000 a 20, 000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén, por vía subcutánea. Quince días después de la última inmunización se midió la parasitemia, observándose que en el grupo de ratones inmunizados con cruzipaina, ésta fue significativamente más baja comparada con los grupos no vacunados (más del 90%). La vacuna estimuló una respuesta de células T, con liberación de grandes cantidades de IFN- γ que *in vitro* redujo la parasitemia en macrófagos infectados, a través de la estimulación de la producción de NO. Por lo tanto, la vacuna induce tanto *in vitro* como *in vivo* una respuesta inmune celular de tipo TH₁ (Schnapp et al., 2002).

Cruzipaina expresada en *Salmonella typhimurium* X⁴⁵⁵⁰

Esta vacuna de vector vivo es capaz de expresar el gen que codifica para la proteína cruzipaina en el plásmido recombinante pYA3341. La bacteria atenuada se administró a los ratones por vía intranasal en dosis de 2×10^6 UFC/10 μ l de PBS y 2×10^7 UFC como refuerzo. La segunda vacunación se realizó 4 semanas después de la

primera y el refuerzo se dio tres veces con intervalo de 2 semanas. Un mes después de la última administración los ratones fueron desafiados oralmente con 2,000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén y 14 días después se analizó la presencia de DNA de *T. cruzi* en las mucosas gástricas con la técnica de PCR. Se encontró que la parasitemia era significativamente más baja comparada con el control (más del 90%). Deduciendo que la vacuna confiere protección en las mucosas gástricas de los ratones y es capaz de proteger contra el desafío de tripomastigotes administrados por vía subcutánea, indicando una respuesta inmune celular (Schnapp et al., 2002).

Vacuna de KMP-11 fusionada a HSP70

Las proteínas recombinates KMP-11 y HSP70 se administraron a ratones de la siguiente forma: un grupo con KMP-11 (20 µg) y otro grupo con KMP-11 fusionada a HSP70 (20 µg). La administración se hizo por las vías intraperitoneal y subcutánea, dos veces con un intervalo de 21 días. Tres semanas después de la última administración se obtuvieron células de bazo para realizar pruebas de citotoxicidad. Únicamente las células de los ratones inmunizados con las proteínas fusionadas reconocieron líneas celulares que presentan los epitopes de la proteína KMP-11, obteniéndose mayor lisis. Lo que indica que la fusión KMP-11/HSP70 induce una respuesta celular citotóxica (Marañón et al., 2001).

Otras vacunas reportadas

Taibi et al en 1993, estudiaron la capacidad inmunoprotectora de el antígeno excretor-secretor de tripomastigotes (ESA o Tc24) utilizando modelos animales como ratones BALB/c y ratas Fischer. Ellos encontraron que el antígeno ESA de *T. cruzi* tiene la capacidad de conferir protección ya que se observó reducción de la parasitemia en los animales durante la infección aguda. Por otra parte, Wrightsman et al., 1994, encontraron que la porción amino terminal de la proteína TSA-1 (antígeno de superficie de tripomastigotes perteneciente a la familia de las trans-sialidasa) estimula una respuesta inmune protectora en ratones

II.1.1. CLASIFICACIÓN DE *Leishmania ssp*

Reino: PROTISTA

Phyllum: SARCOMASTIGOPHORA

Subphyllum: MASTIGOPHORA

Clase: ZOOMASTIGOPHORA

Orden: KINETOPLASTIDAE

Familia: TRYPANOSOMATIDAE

Género: *Leishmania*

Especie: *aethiopica*, *amazonensis*, *aristidesi*, *braziliensis*, *colombiensis*, *deanes*, *donovani*, *enrietti*, *equatoriensis*, *forattinii*, *garnhami*, *guyanensis*,

aertigi, lainsoni, major, mexicana, naiffi, panamensis, peruviana, pifanoi, shawi, tropica, venezuelensis.

Leishmaniasis es el nombre que se le da a un gran número de síndromes clínicos como son: leishmaniasis cutánea (úlceras orientales, furúnculo de Bagdad, úlcera cutánea húmeda, úlcera cutánea seca, úlcera del chiclero, piquete de la mala mosca, uta), leishmaniasis visceral (Kala-azar) y la leishmaniasis mucocutánea o naso-bucal (espundia). Todos ellos ocasionados por parásitos hemoflagelados del género *Leishmania*, en donde las especies más importantes en el país son: *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani* (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/microbiologia.html>).

La transmisión de este parásito se lleva a cabo por el piquete de dípteros del género *Lutzomyia* como primera causa, pero también se puede adquirir por transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, material infectado y como puede atravesar placenta, la transmisión se llevará a cabo de la madre al feto. Este parásito cuenta solamente con dos estadios morfológicos en su ciclo de vida, (Figura 5).

II.2.2. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de este parásito se lleva a cabo en dos etapas, una en el insecto y la otra en el humano. La mosca hembra se alimenta de sangre transmitiendo con esta acción promastigotes, los cuales son

fagocitados pasando al estadio de amastigote dentro de las células fagocíticas, como los macrófagos. Ahí se multiplican y provocan la lisis de las células hospederas. Cuando el insecto succiona sangre que contiene fagocitos infectados con amastigotes, éstos son digeridos y los amastigotes se liberan pasando al estadio de promastigote en el intestino medio del díptero en donde se dividen por fisión binaria, después los promastigotes migran hacia la probóscide de la mosca. El ciclo se cierra cuando el mosco infectado se alimenta de sangre de algún mamífero, (Figura 6).



Promastigote



Amastigote

Figura 5. Muestra los estadios morfológicos de *Leishmania ssp*: Promastigote y Amastigote. Tomada de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/microbiologia.html>

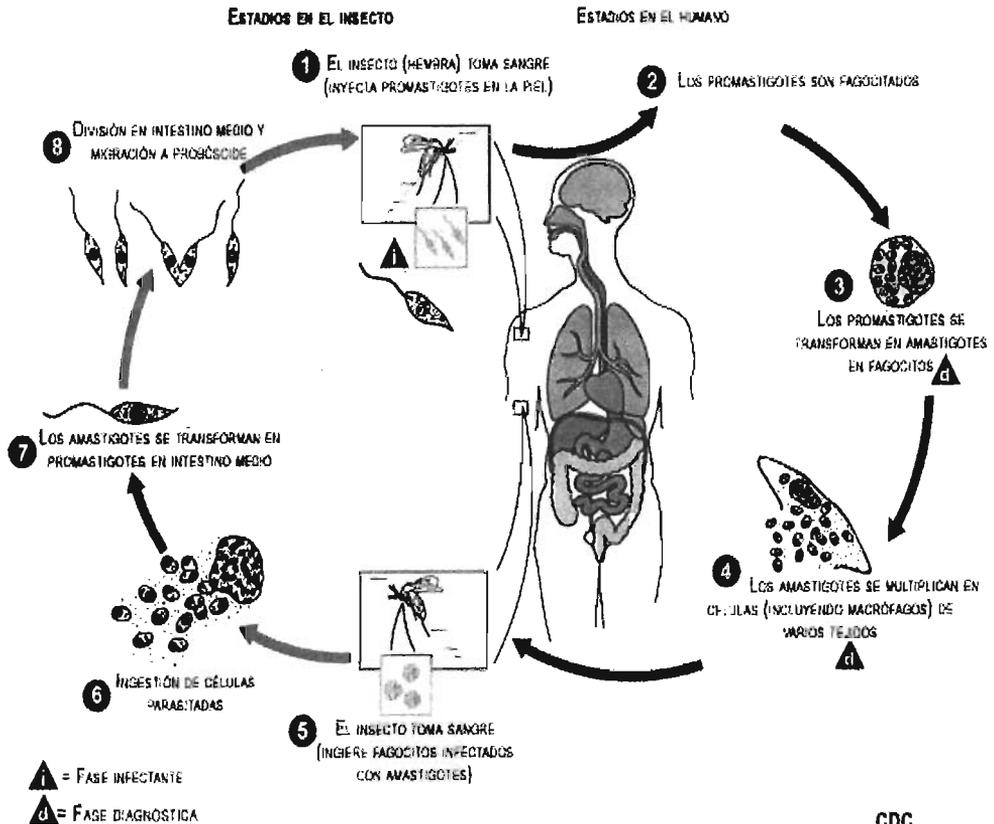


Figura 6. La figura representa el ciclo de vida del protozoo hemoflagelado *Leishmania ssp.* Que cuenta con una fase infectante **i** y con una fase intracelular **d**. 1). El insecto hembra toma sangre y simultáneamente inyecta promastigotes en la piel. 2). Los promastigotes son fagocitados por macrófagos. 3). Los promastigotes se transforman en amastigotes en el citoplasma de las células infectadas. 4). Los amastigotes se multiplican en el citoplasma de las células de varios tejidos incluyendo macrófagos. 5). El insecto toma sangre e ingiere células fagocíticas. 6). Se lleva a cabo la ingestión de las células infectadas en el insecto liberando a los amastigotes en su interior. 7). Los amastigotes se transforman en promastigotes en el intestino medio de la mosca. 8). Los promastigotes se dividen por fisión binaria en el intestino medio del insecto y después migran a la probóscide. Imagen tomada de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/microbiologia.html>

II.3.3. ESPECTRO CLÍNICO

Leishmaniasis visceral o Kala-azar.

El tiempo de incubación es de semanas, meses o años. El agente causal es *Leishmania donovani*. Entre los síntomas en niños se encuentran, fiebre, palidez, anorexia y a la exploración se observa hepatomegalia y esplenomegalia. Esta forma clínica puede llegar a ser mortal.

Leishmaniasis mucocutánea o espundia

Este síndrome es causado por *L. braziliensis*. Las úlceras provocadas se observan en mucosa nasal y orofaríngea. Los individuos que sufren de este tipo de infección quedan desfigurados ya que las úlceras son muy destructivas.

Leishmaniasis cutánea

Su tiempo de incubación varía de una o varias semanas aunque puede ser más prolongado. Los agentes causales son *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania panamensis*. Es endémica de Latinoamérica y en México se encuentra en el sureste del país. Las lesiones ocasionadas por estos tipos de parásitos son muy destructivas y discapacitantes. En México es frecuente que las orejas estén afectadas (úlceras de los chicleros). Este tipo de lesión se da por una infección que ataca al cartílago de la oreja, sin presentar ulceración y que contiene pocos parásitos, (Figura 7).

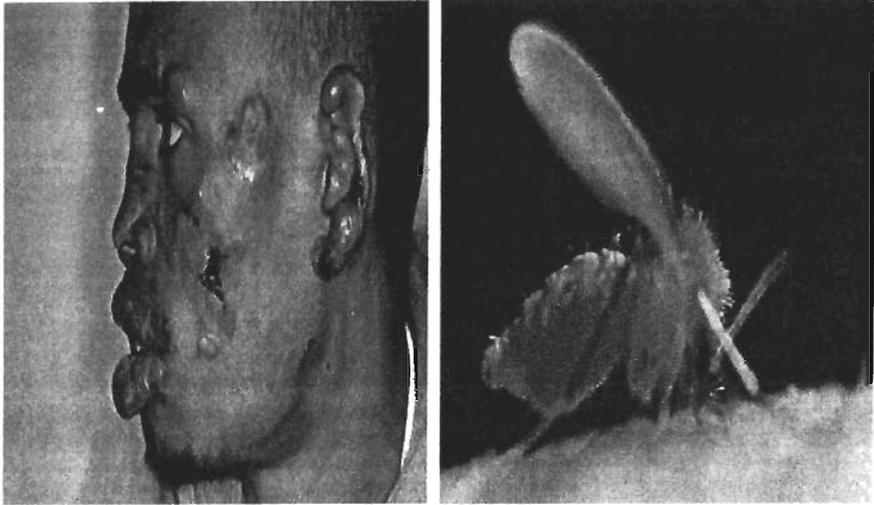


Figura 7. Úlcera del chiclero con leishmaniasis cutánea difusa y *Lutzomia* ssp, vector de *L. mexicana*. Tomada de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/microbiologia.html>

II.4.4. DIAGNÓSTICO

En las formas cutáneas el diagnóstico se puede hacer obteniendo el aspirado ganglionar o el raspado y biopsia del borde de la lesión, en donde se podrá observar macrófagos con abundantes amastigotes en su interior. Las muestras de sangre, punción de bazo e hígado y la punción de médula ósea se utilizan para la leishmaniasis visceral, en donde se observará la presencia de amastigotes. Las pruebas de ELISA y la aglutinación directa son positivas en etapas tempranas de la enfermedad. La prueba de Montenegro que es un método indirecto (inmuno-dermo-reacción), será positivo después de 30 a 90 días de haber adquirido la

infección y se mantendrá así indefinidamente (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micrbiologia.html>).

II.5.5. INMUNIDAD A *Leishmania ssp*

La resistencia del hospedero al parásito está asociada con el desarrollo de una respuesta inmunológica celular específica CD4⁺- TH₁ (Macías et al., 1999). Esto se observó en experimentos con ratones resistentes a la infección con diferentes especies de *Leishmania* en donde mostraron una expansión preferencial de células T-TH₁ liberando IFN- γ como un potente activador de macrófagos, mientras en ratones susceptibles a la infección se observó expansión de células T-TH₂ produciendo inactivación de macrófagos por la liberación de IL-4 e IL-10 (<http://www.biomedicina.org.ve/publicaciones/Leishma.html>).

La interleucina 12 (IL-12), la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor activador quimiotáctico de granulocitos (MCAF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), son otras citocinas importantes ya que mejoran la actividad de los macrófagos (Alexander et al., 1999).

En un estudio de pacientes con leishmaniasis cutánea atípica (LCA), se observaron valores normales de células CD3⁺ y CD4⁺ con un aumento significativo de células CD8⁺ respecto a los controles. Y en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) se encontró una

disminución de los linfocitos T CD4⁺ y los CD8⁺ se observaron normales, esto se debe a una inmunosupresión de linfocitos TH (Macías et al., 1999). Este comportamiento de la respuesta inmune celular se relacionó con las manifestaciones clínicas de cada una de las enfermedades. El estado de anergia de los linfocitos T se podría explicar en base a una o varias de las siguientes razones: presentación inadecuada de antígenos, defectos en las células presentadoras de antígenos, defectos en las células T y a la inducción de IL-10 y ó IL-4 (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/microbiologia.html>).

La recuperación de una leishmaniasis cutánea confiere inmunidad permanente, aunque por lo general es específica de especie. La resistencia natural a la infección varía según la persona, sexo y edad (Brooks et al., 2002).

II.6.6. ANTÍGENOS PRESENTES EN LOS PARÁSITOS HEMOFLAGELADOS DEL GÉNERO *Leishmania*.

Proteínas de choque térmico (HSPs)

La proteína de choque térmico de 70 kD (HSP70) es una proteína genéticamente conservada, está presente en células procarióticas y eucarióticas, provoca una respuesta inmune celular y humoral altamente específica y no hay producción de autoanticuerpos durante la infección. Otras proteínas pertenecientes a la familia HSP (de 83 a 90 kD) son

inmunodominantes, encontrándose anticuerpos en el suero de pacientes con leishmaniasis (Requena et al., 2000).

Proteína LmST11

Esta proteína es codificada por *Leishmania major* y muestra sitios parecidos a las proteínas inducibles por estrés (HSPs). Induce una respuesta humoral en pacientes con leishmaniasis (Requena et al., 2000). Además, las preparaciones de vacunas con esta proteína, han mostrado conferir protección a ratones y monos *rhesus* contra el desafío de *L. major*.

Proteínas ribosomales

La subunidad grande del ribosoma está compuesta de varias copias de proteínas P. Éstas forman un complejo que se encarga de sintetizar y elongar a las proteínas de un organismo. Las proteínas LiP2a, LiP2b y LiP0 inducen la formación de anticuerpos en pacientes con leishmaniasis (Requena et al., 2000).

Histonas

Son proteínas genéticamente conservadas, formando complejos con el DNA en el núcleo y son ricas en los aminoácidos arginina y lisina. Estas moléculas actúan en el enrollamiento del DNA para formar nucleosomas que son complejos de 4 moléculas histónicas, cada una duplicada, constituyendo la unidad básica de la estructura del DNA. Los antígenos de *Leishmania infantum* (LiH2A, LiH3, LiH2B, LiH4) son

reconocidos por los anticuerpos presentes en suero de pacientes con leishmaniasis visceral (Requena et al., 2000).

Antígeno KMP-11

Esta proteína tiene características comunes en la mayoría de los cinetoplastidos tales como, el peso molecular de 11 kD, elevado número de copias (1×10^9 - 2×10^9 moléculas por célula), carácter anfipático y localización en la membrana del parásito, flagelo y bolsillo flagelar. Su estructura secundaria se caracteriza por la presencia de dos α -hélices unidas por un segmento enrollado al azar, además se expresa en todos los estadios del ciclo de vida del parásito, con mayor abundancia en los estadios desarrollados en el insecto. Este antígeno tiene relevancia a nivel inmunológico, ya que es un potente inductor de inmunidad humoral y celular (Diez et al., 2004).

Antígeno GP63

Esta metaloproteasa se encuentra en la superficie de los promastigotes y juega un rol crucial en proteger al parásito de la actividad de los macrófagos y de las enzimas hidrolíticas del hospedero (Alexander et al., 1999). Esta proteína se ha utilizado como parte de la formulación de vacunas de vectores vivos o sintéticos, así como en vacunas de DNA, dando protección a modelos animales contra *Leishmania ssp.*

Antígeno LPG

Los amastigotes expresan en su superficie grandes cantidades de lipofosfoglicano (LPG). Este compuesto facilita la adherencia del parásito al epitelio del intestino del vector. LPG está implicado como una protección del parásito en el hospedero ya que es capaz de inhibir la actividad proteolítica de los macrófagos suprimiendo la producción de óxido nítrico (Alexander et al., 1999).

Antígeno LACK

Este antígeno es una proteína homóloga con los receptores para la activación de cisteína cinasas, contiene un epítopo inmunodominante que representa el blanco de una respuesta inmune temprana, es reconocido por células TH₁ aisladas del bazo de ratones (Requena et al., 2000). Además, las vacunas de DNA que expresan a LACK son capaces de inducir protección a modelos animales contra *Leishmania ssp.*

Otros antígenos presentes

LcPP2C es una proteína con homología a una proteína-fosfatasa serina/treonina 2C y está presente en promastigotes. Provoca una fuerte proliferación de Linfocitos T. El antígeno rK39 relacionado con la superfamilia de proteínas motoras fue tamizado de una biblioteca genómica usando suero de pacientes con *L. donovani* (Requena et al., 2000). La TSA es una proteína antioxidante tiol específica y se considera como un factor de virulencia del parásito, fue identificada por tamizaje en

una biblioteca de expresión de cDNA de *L. major* usando el suero de ratones vacunados con amastigotes (Requena et al., 2000).

II.7.7. VACUNAS CONTRA *Leishmania ssp*

Vacuna de gp63 contenida en liposomas

Esta vacuna consiste en introducir la glicoproteína 63 de los parásitos en liposomas, para aumentar su inmunogenicidad. Para este estudio se utilizaron ratones susceptibles a la infección con *Leishmania mexicana mexicana*, a los cuales se les administró la vacuna por diferentes vías, mostrando que la ruta intraperitoneal es la mejor para inducir resistencia a la enfermedad y correlacionó con el aumento de IgG anti-leishmania. En otro grupo de ratones resistentes a la infección se observó que el grupo vacunado no desarrolló ninguna lesión y se obtuvieron títulos altos de IgG anti *Leishmania* comparados con el grupo control (Lezama-Davila, 1997).

GP63 expresada en *Salmonella typhi* CVD 908 Δ (*aroC::P_{tac}-gp63*)

El plásmido recombinante pIQCGB2 se introdujo a la bacteria atenuada *Salmonella typhi* CVD 908 por electroporación, obteniendo la cepa *Salmonella typhi* CVD 908 Δ (*aroC::P_{tac}-gp63*). Este vector vivo es capaz de expresar el gen que codifica para la glicoproteína 63.

La bacteria *Salmonella typhi* CVD 908 Δ (*aroC::P_{tac}-gp63*) se administró a ratones por vía intraperitoneal u orogástrica con 1×10^8

ufc/ml, dos veces, con dos semanas de separación. Tres semanas más tarde los ratones fueron desafiados con promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana mexicana* administrados subcutáneamente en el cojinete plantar y catorce semanas después se revisaron las lesiones en los ratones, observándose un tamaño menor de la lesión en el grupo vacunado comparado con los grupos administrados con la bacteria no atenuada y PBS (más del 60%). Se concluyó que la cepa de *Salmonella* atenuada confiere protección contra la infección, relacionada con una respuesta celular CD4+ -TH₁ estimulada por la liberación de IL-2 e IFN- γ (González et al., 1998).

Vacuna ISCOMs-GP63

La vacuna ISCOMs-GP63 se basa en la incorporación de la glicoproteína 63 de *Leishmania* en un complejo inmunoestimulador (ISCOMs) que está compuesto de triterpenoides de *Quillaja saponaria*, colesterol y fosfolípidos. La vacuna se administró por vía intraperitoneal a ratones 2 veces con 15 días de separación. Quince días después de la última inmunización los ratones fueron desafiados subcutáneamente con 2×10^9 promastigotes de *L. major*. La vacuna redujo el tamaño de las lesiones en los ratones, aproximadamente un 70% comparada con el control y otras formas de administración del antígeno. Esta vacuna estimuló una fuerte respuesta de proliferación de linfocitos T,

fundamentalmente TH₁, con la liberación de IL-2, IFN- γ e IL-10 (Papadopoulou et al., 1998).

Vacuna de antígenos recombinantes

Los antígenos recombinantes LmSTII y TSA mostraron la capacidad de inducir una respuesta de protección en un modelo de leishmaniasis cutánea humana reproducida en ratones y monos. Estos antígenos se administraron a los ratones de la siguiente manera: cada antígeno por separado, los dos antígenos combinados, cada uno de ellos con IL-12 ó los dos más IL-12. Los antígenos solos o en mezcla indujeron una gran producción de IFN- γ , favoreciendo la respuesta celular de tipo TH₁. Sin embargo, las vacunas que en su composición tenían IL-12 mostraron dar mayor protección contra el reto a la infección con promastigotes de *Leishmania major* respecto al control. Además con la administración de la formulación LmSTII+TSA+IL-12, se observó el tamaño mínimo de las lesiones en los ratones, ocasionadas por la inoculación de amastigotes de *L. major*, respecto a las demás formulaciones (más del 90% de reducción). En los monos *rhesus* se observó que la vacuna LmSTII-TSA-IL-12-aluminio confirió protección al desafío con promastigotes, ya que no se observó desarrollo de lesiones en los monos vacunados (Campos-Neto et al., 2001).

Otras vacunas reportadas

En 1993 McMahon-Pratt y colaboradores, utilizaron una vacuna de virus recombinante (virus GP46/M-2^a-vaccinia), que expresa al antígeno GP46/M-2 que es una glicoproteína de superficie de promastigotes que mostró conferir protección a ratones BALB/c, induciendo una respuesta inmune de células T y B. Esto es el primer reporte en donde se utilizó una vacuna de virus recombinante para inducir una respuesta inmune protectora. Por otra parte, Handman et al., 1995, caracterizaron tres tipos de polipéptidos de *L. major* codificados por genes de la misma familia que GP46/M-2 encontrando que el antígeno de superficie de promastigotes PSA-2 administrado con *Corynebacterium parvum* como adyuvante a ratones BALB/c confirió una protección completa contra el desarrollo de las lesiones. Soong et al; 1995 purificaron tres antígenos específicos de amastigotes de *L. pifanoi* (A2, P4 y P8) con los cuales inmunizaron ratones y encontraron que P4 y P8 (proteínas de membrana de amastigotes) mostraron inducir protección mientras que A2 (cisteína proteinasa A2) no dio protección contra el desafío a la infección con promastigotes de *L. pifanoi*. En otro estudio posterior realizado por Coutinho et al., 1996 se observó que los antígenos P4 y P8 inducen una proliferación de células T y producción de INF- γ , IL-12 y bajos niveles de IL-4. Dos años más tarde McMahon y colaboradores utilizaron los antígenos P4, P8 y P2/A2, dando protección

a modelos murinos contra *L. pifanoi*. También el antígeno de superficie de los promastigotes (PSA-2) mostró producir activación de células T-TH₁, confiriendo protección a ratones inmunizados (Handman, 1997). Finalmente, el antígeno de *Leishmania infantum* (LeIF) mostró dar una protección parcial a ratones BALB/c desafiados con *L. major* (Skeiky et al., 1998).

Vacuna de parásitos muertos

Esta vacuna estaba constituida por promastigotes enteros inactivados con fenol y contenían 3 diferentes cepas de *Leishmania* obtenidas de lesiones de pacientes. La vacuna se administró 2 veces a un grupo de niños empleando como adyuvante BCG (Bacilo de Calmette Guerin, cepa atenuada de *Mycobacterium Bovis*), otro grupo recibió solamente BCG. Después de la segunda vacunación se realizó la prueba de inmuno-dermoreacción cada mes durante dos años y medio con antígenos aislados de tres cepas de *Leishmania*, observándose una disminución progresiva en la induración de los grupos vacunados quienes habían resultado positivos inicialmente a la inmuno-dermoreacción. Esta respuesta está relacionada con la disminución de la protección de la vacuna con el tiempo. Se observó que durante los meses 13 y 18 el nivel de protección es bajo, lo que sugiere la necesidad de refuerzo un año después de la vacunación inicial (Armijos et al., 2003).

III. IMPORTANCIA DE LAS VACUNAS DE DNA

Como se sabe las vacunas son preparaciones biológicas que se obtienen de forma natural o de manera recombinante a partir de microorganismos en forma completa o fracciones. Estas preparaciones son capaces de inducir una respuesta inmune activa en el hospedero proveyendo de protección contra un nuevo desafío.

Los avances en inmunología, bioquímica, genética y biología molecular han proporcionado de muchas herramientas para el desarrollo de vacunas (por ejemplo las vacunas de DNA), aproximándose rápidamente a la obtención de la vacuna ideal cuyas características se enlistan en la, (Tabla1).

Tabla 1. Características de la vacuna "ideal"

	CARACTERÍSTICAS DE LA VACUNA IDEAL
1	Reproducir (mimetizar) una respuesta inmunológica similar a la de la infección natural.
2	Efectiva (mas del 90% de protección).
3	Mínimos efectos secundarios y completamente segura.
4	Inmunidad persistente a largo plazo.
5	Dosis única y compatible con otras vacunas.
6	Administración no invasiva (vía oral preferentemente).
7	Administración precoz en los primeros meses de vida.
8	Estable a temperatura ambiente.
9	Fácil producción y económicamente asequible.

Tomada de Tregnagbi, 2002.

III.1. ¿QUÉ SON LAS VACUNAS DE DNA?

Las vacunas de DNA son moléculas de DNA circular de doble cadena conocidos como plásmidos que contienen genes que codifican para una o varias proteínas de un patógeno (Rangarajan, 2002). Estos genes se insertan a los plásmidos en los sitios de corte de las enzimas de restricción, (Tabla 2) y se unen por la enzima ligasa. La producción de vacunas de DNA se muestra en la (Figura 8).

Tabla 2. Enzimas de restricción

EJEMPLOS DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN		
Enzimas de restricción	Fuente	Secuencias de reconocimiento
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>H</i>	5'-G [^] GATC C-3'
Eco RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13	G [^] AATT C C TTAA [^] G
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG [^] CC CC [^] GG
HindI	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	A [^] AGCT T T TCGA [^] A
NotI	<i>Nocardia otitidiscavarium</i>	GC [^] GGCC GC CG [^] CCGG [^] CG
Sau3A	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	[^] GATC
SstII	<i>Streptomyces stanford</i>	CC GC [^] GG GG [^] GG CC

Tomada de Genética Clínica de J. Jesús Guizar- Vázquez, 2000.

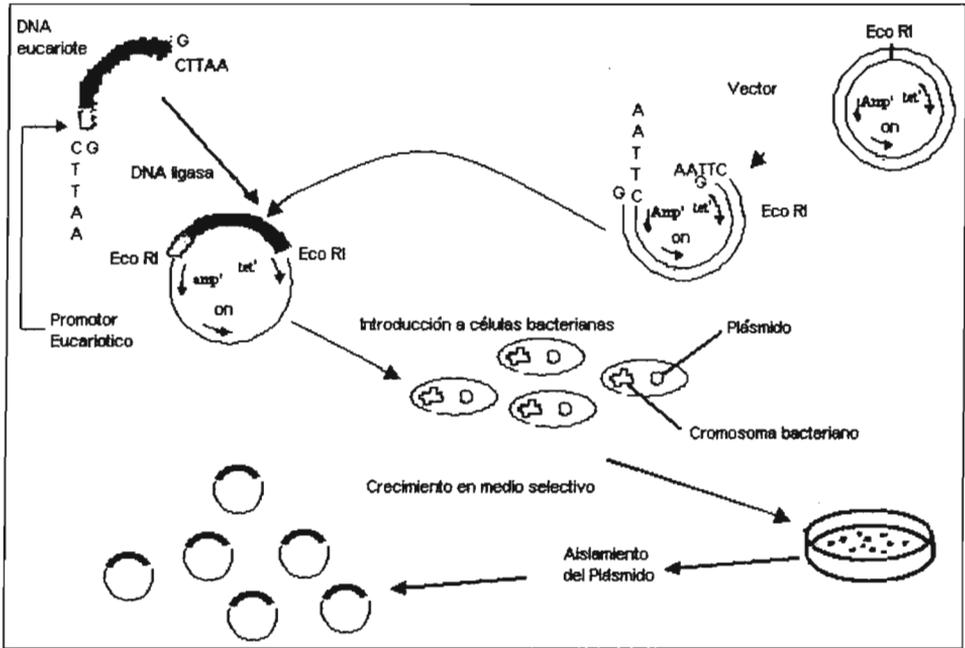


Figura 8. Esquema de la producción de vacunas de DNA. Cualquier secuencia de DNA que se encuentre entre los sitios de restricción puede ser insertado dentro de un plásmido con ayuda de la enzima ligasa. El DNA recombinante se introduce a una célula para su multiplicación y de esta manera se obtienen gran número de copias de plásmidos recombinantes idénticos al parental. Modificada de Genética Clínica de J. Jesús Guizar- Vázquez, 2000.

III.2. COMPONENTES DE LAS VACUNAS DE DNA

Los elementos básicos de una vacuna de DNA son, el promotor eucariótico, el origen de replicación del DNA bacteriano, genes que expresan a las proteínas exógenas y genes de resistencia a antibióticos según el plásmido usado, (Figura 9). Además, constan de un patrón molecular dentro de el plásmido capaz de activar el sistema inmune

(dinucleótidos de citosina-guanina CpG) (Donnelly et al., 2003, Jurado y Herrero, 2001).

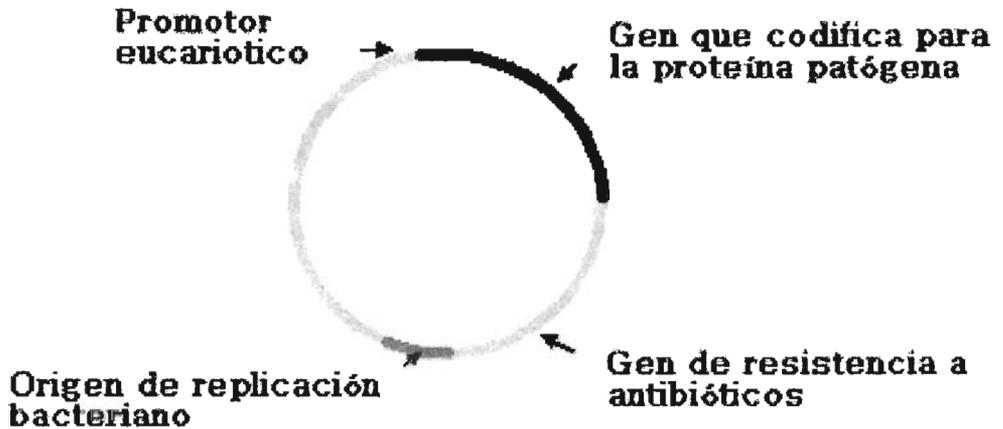


Figura 9. Elementos básicos de una vacuna de DNA como son el promotor eucariótico, el gen de la proteína patógena, origen de replicación bacteriano y genes de resistencia a antibióticos.

III.3. VEHÍCULOS E INMUNOESTIMULADORES QUE ACOMPAÑAN A LAS VACUNAS DE DNA

El vehículo utilizado para la administración del DNA desnudo por lo general es solución salina isotónica, pero también se utilizan soluciones de fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, PBS, oro coloidal (induce una respuesta inmune tanto en modelos animales como en humanos), lípidos cationicos (aumentan la inmunogenicidad y la expresión de los genes de las vacunas de DNA), PVP (la polivinilpirrolidona aumentan la expresión de las vacunas de DNA), entre

otros, (Donnelly et al., 2003). También se utilizan bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas como acarreadores de los vectores plásmidicos (la lisis de las bacterias dentro de las células presentadoras de antígenos, ocasionan la liberación del plásmido en el citosol o fagosoma). El plásmido puede codificar los antígenos dentro de la célula hospedera y presentarlos por medio de MHC I o MHC II, (Dietrich et al., 2001).

Las vacunas de DNA pueden ir acompañadas con proteínas recombinantes o plásmidos con genes que codifican para interleucinas o diversas proteínas (GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12), con la función de aumentar la respuesta inmune del hospedero. Un ejemplo de coadministración de plásmidos se observó con la inoculación de IL-12 e INF- γ codificados en un plásmido junto con genes de VIH (virus de inmunodeficiencia humana) y SIV (virus de inmunodeficiencia de simios), en donde se mostró una modulación positiva de la respuesta inmune celular específica en primates (Kim et al., 2001). Además, de los inmunomoduladores existe un método para aumentar la inmunogenicidad de las vacunas de DNA. Éste consiste en aplicar pulsos eléctricos en la zona de inoculación. Esto fue observado en ratones inmunizados con una vacuna de DNA para la influenza, en donde se observó una respuesta inmune celular y humoral mayor respecto a los animales que no recibieron los pulsos eléctricos (Bachy et al., 2001).

III.4. PRINCIPIOS DE LAS VACUNAS DE DNA

Las vacunas de DNA son capaces de sintetizar las proteínas patógenas dentro de las células hospederas (Macrófagos, células dendríticas y células somáticas) llevándose a cabo la presentación de antígenos por la vía MHC I o MHC II o ambas (cross priming) induciendo una respuesta inmune humoral y celular, por lo que estas vacunas son ideales para combatir microorganismos extracelulares e intracelulares (Jurado y Herrero, 2001 y Rangarajan, 2002), (Figura 10). Se ha reportado que las vacunas de DNA son capaces de conferir protección en modelos animales contra diversas enfermedades como la tuberculosis (Delogu et al., 2000 y Morris et al., 2000), la influenza (Chen et al., 2000), la caries dental (Jia et al., 2004), la tripanosomiasis y la leishmaniasis. Además, estudios clínicos de Fase I mostraron que las vacunas de DNA para el virus del SIDA (Boyer et al., 2000 y Calarota et al., 1998) pueden inducir una respuesta inmune en individuos sanos y pacientes infectados por lo que estos estudios se han extendido para evaluar su eficiencia en voluntarios sanos, con malaria (Le et al., 2000) y hepatitis B (Tacket et al., 1999).

La expresión de la proteína dentro del hospedero puede inducir una respuesta inmune completa y duradera. Con este tipo de vacunación se ha observado que la respuesta humoral es frecuentemente más débil que la que se puede obtener con vacunas recombinantes, sin embargo, la

respuesta celular es más intensa y duradera. Este tipo de respuesta inmune se puede comparar con la respuesta inducida por vacunas atenuadas, pero es muy difícil de inducir con vacunas recombinantes. A lo antes dicho cabe añadir que el desarrollo y la producción de vacunas de DNA es fácil y de bajo costo, además de ser muy estables y seguras, lo que facilitará su almacenamiento y distribución, (tabla 3) (Dumonteil, 2000).

Tabla 3. Propiedades comparativas de las vacunas de DNA, vacunas atenuadas y recombinantes

PROPIEDADES COMPARATIVAS DE LAS VACUNAS DE DNA, VACUNAS ATENUADAS Y RECOMBINANTES				
Tipo de vacuna		Vacuna de DNA	Vacuna atenuada	Proteína recombinante
Respuesta inmune.	Humoral cel.B	++	+++	+++
	Celular T ^{CD4+}	+++ TH ₁	± TH ₁	± TH ₁ / TH ₂
	T ^{CD8+}	++	+++	-
Memoria.	Humoral	+++	+++	+++
	Celular	++	+++	±
Producción.	Desarrollo y producción.	++++	+	++
	Costo.	+++	+	+
	Almacén y transporte.	+++	+	++
Seguridad.		+++	++	++++

Tomada de Dumonteil, 2000.

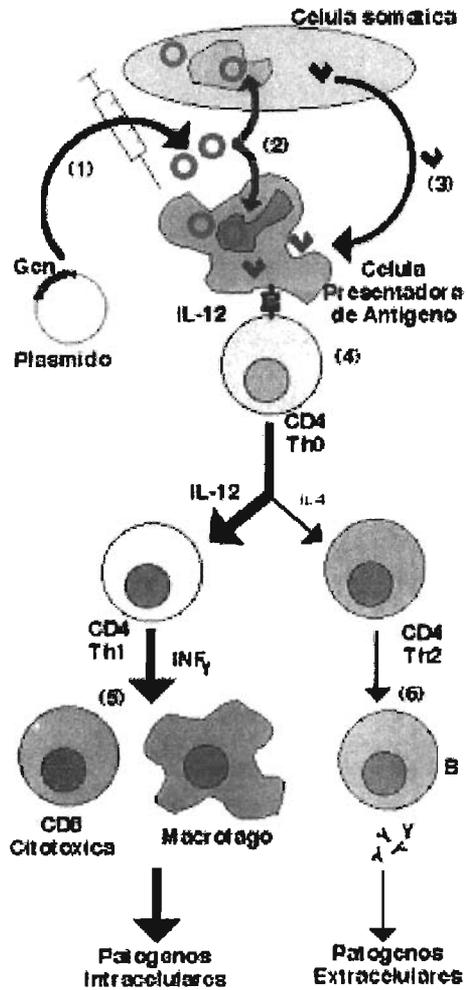


Figura 10. Principios de las vacunas de DNA. Un plásmido con un gen codificando un antígeno se inyecta en el hospedero (1), donde transfecta a células somáticas o presentadoras de antígeno (2). Éstas sintetizan y procesan al antígeno directamente o por cross-priming (3), y lo presentan a células Th₀ que se diferencian preferentemente en Th₁ (4) según las interleucinas (IL) presentes. Las células Th₁ activan a macrófagos y células *T* citotóxicas para la eliminación de patógenos intracelulares, mientras que las células Th₂ activan las células B para la producción de anticuerpos contra patógenos extracelulares. Figura tomada de <http://www.uady.mx/~biomedic/laboratorios/eod.html>

IV. VACUNAS DE DNA CONTRA *Trypanosoma cruzi*

IV.1. Vacuna de DNA-genoteca de *T. cruzi*

Alberti et al., 1999, observaron la respuesta inmune ocasionada por la administración de una biblioteca genómica de *T. cruzi* cepa Y (CT-IOC 106), clonada en el plásmido pcDNA3 que fue administrado a ratones BALB/c encontrando que en los ratones inmunizados con la biblioteca genómica y con antígenos solubles de *T. cruzi* se evidenció la presencia de anticuerpos IgG específicos contra *T. cruzi*. Este mismo grupo en el año 2001, inmunizó a 4 grupos de ratones BALB/c de la siguiente forma: grupo inmunizado con biblioteca genómica, grupo inmunizado con antígenos solubles de *T. cruzi*, grupo inmunizado con el plásmido pcDNA3, grupo no inmunizado. Los ratones recibieron 50 µg de inóculo en 0.1 ml de solución salina al 0.9 % por vía intramuscular en la región anterior de la pata trasera. Se realizaron 2 reinmunizaciones cada 2 semanas con la misma dosis. No se realizaron pruebas para observar la capacidad protectora de la vacuna hacia el desafío con parásitos pero se observó la actividad de los sueros de los animales inmunizados con la biblioteca genómica contra antígenos de *T. cruzi* y no contra los antígenos del plásmido.

IV.2. Vacuna de DNA- KMP11/HSP70

Como se mencionó anteriormente, la proteína de choque térmico HSP70 induce un alto nivel de anticuerpos en pacientes chagásicos. Además, es capaz de inducir una respuesta T CD8⁺ citotóxica específica de antígeno, (Montiel et al., 2002). El antígeno KMP-11 es una proteína genéticamente conservada en la mayoría de los cinetoplástidos, incluyendo *Leishmania* y *Trypanosoma*, esta proteína es capaz de conferir protección en modelos animales, de inducir linfoproliferación de células T con respuesta citotóxica y modular la respuesta de células B (Diez et al., 2004). Marañón et al., 2001 utilizaron la fusión de las proteínas recombinantes, encontrando una respuesta inmune celular de tipo T CD8⁺ citotóxica en ratones inmunizados con las proteínas fusionadas

En otro estudio, Planelles et al., 2001 construyeron una vacuna de DNA utilizando el plásmido pCMV4 y los genes de las proteínas KMP-11 y KMP-11 fusionada a HSP70 de *T. cruzi*. Ellos administraron la vacuna de la siguiente forma: plásmido con el gen de la proteína KMP-11, plásmido con el gen de las proteínas fusionadas y con el plásmido solo, o con solución salina. Los ratones BALB/c y C57BL/6-A2/K^b recibieron por vía intramuscular cuatro dosis de vacunas con tres semanas de separación. Nueve semanas después de la última vacunación, los ratones fueron desafiados con 10³ tripomastigotes de la cepa Y Brasil,

observándose una reducción de más del 90% de la parasitemia en los ratones vacunados con la vacuna pCMV4.11.70 (plásmido con el gen de las proteínas fusionadas) comparada con la vacuna pCMV4.11 y los controles. La vacuna pCMV4.11.70 indujo una respuesta inmune humoral con la producción de títulos altos de anticuerpos del tipo IgG_{2a} (D.O_{492nm} > 0.5) y una respuesta inmune de células T CD8⁺ citotóxicas en los ratones.

IV.3. Vacunas de DNA-trans-sialidasas

Costa et al., 1998, inmunizaron ratones BALB/c con un plásmido que codifica para el dominio catalítico de trans-sialidasas encontrando que dicho plásmido confiere protección contra la infección con *T. cruzi*. En ese mismo año Wizel y colaboradores inmunizaron ratones BALB/c con un plásmido que codifica para el antígeno TSA-1 encontrando inducción de anticuerpos, linfoproliferación de células T y significativa protección contra *T. cruzi*.

Más tarde Katae et al., 2002, utilizaron ratones C57BL/6 (H-2^b), BALB/c (H-2^d) y C3H/HeJ (H-2^k), los cuales fueron inoculados con diversas preparaciones utilizando como vectores el plásmido pCMV (vector usado para los genes de trans-sialidasas TS y el gen DHOD que codifica para la dihidroorotato deshidrogenasa, una de las seis enzimas responsables de la biosíntesis de novo de las pirimidinas en el parásito) y

el plásmido pcDNA3 (vector para el gen de IL-12) como se indica a continuación: plásmido con DHOD, plásmido con TS, plásmido con TS más plásmido con IL-12 ó vector solo. Los ratones fueron inmunizados de dos a cuatro veces, con 10 días de intervalo por vía intramuscular con 100 µg de cada plásmido en 50 µl de PBS. Los ratones se desafiaron con 5, 000 ó 10, 000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén, 10 ó 14 días después de la última inmunización. La inmunización con el plásmido que codifica para la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (pDHOD) no protegió a los ratones C57BL/6 (H-2^b) contra la infección letal de *T. cruzi*, resultados similares se observaron con los ratones BALB/c (H-2^d) y C3H/HeJ (H-2^k). La inmunización con el plásmido que codifica para trans-sialidasas (ptrans-sialidasas) protegió a todos los ratones C57BL/6 (H-2^b) de la infección letal de *T. cruzi*, observándose una disminución del 40% en la parasitemia lo que no se observó en las demás cepas de ratones. En la inmunización de los ratones C57BL/6 (H-2^b) se observó menor parasitemia y mayor supervivencia (100%) con la vacuna ptrans-sialidasas + pcIL-12. Los ratones BALB/c (H-2^d) y C3H/HeJ (H-2^k) no fueron protegidos por ningún tipo de vacunación. La vacuna ptrans-sialidasas + pcIL-12 y la vacuna ptrans-sialidasas mostraron reducir la parasitemia significativamente en los ratones, más aun la vacuna ptrans-sialidasas + pcIL-12 confirió mayor protección ya que aumentó el tiempo de supervivencia de los ratones (100%). Los resultados indican una

utilidad potencial del gen que codifica para IL-12 como adyuvante para inducir una respuesta protectora de células T CD8⁺ mostrando su capacidad citotóxica y secreción de IFN- γ contra *T. cruzi*.

Garg y Tarleton en el año 2002, administraron por vía intramuscular a ratones C57BL/6 los antígenos ASP-1, ASP-2, TSA-1 utilizando como vector al plásmido pCMV1.UBF3/2. Los grupos de ratones fueron inmunizados con los plásmidos para las proteínas solas o mezcla de los tres, además se agregó el plásmido que contenía IL-12 y el plásmido que contenía el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), o la mezcla. Los ratones recibieron 2 inmunizaciones con un intervalo de 6 semanas. Dos semanas después de la última administración, los ratones fueron desafiados con 10⁵ tripomastigotes de la cepa Brasil. Los ratones inmunizados con los diferentes plásmidos mostraron aproximadamente un 90% de reducción de la parasitemia respecto al control. Pero las vacunas que se administraron junto con los plásmidos que codifican para la IL-12 y GM-CSF mostraron dar mayor protección. Los plásmidos que codifican para ASP-1, ASP-2 y TSA-1 mostraron inducir una respuesta inmune de células T CD8⁺, esta respuesta se aumentó significativamente con la administración de los plásmidos pIL-12 y pGM-CSF ya que las citocinas que expresan son moduladoras del sistema inmune.

En otro estudio realizado por Boscardin et al., 2003, inmunizaron ratones BALB/c con DNA plásmidico que contiene un gen de una proteína de superficie de *T. cruzi* por vía intramuscular, administrando el plásmido 3, 5 y 7 semanas después de la primera inmunización. Ellos utilizaron cDNA de amastigotes. Amplificaron 4 genes obteniendo un clon con alto grado de relación con la proteína de superficie de amastigotes, perteneciente a la familia de las trans-sialidasas (ASP-2) y fue denominado clon9. Los ratones se inocularon con plásmidos que codifican para el clon9 y el vector (pcDNA3). Los ratones que recibieron las vacunas de DNA fueron desafiados con tripomastigotes de la cepa Y. En estos ratones se observó una reducción significativa de la parasitemia respecto a los controles (más del 90%). Además, el 100 % de los ratones inmunizados sobrevivieron a la infección y el 90 % de los ratones control murieron. La inmunización de los animales generó anticuerpos específicos (IgG) y secreción de IFN- γ dependiente de células T CD4⁺ contra antígenos de *T. cruzi*.

IV.4. Vacuna terapéutica de DNA

Dumonteil et al., 2004, infectaron experimentalmente ratones BALB/c y ratones CD1 para obtener un modelo experimental de la infección con *T. cruzi*. Los ratones recibieron 5×10^4 tripomastigotes de la cepa H4 y 5×10^2 tripomastigotes de la cepa H1 respectivamente. La

inmunoterapia se realizó en ambos modelos. Los ratones BALB/c fueron inmunizados por vía intramuscular con 100 µg de plásmido que codifica para TSA-1 ó Tc24, 5 días después de la infección. Una semana más tarde se administró la segunda dosis. También los ratones CD1 recibieron 2 dosis del plásmido, pero el tratamiento se inicio 70 días después de la infección. En la fase aguda los ratones BALB/c que recibieron los plásmidos pcDNA3-TSA-1 mostraron bajos niveles de parásitos en el tejido cardíaco y no se detectaron en circulación, además el 70% de los ratones en la fase aguda sobrevivieron a la infección. La inmunoterapia con el plásmido pcDNA3-Tc24 también controló la infección ya que disminuyó la parasitemia en el mismo tejido y la supervivencia de los ratones tratados fue del 100%. En los ratones CD1, modelo de fase crónica, la inmunoterapia con el plásmido pcDNA3-TSA-1 mostró reducir la parasitemia y la inflamación respecto a los ratones que recibieron solución salina o el vector solo. Este grupo de investigadores no muestra el mecanismo por el cual la inmunoterapia con la vacuna de DNA protege, pero sus resultados son consistentes con una reorientación y/o potenciación de la respuesta inmune de una respuesta TH₂ no protectora a una respuesta TH₁ protectora.

V. VACUNAS DE DNA CONTRA *Leishmania ssp*

V.1. Vacuna de DNA-subgenoteca de *L. amazonensis*

Piedrafrita et al., 1999 construyeron una librería de expresión genómica de *L. major* que fue usada para inmunizar ratones BALB/c. Una de las librerías usadas confirió protección a los ratones comparados con el control. En el año 2001 Montalvo y colaboradores construyeron una librería genómica de *L. amazonensis* utilizando el vector pcDNA3 y demostraron la expresión de determinantes antigénicos en el músculo de ratones. En otra investigación posterior Montalvo et al., 2004, construyeron una vacuna de DNA que expresa una subgenoteca de *L. amazonensis* utilizando los vectores (pEF2HisA, pEF2HisB, pEF2HisC). Los ratones BALB/c se inmunizaron de la siguiente forma: grupo inmunizado con la subgenoteca DNA1, grupo inmunizado con la subgenoteca DNA2, grupo inmunizado con el plásmido sin subgenoteca, grupo inmunizado con antígenos solubles de *L. amazonensis* y grupo administrado con solución salina. Se realizaron 2 inmunizaciones por vía intramuscular con dos semanas de diferencia. Quince días después de la última inmunización los animales fueron desafiados con 10^5 promastigotes de *L. amazonensis* por vía subcutánea. Los ratones inmunizados con la subgenoteca DNA1 y el antígeno soluble de *L. amazonensis* mostraron adquirir protección ya que se observó una

reducción del 60% en el tamaño de las lesiones y una reducción del 60% en la carga parasitaria con respecto a los demás grupos. No se determinó el mecanismo inmunológico protector.

V.2. Vacuna de DNA-cisteína proteinasa

Rafati y colaboradores en el año 2000, purificaron una proteína que caracterizaron como una cisteína proteinasa y que fue denominada promastigote cisteína proteinasa (ACP). Este antígeno potenciado con adyuvante completo de Freund (emulsión de aceite mineral, lanolina y bacilos tuberculosos muertos), mostró dar una protección del 60% aproximadamente a los ratones BALB/c contra *L. major*, con una producción alta de INF- γ y una respuesta inmune celular de tipo TH1. Un año más tarde el mismo grupo Rafati et al., 2001, vacunaron en el muslo a ratones BALB/c con 100 μ g de los plásmidos que codifican para la cisteína proteinasa a (Cpa), para la cisteína proteinasa b (Cpb), de manera individual o mezclados. Estos ratones recibieron un mes más tarde la misma dosis de DNA como refuerzo. Otro grupo de ratones recibieron la mezcla de plásmidos más un refuerzo con las cisteína proteinasas a y b recombinantes. Los ratones que fueron inmunizados con la mezcla de los dos plásmidos, así como también los ratones que recibieron el refuerzo con las proteínas recombinantes mostraron tener menor tamaño en las lesiones ocasionadas por la infección con *L. major*

respecto a las demás preparaciones (aproximadamente 47% del control). Los ratones que recibieron la mezcla de los plásmidos que codifican para Cpa y Cpb (pCB6-Cpa + pCB6-Cpb) más un refuerzo con las proteínas recombinantes (Cpa y Cpb) o más un refuerzo con DNA, indujeron una respuesta inmune protectora específica de células TH₁ con la producción de niveles altos de IgG_{2a} e INF- γ .

V.3. Vacuna de DNA-papLe22

En el año 2000 Suffia y colaboradores, clonaron y caracterizaron al antígeno papLe22 de 22 kD y encontraron IgM e IgG específicos para papLe22 en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral indicando una respuesta primaria contra esta proteína. Además, la presencia de IgG₁ e IgG₃ sugiere una mezcla en la respuesta de tipo TH₁ y TH₂. En una investigación posterior realizada por Fragaki y colaboradores en el año 2001, se aplicaron vacunas por vía intramuscular a hamsters, se utilizaron 50 μ g de plásmidos que codifican para la proteína altamente inmunogénica de *Leishmania infantum* (papLe22). Se utilizaron como controles el vector solo o PBS. Cuatro semanas más tarde los hamsters fueron desafiados con 10⁷ amastigotes de *L. infantum*. Los hamsters vacunados mostraron una marcada reducción de los parásitos en circulación en un 50% comparado con los animales que recibieron el vector solo o PBS. Además, los hamsters mostraron niveles altos de

anticuerpos contra papaLe22 comparado con los hamsters inyectados con PBS o el vector. La producción de anticuerpos contra antígenos totales de *Leishmania* disminuyeron notablemente lo que indica un cambio de la respuesta de células TH₂ hacia una respuesta de células TH₁.

V.4. Vacuna de DNA-cisteína proteinasa A2

La inmunización con la cisteína proteinasa A2 más el adyuvante *Corynebacterium parvum* no dio protección adecuada contra el desafío a la infección comparándola con los antígenos P4 y P8 los cuales mostraron conferir protección a los ratones BALB/c (Soong et al., 1995). Posteriormente, Ghosh et al., 2001, vacunaron ratones BALB/c con una mezcla de plásmidos que codifican para la cisteína proteinasa A2 y el gen E6 del virus de el papiloma humano (codifica para una proteína inhibidora de la proteína p53). Los ratones fueron inyectados de forma intramuscular con el plásmido que codifica para la cisteína proteinasa A2 solo, o en combinación con el plásmido que codifica para el gen E6. Los animales recibieron dos dosis con tres semanas de intervalo. Tres semanas después de la última inmunización los ratones fueron desafiados con 2×10^8 promastigotes de *Leishmania donovani* por vía intravenosa. Cuatro semanas después del desafío los ratones se sacrificaron y se calculó la LDU (Leishman Donovan Units) en biopsias de hígado. Se

encontró que la vacuna pcDNA3-A2 + pcDNA3-E6 redujo la cantidad de promastigotes en el hígado (más del 80%) con respecto al plásmido pcDNA3-A2. La vacuna mostró inducir una mayor producción de anticuerpos (IgG₁, IgG_{2a}, IgG₃), mayor linfoproliferación de células T y producción de INF- γ .

V.5. Vacuna de DNA-TSA/LmST11

La inmunización de ratones BALB/c con la proteína antioxidante tiol específica (TSA) recombinante, indujo una fuerte respuesta inmune celular dando protección contra *L. major*, usando IL-12 como inmunomodulador. Además, la proteína recombinante estimuló *in vitro* a las células mononucleares de sangre periférica humana de pacientes con leishmaniasis (Webb et al., 1998). Méndez et al., 2001 inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con los plásmidos que codifican para LACK, LmsT11 y TSA. Ellos encontraron que la vacuna que codifica para TSA confirió protección total contra el desarrollo de lesiones dérmicas en los ratones, con una reducción de la parasitemia de más del 90% respecto al control. En otro estudio Campos-Neto et al., 2002 vacunaron ratones BALB/c tres veces con un mes de separación por vía intramuscular, con los plásmidos que contienen los genes que codifican para las proteínas TSA y LmST11 solas o fusionadas, tomando como controles a los ratones inoculados con el vector o solución salina. Treinta

días después de la última inmunización los ratones fueron desafiados con 10^4 amastigotes de *L. major*. Los ratones inmunizados con la mezcla de genes o con el plásmido pcDNA3-TSA mostraron conferir mayor protección que se reflejó en el tamaño de las lesiones (una disminución del 96% aproximadamente del control). Los ratones que recibieron la vacuna pcDNA3/TSA fusión LmST11 desarrollaron una respuesta inmune celular de tipo CD_4^+ TH_1 y CD_8^+ citotóxica así como también una respuesta inmune humoral con la producción de IgG_1 .

V.6. Vacuna de DNA-META 1

La proteína Meta-1 de *Leishmania* inicialmente se identificó en promastigotes de *L. major*. Esta proteína muestra alto grado de conservación, está presente en las vacuolas alrededor del flagelo y está implicada con los procesos de infección (Uliana et al., 1999). En un estudio posterior Cardoso et al., 2002, vacunaron ratones BALB/c con el antígeno recombinante de *Leishmania* y DNA que codifica para el mismo antígeno. Los ratones recibieron por vía intramuscular a la proteína Meta-1 recombinante, los plásmidos que codifican para la proteína Meta-1 (pVX-M1), para la proteína quimiotáctica de miocitos (MCP3) (pVX-MCP3), o la fusión de los dos genes que codifican para las dos proteínas mencionadas (pVX-MCP3-M1). Los ratones recibieron dos refuerzos con dos semanas de intervalo y dos semanas después, los animales fueron

desafiados con 5×10^5 promastigotes. Los ratones inmunizados con la proteína recombinante, el plásmido pVX-M1 y el plásmido pVX-MCP3-M1 no protegieron contra la infección de *L. major* o *L. amazonensis*.

V.7. Vacuna de DNA-nucleasa P4

En el año 2003 *Campbell* y su grupo de investigación inmunizaron ratones BALB/c con 100 μg de DNA divididos en 5 inoculaciones, 4 inyecciones por vía intramuscular y una intradérmica. Los ratones recibieron plásmidos que codifican para la nucleasa P4 sola o junto con plásmidos que codifican para IL-12 ó HSP70. Los ratones se reforzaron 2 veces con tres semanas de intervalo y se inocularon tres semanas después de la última inmunización con 2×10^5 promastigotes. Los datos muestran que los genes P4/IL-12 provocan una potente respuesta inmune contra *L. amazonensis*, pero dan poca protección contra *L. major* (15% aproximadamente del control) y los genes P4/HSP70 únicamente retardan el desarrollo de las lesiones ocasionadas por *L. amazonensis* y dan protección a ratones contra *L. major* de más del 80%. La respuesta inmune protectora comprende una respuesta de linfocitos T de tipo TH₁ con la producción de INF- γ y TNF- α .

V.8. Vacuna terapéutica de DNA

En un estudio realizado por Hadman et al., 2000, inocularon por vía intradérmica 10^5 y 10^3 promastigotes vivos de *L. major* a los ratones C3H/He y BALB/c respectivamente. Una y dos semanas después de la infección, los grupos de ratones se inmunizaron con el antígeno soluble PSA-2, con el plásmido que codifica para PSA-2, el vector solo o PBS. Los ratones C3H/He fueron inmunizados con 50-100 μ g de el plásmido mPSA-2, inyectado en ambos cuádriceps, los ratones BALB/c únicamente recibieron una sola dosis. Todos los ratones inyectados con PBS y con el vector desarrollaron lesiones tres semanas después de la infección y los vacunados presentaron lesiones pequeñas (60% aproximadamente del control y los no vacunados). Se midió la producción de IL-4 e INF- γ en los ratones vacunados y los controles, encontrando mayor cantidad de INF- γ en los ratones vacunados con el plásmido mPSA-2. Este grupo correlacionó sus resultados con un cambio de la respuesta inmune de células T-TH₂ hacia una respuesta inmune protectora de células T-TH₁.

V.9. Vacuna de DNA-gp63

Xu et al., 1995, construyeron una vacuna de vector vivo utilizando a la bacteria *Salmonella typhimurium* (aroA⁻ aroD⁻) cepa BRD509 que expresa el antígeno GP63 de *L. major*. Esta bacteria se administró por

vía oral a ratones BALB/c los cuales mostraron una notable resistencia a la infección de *L. major* respecto a los controles, ya que redujo la parasitemia en más del 90% y el tamaño de las lesiones en un 80%. Esta vacuna demostró que el gen gp63 liberado oralmente puede preferentemente inducir el desarrollo de una respuesta inmune celular de tipo TH₁. Una respuesta inmune similar fue observada por Xu y Liew en ese mismo año, con la vacuna de DNA pCMV/gp63 inyectada de forma intramuscular a los ratones. Otro grupo de investigadores evaluaron la eficacia de diferentes antígenos codificados en plásmidos para encontrar los mejores candidatos. Ellos vacunaron a los ratones con los plásmidos que codifican para los antígenos GP46, GP63, CPb, LACK, de manera individual o mezcla de los plásmidos que codifican para GP46, GP63, CPb. Dos semanas más tarde los ratones recibieron un refuerzo. Quince días después de la última inmunización, los ratones fueron desafiados con 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana* de la cepa Hd18. Todas las vacunas excepto VR1012-LACK redujeron el tamaño de las lesiones más del 80% y la parasitemia en el lugar de la infección (más del 90% del control). Los plásmidos VR1012-GP46, VR1012-GP63 y VR1012-CPb provocaron la producción de IgG₁ e IgG_{2a} sugiriendo una mezcla de células TH₁ y TH₂, así como con el plásmido VR1012-GP46 se encontró en los ratones altos títulos de IgG_{2a} sugiriendo la vía hacia TH₁. Por lo

tanto la mezcla de los tres plásmidos resulto en una mejor protección que los plásmidos individuales (Dumonteil et al., 2003).

V.10. Vacuna de DNA-LACK

Como antecedente al desarrollo de una vacuna de DNA-LACK, Melby et al., 2001 inmunizaron ratones con una versión de el antígeno LACK de 36 kD, observándose una estimulación *in vivo* e *in vitro* de células TH₁ y la producción de INF- γ pero sin conferir protección contra el desafío cutáneo o sistémico de *L. donovani*. Otro grupo de investigadores (Ramiro et al., 2003), trabajaron con perros a los cuales administraron subcutáneamente una vacuna de DNA que codifica para el antígeno LACK (DNA-LACK) seguida de un refuerzo con un vector vírico (virus de la vaccinia) que expresa el mismo antígeno (rVV-LACK). Esta preparación mostró conferir protección a los animales ya que no se encontraron síntomas clínicos en los perros vacunados. Una evaluación más fue hecha por Hadj et al., 2004, en donde se inmunizaron ratones BALB/c por vía intramuscular con los plásmidos que codifican para los antígenos, PSA-2, GP63, una proteína ribosomal, el antígeno de *L. infantum* (LeIF), el antígeno LACK y diferentes regiones del antígeno LACK (1,2,3,4,5,p24). Dos semanas después de la inmunización los ratones fueron desafiados con 5×10^5 amastigotes de *L. major*. Los ratones inmunizados con la vacuna pCMV3ISS-LACKp24 mostraron un

efecto protector respecto a los demás ratones inmunizados con las otras vacunas, ya que redujo el tamaño de las lesiones en los animales infectados (60% aproximadamente del control). Además la secuencia CpG que son ISS (secuencia inmunoestimuladora) contenida en la vacuna tiene la capacidad de conferir mayor protección comparando con el plásmido que no tiene la secuencia. Esta secuencia es capaz de inducir la producción de TNF- α e IL-12. Además, Fonseca et al., 2003 investigaron los efectos de la inmunización oral con antígenos enteros de promastigotes de *Leishmania amazonensis* (LaAg) en modelos murinos. Encontraron niveles altos de INF- γ y IL-10 pero no IL-4, sugiriendo una respuesta inmune celular de tipo TH₁. Con los resultados obtenidos en la inmunización oral, un año más tarde el mismo grupo estudiaron la posibilidad de desarrollar una vacuna de aplicación intranasal utilizando el antígeno de *Leishmania amazonensis* (LaAg), una vacuna de DNA que codifica para el antígeno LACK y el antígeno LACK recombinante. Los ratones fueron inmunizados por vía intranasal, recibiendo siete días después un refuerzo con la misma dosis. Cuatro semanas después de la última inmunización los ratones fueron desafiados con 10⁵ promastigotes de *L. amazonensis*. Los ratones que recibieron las vacunas LaAg y DNA-LACK mostraron un tamaño menor en las lesiones (70% aproximadamente del control), una reducción de la parasitemia respecto al control del 85% y una respuesta TH₁ específica *in vivo*.

VI. DISCUSIÓN

Los datos analizados muestran que la protección conferida por las vacunas de DNA contra los parásitos hemoflagelados de los géneros *Leishmania* y *Tripanosoma* es variable pero importante. También sugieren que para el desarrollo de una vacuna efectiva, se utilice la combinación de diferentes antígenos codificados en plásmidos. Lo óptimo sería crear una vacuna que dé una protección contra todas las especies de *Leishmania* o las cepas *T. cruzi*. Por lo que el desarrollo de vacunas de DNA que codifiquen para antígenos altamente conservados en los dos géneros es promisorio.

La construcción de bibliotecas genómicas de *T. cruzi* (Alberti et al., 1999 y Alberti et al., 2001) y *Leishmania ssp* (Piedrafrita et al., 1999, Montalvo et al., 2001 y Montalvo et al., 2004) y su capacidad de inducir un tipo de respuesta inmune protectora en ratones llevó a buscar los genes que expresaron las proteínas causantes de dicha respuesta, para después aislarlos y clonarlos para la preparación de vacunas de DNA.

Los antígenos de *T. cruzi* codificados por las vacunas de DNA más estudiados son las trans - sialidasas que contienen un dominio altamente inmunogénico. La inmunización con plásmidos que codifican para las trans - sialidasas, ASP-1, ASP-2, TSA-1 (Nisha et al., 2002 y Katae et al., 2002) y un clon relacionado con la proteína ASP-2 (Boscardin et al., 2003), mostraron conferir una protección parcial contra

T. cruzi, reduciendo las lesiones, la parasitemia y aumentando la supervivencia de los ratones respecto a los controles. Así como también la terapia con las vacunas de DNA que codifican para las proteínas TSA-1 y Tc24, mostraron reducir la parasitemia en circulación a los ratones infectados (Dumonteil et al., 2004). Además, los genes para las proteínas KMP-11 genéticamente conservada en la mayoría de los cinetoplástidos y de la proteína de choque térmico HSP70 de *T. cruzi* se clonaron en plásmidos en forma individual o fusionados encontrando que la vacuna de DNA con los genes fusionados reduce la parasitemia (aproximadamente a cero) respecto a los ratones con los genes individuales (Planelles et al., 2001).

En los estudios de las vacunas de DNA contra *Leishmania ssp* se han utilizado una mayor cantidad de genes, que codifican para diferentes antígenos como son: PSA-2 (Hadj et al., 2004 y Hadman et al., 2000), Cpa y Cpb (Rafati et al., 2001 y Dumonteil et al., 2003), papLe22 (Fragaki et al., 2001), A2 (Ghosh et al., 2001), TSA (Campos-Neto et al., 2002), LmST11 (Campos-Neto et al., 2002), GP63 (Campos-Neto et al., 2003 y Hadj et al., 2004), GP46 (Dumonteil et al., 2003), LeIF (Hadj et al., 2004), p20 (Hadj et al., 2004), LACK (Dumonteil et al., 2003, Fonseca et al., 2004 y Hadj et al., 2004) y LACKp24 (Hadj et al., 2004). Todas estas vacunas de DNA confirieron protección parcial a los ratones contra el desafío a la infección con *Leishmania ssp* reduciendo el tamaño de las

lesiones y la parasitemia respecto a los controles, excepto la vacuna que codifica para el antígeno Meta-1. La administración intranasal de una vacuna de DNA (Fonseca et al., 2004), confirió protección a los animales reduciendo las lesiones y la parasitemia. Además, la vacuna de DNA-PSA-2 es capaz de reducir las lesiones en ratones ya infectados por lo que su uso terapéutico es importante (Hadman et al., 2002).

La co-administración de plásmidos con genes que codifican para inmunomoduladores, o diversas proteínas junto con las vacunas de DNA mostró dar mejores resultados en la protección a los animales. Por ejemplo la administración de un plásmido que codifica para la IL-12 ó el GM-CSF junto con un plásmido que contiene el gen TS (trans-sialidasas) da mayor protección a los ratones desafiados con *T. cruzi* que la vacuna de DNA con el gen TS solo (Nisha et al., 2002 y Katae et al., 2002). Otro grupo de investigadores utilizó el gen E6 del virus del papiloma humano que codifica para una proteína capaz de degradar a p53; el cual se administró junto con una vacuna de DNA que codifica para la cisteína proteinasa A2 de *L. donovani*. Esta proteína E6 evitó la degradación de la vacuna de DNA en el músculo de ratones por lo que dio mayor eficacia a la vacuna (Ghosh et al., 2001). Todo lo anterior sugiere que, la vacunación con un plásmido que codifica para un antígeno o cualquier otra proteína, junto con otro plásmido que codifica para un

inmunomodulador es una estrategia capaz de aumentar la respuesta inmune en mamíferos.

Las vacunas de DNA contra *T. cruzi* y *L.ssp* estudiadas por los investigadores ya citados, mostraron inducir tanto una respuesta inmune humoral evidenciada por la producción de anticuerpos de la clase IgG contra los parásitos, una respuesta inmune celular CD8⁺ citotóxica y una respuesta de células CD4⁺, (Tablas 4 y 5). Además, son capaces de reorientar la respuesta inmune de una respuesta no protectora a una respuesta protectora, como es el caso de las vacunas terapéuticas de DNA contra *T. cruzi* y *L. ssp* y de la vacuna DNA-papLe22 contra *Leishmania* (Fragaki et al., 2001).

Los resultados obtenidos con las vacunas de DNA en modelos preclínicos, respaldan los esfuerzos para optimizar las vacunas de DNA y que éstas puedan ser utilizadas en un futuro en el ser humano. En particular se debe evaluar la bioseguridad y la eficacia de estas vacunas de DNA.

Tabla 4. VACUNAS DE DNA CONTRA *T. cruzi*, RESPUESTA INMUNE PROVOCADA Y PROTECCIÓN

VACUNAS DE DNA CONTRA T. CRUZI, RESPUESTA INMUNE PROVOCADA Y PROTECCIÓN						
Vacuna de DNA	Antígenos codificados	Vía de administración	Dosis (µg p)	Respuesta inmune		Protección
				Humoral	Celular	
DNA-genoteca de <i>T. cruzi</i> Alberti et al., 1999 Alberti et al., 2001	♣	im	3 (50)	☆	☆	☆ cepa Y
DNA-KMP11/HSP70 Planelles et al., 2001	KMP11 HSP70	im	4 (-)	IgG _{2a}	CD8 ⁺	90% <P 50% S ★ cepa Y Brasil
pCMVTS+ pcDN A3-IL-12 Katae et al., 2002	TS IL-12	im	4 (100)	☆	CD8 ⁺	40% <P 100% S ★ cepa Tulahuén
pASP1+ pASP2+ pTSA1+ pIL-12+ pGM-CSF Garg y Tarleton. 2002	ASP-1 ASP-2 TSA-1 IL-12 GM-CSF	im	2 (33)	☆	CD8 ⁺	90% <P 100% S ★ cepa Brasil
pcDNA3-clon9 Boscardin et al., 2003	clon9	im	-	IgG	CD4 ⁺	90% <P 100% S ★ cepa Y
pcDNA3-TSA-1 Dumonteil et al., 2004	TSA-1	im	2 (100)	☆	CD4 ⁺ TH ₁	90% <P 70% S ★ cepa H4 y H1
pcDNA3-Tc24 Dumonteil et al., 2004	Tc24	im	2 (100)	☆	CD4 ⁺ TH ₁	90% <P 100% S ★ cepa H4 y H1

☆ No se determinó. ★ Protección parcial. ♣ En una genoteca están representados todos los genes de un organismo, por lo que la cantidad de antígenos codificados es variable. P Parasitemia. S Supervivencia.

Tabla 5. VACUNAS DE DNA CONTRA *L. ssp.* RESPUESTA INMUNE PROVOCADA Y PROTECCIÓN

VACUNAS DE DNA CONTRA <i>L. SSP</i> , RESPUESTA INMUNE PROVOCADA Y PROTECCIÓN						
Vacuna de DNA	Antígenos codificados	Vía de administración	Dosis (µg p)	Respuesta inmune		Protección
				Humoral	Celular	
pCMV-gp63 Xu y Liew.1995	GP63	im	2 (100)	☆	CD4 ⁺ TH ₁	90% <P ★ <i>L. major</i>
pmPSA-2 Hadman et al., 2000	PSA-2	im	2 (50) ó 100 1 (50)	☆	CD4 ⁺ TH ₁	60% <L ★ <i>L. major</i>
pCB6-Cpa + pCB6-Cpb Rafati et al., 2001	Cisteína proteínasa a y b	im	2 (100) c / p	IgG _{2a}	CD4 ⁺ TH ₁	47% <L ★ <i>L. major</i>
DNA-papLe22 Fragaki et al., 2001	papLe22	im	1 (100)	☆	CD4 ⁺ TH ₁	50% <P ★ <i>L. infantum</i>
pcDNA3-A2 + pcDNA3-E6 Ghosh et al., 2001	C.p. A2 y E6 proteína inhibidora de p53	im	2 (100) c / p	IgG ₁ IgG _{2a} IgG ₃	Prol. Cel. T	80% <P ★ <i>L. donovani</i>
DNA- TSA/LmST11 Campos-Neto et al., 2002	TSA LmST11	im	2 (100)	IgG ₁	CD4 ⁺ TH ₁ CD8 ⁺ citotóxica	96% <L ★ <i>L. major</i>
DNA-MCP3-M1 Cardoso et al., 2002	Proteína meta-1	im	3 (50)	IgG ₁	CD4 ⁺ TH ₂	<i>L. major</i> , <i>L.</i> <i>amazonensis</i> 0

☆ No se determinó. ★ Protección parcial. P Parasitemia. L Tamaño de la lesión.

Continuación Tabla 5. VACUNAS DE DNA CONTRA *L. ssp*, RESPUESTA INMUNE PROVOCADA Y PROTECCIÓN

VACUNAS DE DNA CONTRA <i>L. SSP</i> , RESPUESTA INMUNE PROVOCADA Y PROTECCIÓN						
Vacuna de DNA	Antígenos codificados	Vía de administración	Dosis (µg p)	Respuesta inmune		Protección
				Humoral	Celular	
VR1012gp46+ VR1012gp63+ VR1012-Cpb Dumonteil et al., 2003	GP46 GP63 Cpb	im	2 (100)	IgG _{2a}	CD4 ⁺ TH ₁ TH ₂	90% <P 80% <L <i>L. mexicana</i> ★
DNA-P4/IL-12 Campbell et al., 2003	Nucleasa P4 e IL-12	im	3 (100)	☆	CD4 ⁺ TH ₁	80% <P >L. <i>amazonensis</i> <L. <i>major</i> ★
DNA-P4/HSP70 Campbell et al., 2003	Nucleasa P4 y HSP70	im	3 (100)	☆	CD4 ⁺ TH ₁	80% <P <L. <i>amazonensis</i> >L. <i>major</i> ★
DNA-LACK Fonseca et al., 2004	LACK	in	2 (30)	☆	CD4 ⁺ TH ₁	85% <P <i>L. amazonensis</i> ★
DNA-LACKp24 Hadj et al., 2004	LACKp24	im	1 (50)	☆	☆	60% <L <i>L. major</i> ★
DNA-subgenoteca de <i>L. amazonensis</i> Montalvo et al., 2004	♣	im	2 (50)	☆	☆	60% <P 60% <L <i>L. amazonensis</i> ★

☆ No se determinó. ★ Protección parcial. ♣ En una subgenoteca están representados los genes de un cromosoma, por lo que la cantidad de antígenos codificados es variable. P Parasitemia. L Tamaño de la lesión.

VII. CONCLUSIONES

Las vacunas pcDNA3-TSA-1, pcDNA3-Tc24 contra *T. cruzi*, pmPSA-2 contra *L. major* y la vacuna de DNA contra *L. amazonensis* que expresa al antígeno LACK administrada por vía intranasal, son las preparaciones más relevantes. Las tres primeras por controlar la infección, la cuarta por la forma de administración no invasiva y porque todas podrían representar una alternativa atractiva para el desarrollo de una vacuna o un tratamiento terapéutico para uso humano.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberti AE, Acosta DA, Sarmiento EM, Hidalgo G, Fachado CA, Vidal MT, Luis LJ, Fonte GL. Respuesta humoral específica en ratones BALB/c inoculados con una librería genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. Revista Cubana Médica Tropical 1999; 51 (1): 20-25.
2. Alberti AE, Montalvo A.M., Ruiz EA, García MR, Martínez BM, Sarmiento GM, Acosta DA. Evaluación de la respuesta inmune humoral por western blot en ratones inmunizados con una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. Revista Cubana Médica Tropical 2001; 53 (3): 170-179.
3. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. Journal of Cell Science 1999; 112: 2993-3002.
4. Armijos RX, Weigel MM, Romero L, García V, Salazar J. Field trial of a vaccine against new world cutaneous Leishmaniasis in an at-risk Chile population: How long does protection last? The Journal of Infectious Diseases 2003; 187: 1959-1961.
5. Bachy M, Boudet F, Bureau M, Girerd-Chambaz Y, Wils P, Scherman D, Meric C. Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse. Vaccine 2001; 19: 1688-1693.

6. Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infection and Immunity* 2003; 71(5): 2744-2757.
7. Boyer JD, Cohen AD, Vogt S, Schumann K, Nath B, Ahn L, Lacy K, Bagarazzi ML, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, MacGregor RR, Weiner DB. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of β -chemokines. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181: 476-483.
8. Buscaglia CA. Trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*: un blanco potencial para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Revista del Hospital Materno Infantil Ramon Sardá* 2002; 21 (1): 24-27.
9. Brooks FG, Bute SJ, Morse AS. (2000). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Ed. El manual moderno. pags 703-710.
10. Calarota S, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leanderson AC, Sandstrom E. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet* 1998; 351: 1320-1325.
11. Campbell K, Diao H, Ji J, Soong L. DNA immunization with gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 2003; 71(11): 6270-6278.

12. Campos- Neto A, Porrozzì R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YAW, Reed SG, Grimaldi G. Protection against cutaneous Leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infection and Immunity* 2001; 69(6): 4103-4108.
13. Campos- Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Seiky YAW, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmST11 Leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infection and Immunity* 2002; 70(6): 2828-2836.
14. Cardoso S, Carlos H, Richards FA, Wajc M, Yokoyama- Yasunaka JKU, Wunderlich G, Marques BM, Bortolin USR. Evaluation of the murine immune response to *Leishmania meta 1* antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. *Vaccine* 2002; 20: 3755-3763.
15. Costa F, Franchin G, Pereira-Chioccola VL, Ribeiro S, Rodrigues MM. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* 1998; 16 (8): 768-774.
16. Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De luca PM, Mendonca SCF, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt. T-cell responsiveness of american cutaneous Leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: Immunologic patterns associated with cure. *Experimental Parasitology* 1996; 84: 144-155.

17. Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Matsuo K, Kurata T, Tamura S. Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase. *Vaccine* 2000; 18: 3214-3222.
18. Delogu G, Howard A, Collins FM, Morris SL. DNA vaccination against tuberculosis: Expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity. *Infection and Immunity* 2000; 68(6): 3097-3102.
19. Dietrich G, Kolb-Mäurer A, Spreng S, Scharl M, Goebel W, Gentschev I. Gram-positive and gram-negative bacteria as carrier system for DNA vaccines. *Vaccine* 2001; 19: 2506-2512.
20. Diez OH, Carlos LM, Thomas M, Puerta BC. KMP-11: proteína 11 de membrana de kinetoplástidos. *Universitas Scientiarum (Colombia)* 2004; 9: 29-44.
21. Donnelly J, Berry K, Ulmer JB. Technical and regulatory Hurdles for DNA vaccines. *International Journal for Parasitology* 2003; 33: 457-467.
22. DosReis GA. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Today* 1997; 13 (9): 335-342.
23. Dumonteil E. Vacunas de DNA: el presente y el futuro. *Revista Biomedica* 2000; 11(supl 1): S7-S12.
24. Dumonteil E, Escobedo-Ortegon J, Reyes-Rodriguez N, Arjona-Torres A, Ramirez-Sierra MJ. Immunotherapy of *Trypanosoma*

- cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infection and Immunity* 2004; 72(1): 46-53.
25. Dumonteil E, Ramirez-Sierra MJ, Escobedo-Ortegon J, Garcia-Miss MR. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 2003; 21:2161-2168.
26. Fonseca PE, De Mello CM, Rossi-Bergmann B. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2003; 21: 3534-3541.
27. Fonseca PE, Olmo PR, Rayol A, Larraga V, Rossi-Bergmann Bar. Intranasal vaccination against cutaneous Leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infection and Immunity* 2004; 72(8): 4521-4527.
28. Fragaki K, Suffia I, Ferrua B, Rousseau D, Le FY, Kubar J. Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decrease the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine* 2001; 19: 1701-1709.
29. Frasch ACC. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 2000; 16 (7): 282- 286.
30. Freire T, Robello C, Casaravilla C, Alvarez ED, Medeiros A, Carmona C, Osinaga. Antígenos mucínicos de O- glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de Fisiología (Uruguay)* 2002; 8: 89-107.

31. Garg N and Tarleton RL. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity* 2002; 70(10): 5547-5555.
32. Gonzales CR, Noriega FR, Huerta S, Santiago A, Vega M, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Isibasi A, Levine M. M. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. *Vaccine* 1998; 16 (9/10): 1043-1052.
33. Guizar Vázquez JJ. (2000) *Genética clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*. 3ª ed. El manual moderno. Mexico, D.F. pags 705-736.
34. Guzman- Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *TRENDS in Parasitology* 2001; 17 (8): 372-376.
35. Ghosh A, Labrecque S, Matlashewski. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increase DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine* 2001; 19: 3169-3178.
36. Hadj ASB, Bahloul C, Robbana C, Askri S, Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine* 2004; 22: 1631-1639.
37. Handman E. *Leishmania* vaccines: Old and new. *Parasitology Today* 1997; 13 (6): 236-238.

38. Handman E, Noormohammadi AH, Curtis JM, Baldwin T, Sjölander. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine* 2000; 18: 3011-3017.
39. Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Jean-Pierre, Scheerlinck. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infection and Immunity* 1995; 63(11): 4261-4267.
40. Hernández-Becerril N, Nava A, Reyes PA, Monteón VM. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Archivos de Cardiología de México* 2001; 71(3): 199-205.
41. Jia R, Hua GJ, Wen FM, B. Z, Chen Z, Peng B, Fan B. Mucosal immunization against dental caries with plasmid DNA encoding pac gene of *Streptococcus mutans* in rats. *Vaccine* 2004; 22: 2511-2516.
42. Jurado A, Herrero MJ. Vacunas de DNA en el tratamiento de la alergia. *BSCP Can Ped* 2001; 25 (1): 27- 35.
43. Katae M, Miyahira Y, Takeda K, Matsuda H, Yagita H, Okumura K, Takeuchi T, Kamiyama T, Ohwada A, Fukuchi Y, Auki T. Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infection and Immunity* 2002; 70(9): 4833-4840.
44. Kim JJ, Yang JS, Manson KH, Weiner DB. Modulation of antigen-specific cellular immune responses to DNA vaccination in rhesus

- macaques through the use of IL-2, INF- γ , or IL-4 gene adjuvants. Vaccine 2001; 19: 2496-2505.
45. Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenvit Y, Sedegah M, Epstein JE, Kumar S, Wang R, Doolan D. L, Maguire J. D, Parker S, Hobart P, Norman J, Hoffman S. L. Safety tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. Vaccine 2000; 18: 1893-1901.
46. Lezama - Davila CM. Vaccination of different strains of mice against cutaneous Leishmaniosis: Usefulness of membrane antigens encapsulated into liposomes by intraperitoneal and subcutaneous administration. Archives of Medical Research 1997; 28 (1): 47-53.
47. Macias AC, Robles N, Palacios X, Vega C, González MA, Ballester SJM. Respuesta inmune celular en enfermos con Leishmaniasis cutánea atípica. Revista Cubana de Hematología e Inmunología Hemoter 1999; 15 (1): 25-29.
48. Maldonado RA, Linss J, Thomaz N, Olson CL, Engaman D.M, Goldenberg S. Homologues of the 24-kDa flagellar Ca²⁺- binding protein gen of *Trypanosoma cruzi* are present in other members of the Trypanosomatidae family. Experimental Parasitology 1997; 86: 200-205.
49. Marañón C, Thomas CM, Planelles L, Lopez MC. The immunization of A2/K^b transgenic mice with the KMP11 - HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the *T. cruzi*

- KMP11 antigen: identification of A2-restricted epitopes. *Molecular Immunology* 2001; 38: 279-287.
50. Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 2001; 69(8): 4719-4725.
51. Mendez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YAW, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D. The potency and durability of DNA - and protein - based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low - dose, intradermal challenge. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 5122-5128.
52. Miller MJ, Wrightsman RA, Manning JE. *Trypanosoma cruzi* protective immunity in mice immunized with paraflagellar rod proteins is associated with a T - helper type 1 response. *Experimental Parasitology* 1996; 84: 156-167.
53. Montalvo AM, Alberti AE, González EMM, García MR, Sarmiento G. ME, Acosta DA. Construcción de una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis* y su expresión en músculo de ratones BALB/c. *Revista Cubana Médica Tropical* 2001; 53 (3): 154-160.
54. Montalvo AM, Monzote HL, Fonseca GL, Montano Goodridge I, Fonte GL, Soto M, Requena JM. Inmunización con subgenoteca de *Leishmania amazonensis* protege contra el reto a ratones BALB/c. *Revista Cubana Medica Tropical* 2004; 56 (2):

55. Montiel G y Diaz G. Respuesta inmune de células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños (Costa Rica) 2002; 37 (1-2): 57-63.
56. Morris S, Kelley C, Howard A, Li Z, Collins F. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. Vaccine 2000; 18: 2155-2163.
57. McMahon - Pratt D, Kima P.E, Soong L. Leishmania amastigote target antigens: The challenge of a stealthy intracellular parasite. Parasitology Today 1998; 14 (1): 31-34.
58. McMahon - Pratt D, Ridrguez D, Rodriguez J. R, Zhang Y, Manson K, Bergman C, Rivas L, Rodriguez JF, Lohman KL, Ruddle NH, Esteban M. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against Leishmania infection. Infection and Immunity 1993; 61(8): 3351-3359.
59. Neva FA y Brown HW. (1994). Basic clinical Parasitology. 6^a ed. USA. Appleton & Lange. pags 57-81.
60. Papadopoulou G, Karagouni E, Dotsika E. ISCOMs vaccine against experimental leishmaniasis. Vaccine 1998; 16 (9/10): 885-892.
61. Piedrafrita D, Xu D, Hunter D, Harrison RA, Liew FY. Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*. The Journal of Immunology 1999; 163: 1467-1472.

62. Planelles L, Thomas CM, Alonso C, Lopez MC. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infection and Immunity* 2001; 69(10): 6558-6563.
63. Rafati S, Baba AA, Bakhshayesh, Vafa M. Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote - specific cysteine proteinase. *Clinical Experimental Immunology* 2000; 120: 134-138.
64. Rafati S, Salmanian Ali. H, Taheri T, Vafa M, Fasel N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinase of *Leishmania major*. *Vaccine* 2001; 19: 3369-3375.
65. Ramiro MJ, Zárata JJ, Hanke T, Rodríguez D, Rodríguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime - boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 2003; 21: 2474-2484.
66. Rangarajan PN. DNA Vaccines. *Resonance (India)* 2002; p: 25-34.
67. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitology Today* 2000; 16 (6): 246- 250.
68. Simmonds RS, Shearer MH, Kennedy RC. DNA vaccines - from principle to practice. *Parasitology Today* 1997; 13 (9): 328-331.

69. Soong L, Duboise MS, Kima P, McMahon – Pratt D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous Leishmaniasis. Infection and Immunity 1995; 63(9): 3559–3566.
70. Suffia I, Ferrua B, Stien X, Mograbi B, Marty P, Rousseau D, Fragaki K, Kubar J. A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral Leishmaniasis. Infection and Immunity 2000; 68(2): 630–636.
71. Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore D, Curtis III R, Hoft DF. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. Infection and Immunity 2002; 70(9): 5065–5074.
72. Skeiky YAW, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Owendale PJ, Picha K, Morrysey PJ, Grabstein K. H, Campos – Neto A, Reed S. LeIF: A recombinant Leishmanai protein that induces an IL-12- mediated Th1 cytokine profile. The journal of immunology 1998; 161: 6171–6179.
73. Tacket CO, Roy M. J, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B antigen delivered by a gene delivery device. Vaccine 1999; 17: 2826–2829.
74. Taibi A, Plumas – Marty B, Guevara – Espinoza A, Schoneck R, Pessoa H, Loyens M, Piras R, Aguirre T, Grass- Masse H, Bossus M, Tartar A, Capron A, Ouaiissi A. *Trypanosoma cruzi*: immunity –

- induced in mice and rats by trypomastigote excretory – secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *The Journal of Immunology* 1993; 151: 2676-2689.
75. Treguagbi M. Presente y futuro de las vacunas. *Archivos de pediatria (Argentina)* 2002; 100 (1): 44-49.
76. Uliana S, Freymuller E, Smith DF. *Leishmania*: overexpression and comparative structural análisis of the stage – regulated *Meta 1* gene. *Experimental Parasitology* 1999; 92: 183-191.
77. Webb J. R, Campos – Neto A, Owendale PJ, Martín TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infection and Immunity* 1998; 66(7): 3279-3289.
78. Wize B, Garg N, Tarleton RL. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1 – encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity* 1998; 66(11): 5073-5081.
79. Wrightsman RA, Dawson BD, Fouts DL, Manning JE. Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen – 1 protein that mask protective epitopes. *The journal of immunology* 1994; 153: 3148-3154.
80. Wrightsman RA, Manning JE. Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus

expressing IL-12 generates antigen - specific responses and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 2000; 18: 1419-1427.

81. Xu D, Liew FY. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology* 1995; 84: 173-176.

82. Xu D, Mcsorley SJ, Chatfield SN, Dougan G, Liew FY. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by GP63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA⁻ AroD⁻). *Immunology* 1995; 85: 1-7.