



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFICACIA DE UNA VACUNA SINTÉTICA UTILIZANDO PÉPTIDOS
DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS SALIVARES ANTI-
HEMOSTÁTICAS (RHODNIINA Y PROLOXINA) DE LA CHINCHE
TRANSMISORA DE CHAGAS *RHODNIUS PROLIXUS*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JUAN CARLOS TLACAELEL VÁZQUEZ BENÍTEZ

Asesores:

MVZ PhD José Ángel Gutiérrez Pabello

MVZ PhD Juan Carlos Vázquez Chagoyán



Cd. Mx

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

A mis papás por su apoyo y amor incondicional.

A mi hermano León que me inspira a ser mejor persona.

A mi hermosa novia que me motiva a ser un mejor hombre.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo del CIESA por su apoyo y por sus consejos, Gabo, Toño, Viri, Mirna, Mirna2, Lau, Tito, Cesar, el Conta, Mayra, Juan Carlos, Anabel, Andrea, Guillermo, Hector y a Wael el profeta en tierras cristianas.

A mi asesor el Dr. José Ángel por su apoyo, comprensión y sobre todo paciencia.

A mis amigos, Kabuki por su insistencia y por su hidromiel, al Giovas por su resistencia y anarquía, y al ponchito por ser un Doobie brother.

A mis conejos que en contra de su voluntad hicieron posible llevar a cabo este trabajo.

Al CIESA de la UAEM por haber financiado este proyecto.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Hipótesis	200
Objetivo.....	21
Materiales y Métodos	22
Resultados	39
Discusión	45
Referencias.....	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	25
Cuadro 2.	26
Cuadro 3..	42
Cuadro 4..	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	288
Figura 2.....	30
Figura 3.....	311
Figura 4.....	322
Figura 5.....	333
Figura 6.	411
Figura 7.....	444

RESUMEN

Vázquez Benítez Juan Carlos Tlacaelel. Eficacia de una vacuna sintética utilizando péptidos derivados de las proteínas salivares anti-hemostáticas (Rhodniina y Prolixina) de la chinche transmisora de Chagas *Rhodnius prolixus*. (Bajo la dirección del: Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y el Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán).

La chinche besucona es el vector principal para la transmisión del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico que causa la enfermedad de Chagas que afecta al hombre. Existe un área de interés para el control de Chagas, la elaboración de vacunas capaces de prevenir la infección. En este trabajo se evaluó la capacidad de generar una respuesta inmune humoral en conejos, mediante una vacuna compuesta de 10 péptidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos de dos proteínas salivares de la chinche besucona *Rhodnius prolixus*, la prolixina y la rhodniina. Utilizando la técnica de ELISA indirecta se evaluó en tres etapas los niveles de anticuerpos en los sueros de conejos inoculados vía subcutánea y obtenidos por sangrado de la vena auricular a los 14, 28 y 43 días. Los sueros de los animales inoculados con la vacuna no presentaron diferencia con los grupos de control negativos. También se desafiaron los conejos con chinches de estadíos 4 y 5 para determinar si los grupos vacunados detonaban algún efecto en la alimentación de las chinches, tampoco se encontró diferencia significativa entre los grupos vacunados y grupos no vacunados.

Eficacia de una vacuna sintética utilizando péptidos derivados de las proteínas salivares anti-hemostáticas (Rhodniina y Prolixina) de la chinche transmisora de Chagas *Rhodnius prolixus*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad producida por el *Trypanosoma cruzi*, un parásito hemoflagelado transmitido por muchas especies de triatóminos. Esta enfermedad puede presentarse de forma aguda o crónica con síntomas que van desde un malestar generalizado con febrícula hasta la muerte asociada a cardiomiopatía chagásica. Es una enfermedad considerada como desatendida y asociada a la pobreza. No existen tratamientos terapéuticos ni profilácticos completamente efectivos y los esfuerzos para el control no han logrado erradicar al vector. De ahí que es necesario buscar nuevas estrategias para bloquear la transmisión parasitaria, interrumpiendo así el ciclo biológico del parásito. El objetivo del presente estudio fue utilizar péptidos derivados de proteínas salivares anti hemostáticas (Prolixina y Rhodniina) de las chinches como inmunógenos que generen una respuesta de anticuerpos que inactiven dichas proteínas y de este modo afectar la ingesta de sangre cuando se alimenta la chinche de los animales vacunados. Este estudio podría contribuir a generar conocimiento que conduzca a desarrollar métodos de control y prevención de la transmisión de *T. cruzi* y reducir la incidencia de esta enfermedad en zonas endémicas.

ANTECEDENTES

EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis parasitaria y endémica de los países latino americanos descrita por Carlos Chagas en 1909, quien fue el primero en descubrir el protozooario *T. cruzi* y en identificar a las chinches como el vector transmisor. Se calcula que solamente en Centro América y México existen casi 2 millones de infectados (1) y de 7-15 millones en todo Latino América (2). Se estima que 90-100 millones de personas están potencialmente en riesgo de ser infectados (3, 4,5).

La enfermedad de Chagas se clasifica como una metazoonosis ya que para que el vector (la chinche besucona) albergue y transmita el parásito, requiere alimentarse de un vertebrado mamífero ya infectado. El agente etiológico es el protozooario *T. Cruzi*, un kinetoplástido y parásito intracelular que infecta y se reproduce en las células del huésped, provocando una infección aguda, la cual sin tratamiento se convertirá en una infección crónica, comprometiendo la vida del individuo.

Esta enfermedad es de gran importancia en el sector salud y social, el primer caso humano reportado en México fue en el año 1940 (6) y a pesar de haber sido reconocida en 2001 por la Norma Oficial Mexicana (NOM-032-SSA2-2002), el gobierno mexicano ha mostrado muy poco interés en esta enfermedad, ya que no existe la infraestructura para establecer programas de control vectorial y transfusional, y hay poco apoyo en la búsqueda de tratamientos más efectivos y de desarrollo de vacunas. La enfermedad de Chagas afecta principalmente a los países en desarrollo o subdesarrollados, en los

cuales existen factores epidemiológicos, geográficos y climatológicos que son los condicionantes para que ésta se presente, además del subdesarrollo social y económico. Las viviendas construidas con material de desecho y de superficies rugosas con hendiduras, hechas de lámina, madera, tablones, adobe y palma también favorecen la transmisión del parásito. Otro factor en el ambiente rural es el estrecho contacto con los nichos y hábitat natural de los vectores. Estos insectos de la subfamilia Triatominae, cuentan con 138 especies, de los cuales la mayoría son hematófagos (7), en México se han encontrado hasta 30 especies vectores de Chagas clasificados en 8 géneros distintos: *Triatoma*, *Rhodnius*, *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Meccus* (antes perteneciente al género *triatoma*) y *Panstrongylus*. Dentro de las especies de mayor importancia epidemiológica en México son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Meccus pallidipennis*, *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *M. longipennis*, *M. mazzottii*, *T. mexicana*, *M. phyllosoma*, y *M. picturatus* (8).

La tripanosomiasis americana es una enfermedad muy antigua ya que se han encontrado momias en el Perú con evidencia de infección que datan desde hace 4000-9000 años (9). Sin embargo, fueron en los últimos siglos en que creció de forma significativa el número de infectados humanos debido a la intensa actividad del hombre al invadir, ocupar y deforestar el hábitat natural de las chinches, en los ecosistemas tropicales y subtropicales; ocupando el espacio físico de los insectos y depredando a los animales de los cuales se alimentaban las chinches. Fue durante este periodo en que se comenzó a modificar el comportamiento natural de la chinche, pasando de ser un vector de ciclo silvestre a uno con dos ciclos adicionales; el doméstico y el peridoméstico. Las especies

de triatóminos de ciclos silvestre y peridoméstico cambiaron de comportamiento debido a que algunas fueron adaptándose de manera exitosa a las viviendas humanas donde pueden alimentarse del hombre y de otros animales domésticos (perros, gatos y roedores). Los reservorios naturales más importantes en estado silvestre son el Tlacuache (*Didelphis marsupialis*, *D. mesamericana*, *D. virginiana* y *Philander opossum*) y el armadillo (*Dasypus novemcinctus*) pero también actúan como reservorios las ardillas, coatíes, murciélagos y agutíes (40,41).

PATOLOGÍA

El desarrollo patológico de la enfermedad de Chagas consiste de 2 etapas: la etapa aguda y la etapa crónica. La primera tiene una duración de 4-8 semanas con sintomatología leve a moderada y cuyos signos suelen manifestarse de las 2-4 semanas post infección. En esta etapa se presenta una parasitemia elevada, sintomatología caracterizada por pirexia, vómito, diarrea y con menor frecuencia hepatomegalia, esplenomegalia, meningitis, meningoencefalitis, miocarditis con la presencia de amastigotes y macrófagos en las fibras musculares, adenitis proliferativa histiocítica y con presencia de células gigantes poli nucleadas. Los tejidos dañados presentan edema, congestión vascular, infiltraciones leucocitarias periféricas por monocitos y linfocitos, posteriormente por fibroblastos y linfocitos. La infección puede ser detectada por pruebas serológicas, parasitológicas y moleculares. Posteriormente comienza la etapa crónica en donde existe una recuperación del huésped con la desaparición de síntomas generales y presentando un cuadro subclínico, tampoco se observan lesiones aparentes en tejidos

u órganos. Simultáneamente se observa una disminución de la parasitemia, esto se debe a que suele generarse un equilibrio entre el sistema inmune y el parásito, si el individuo no recibe tratamiento puede permanecer en esta etapa el resto de su vida (50-70% de infectados). A esta fase también se le conoce como la fase indeterminada, ya que la infección progresa de manera indefinida y depende del tropismo de la cepa infectante. En esta etapa se producen lesiones al sistema nervioso, desmielinización de nervios periféricos, cambios somato sensoriales y auditivos, se afecta la producción de saliva, sudor y hay cambios en los niveles de catecolaminas y acetilcolina. Sin embargo, la infección crónica avanzada se centra en dos formas diferentes de acuerdo a las principales lesiones generadas. Por sus implicaciones fisiológicas, las formas cardíaca y digestiva son las de mayor importancia, en la forma cardíaca pueden presentarse desde signos leves hasta la muerte como resultado de un paro cardíaco. El parásito intracelular al entrar a las células musculares causa lesiones sobre el miocardio, miocarditis multifocal con infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, arritmias con predominancia de extrasístoles ventriculares, trombosis ventricular posiblemente ocasionando tromboembolismos pulmonares, cerebrales, renales y esplénicos, insuficiencia ventricular, insuficiencia de la válvulas mitral y tricúspide asociado a cardiomegalia, bradicardia y fibrilación atrial. Por otro lado, la forma digestiva se caracteriza por la destrucción de la inervación autónoma entérica, provocando alteraciones funcionales y anatómicas de algunos órganos digestivos. El principal síntoma que se manifiesta en una persona con infección crónica digestiva avanzada es disfagia, dolor torácico, tos, hipo, regurgitación, ptialismo con aumento en el tamaño de

glándulas salivares principalmente las parótidas y marcada pérdida de peso. Se presentan colopatías, esofagopatías y alteraciones en la motilidad y secreción gástrica. La denervación intrínseca del esófago provoca megaesófago y alteraciones motoras como la disminución de la capacidad peristáltica y acalasia del esfínter posterior. Con menos frecuencia se desarrolla megacolon, con dilatación en la sección sigmoide y extendiéndose hacia el recto. Los principales síntomas asociados a colopatías son constipación, presencia de fecalomas, dolor y distensión abdominal, manifestación de incoordinación motora recto- sigmoide, motilidad basal aumentada o disminuida, acalasia del esfínter anal interno, hiposensibilidad de la pared rectal, todas asociadas a la denervación intrínseca del colon. (10, 39).

TRANSMISIÓN

El ciclo y transmisión vectorial de *T. cruzi* comienza cuando una chinche hematófaga se alimenta de un huésped infectado de *T. cruzi* en su fase infectante (tripomastigote metacíclico). Una vez en el intestino del triatómino los tripomastigotes o promastigotes cambian de estadio a epimastigotes no infectantes y se reproducen. Posteriormente la chinche se alimenta de un huésped no infectado y al llenarse de sangre la chinche defeca sobre y/o cercano a la herida, de esta manera los tripomastigotes metacíclicos infectantes no proliferativos que se encuentran en las heces penetran al tejido subcutáneo y logran incorporarse al torrente sanguíneo. Es aquí donde los parásitos son recogidos por los macrófagos y posteriormente llevados al bazo, ganglios linfáticos, y músculo cardiaco y esquelético. Entran a las células musculares y nerviosas, para después abandonar la

vacuola lisosomal y diferenciarse en amastigotes, replicándose en el citoplasma por fisión binaria. Posteriormente se rediferencian en tripomastigote, que rompe la célula y se incorpora de nuevo al torrente sanguíneo. Posteriormente llega una chinche no infectada y se alimenta del animal parasitado, y se repite el ciclo (10, 11, 12).

Existen otras formas de transmisión. Mediante una transfusión sanguínea de un donador infectado, de forma congénita por la circulación placentaria entre madre e hijo, por trasplante de órganos infectados, y por accidentes de laboratorio. En México se realizan 850,000 donaciones de sangre al año (5). Recientemente la Organización Panamericana de salud reportó que en México existe un alto índice de infección de *T. cruzi* por transfusión sanguínea; y que en los últimos años el tamizaje de anticuerpos contra *T. cruzi* pasó de una revisión del 30% del total de unidades hasta un 90% del total de sangre donada (3).

La infección por transfusión dependerá de varios factores correspondientes al donador, al receptor, a las medidas preventivas y de tamizaje de la sangre. Factores que son: el estado de parasitemia en el momento de la transfusión, la capacidad defensiva del sistema inmune del receptor y la cepa parasitaria infectante. La infección puede ser de forma asintomática o con la presentación de síntomas de 20-40 días después de la transfusión aunque podría manifestarse hasta 120 días después (13). La fiebre es el signo más frecuente, sin embargo, suele no ser reconocido ya que se puede interpretar de manera errónea como una supuesta reacción a la misma transfusión. El riesgo de transmisión está directamente relacionado con el número de veces que se recibe sangre del donador infectado y se estima que alcance hasta un 25% de riesgo de infección. Esta

ruta de infección puede llegar a ser la segunda vía más importante en países endémicos y la principal en países industrializados a causa de los altos índices de migrantes provenientes de países endémicos. (10).

La infección por trasplantes de órganos se da cuando se trasplanta un órgano de un donador infectado a un receptor no infectado, y aumenta el riesgo de infección por la inmunosupresión requerida para el procedimiento. Esta vía de infección es poco común y no tiene mayor relevancia epidemiológica en zonas endémicas ya que suele haber mayor control sobre este procedimiento, de manera que es más fácil reconocer la infección y tratarla antes de cualquier operación. (10)

CONTROL

El control epidemiológico se hace mediante fumigación y el uso de insecticidas controlando la población de los vectores. Se fumiga regularmente el hogar y sus alrededores, haciendo énfasis en los sitios donde se puedan albergar estos insectos. Ya sea en los corrales, y pilas de madera y otros materiales de construcción donde los insectos encuentran refugio, sombra y humedad. De esta manera se interrumpe la relación vector reservorio humano (14, 15).

El control terapéutico se hace con la aplicación de tratamientos químicos. Existen dos drogas aprobadas para combatir la infección por *T. cruzi* en humanos, el Nifurtimox y el Benznidazole. Nifurtimox (NFX, Lampit, Bayer, 5-nitrofurán (methyl-(5-nitrofurfurylideneamine) tetrahydro-4H-1,4-tiazine-1,1-dioxide) es un nitrofurano, un potente bacteriostático y bactericida que produce grandes cantidades de especies

reactivas de oxígeno tóxico como producto de una reacción entre oxígeno y metabolitos reducidos de nitrofuranyl. El Benzínidazol (BZN, Rochagan, Radanil, Roche, N-benzyl-2-nitroimidazole acetamide), es un nitromidazole con gran actividad anti tripanosómica. La eficacia de estos quimioterapéuticos varía de acuerdo a la susceptibilidad y a la cepa del parásito (16, 17, 18). El problema con estos medicamentos es que pueden producir efectos secundarios adversos. NFX puede provocar náusea, vómito, anorexia, pérdida de peso, insomnio, irritabilidad y poli neuropatía periférica. BZN puede ocasionar dermatopatía alérgica, síndromes gastrointestinales, depresión de medula ósea, purpura trombocitopénica, agranulocitosis, polineuropatía, parestesia y polineuritis de nervios periféricos. Dado que los tratamientos son prolongados (60 días) los pacientes que sufren de estos efectos con frecuencia abandonan el tratamiento antes de concluirlo (2, 18).

PREVENCIÓN

Los gobiernos de países sudamericanos han logrado el control y prevención de Chagas mediante la erradicación del vector domiciliario fumigando casas y áreas infestadas, y mediante programas obligatorios de muestreo y tamizaje antes de realizar una transfusión sanguínea. Hoy en día la aplicación de pruebas serológicas es el método más práctico disponible por el tamizaje, y estas pruebas abarcan la inhibición de hemoaglutinación, inmunofluorescencia, y ELISA. Actualmente la organización mundial de salud recomienda que se hagan por lo menos dos pruebas diferentes en el tamizaje. Existen otras técnicas de diagnóstico como son el uso de PCR (sensibilidad variable de 45-100%) y la observación directa del parásito en el microscopio, sin embargo es posible

que aun sin encontrar parásitos el donador resulte ser falso negativo (10). También se podría realizar una anamnesis de los donadores identificando factores predisponentes como son: procedencia de lugares endémicos, avistamiento del vector, edad avanzada y donadores primerizos

PROTEÍNAS ANTIHEMOSTÁTICAS

Existe un gran repertorio de proteínas antihemostáticas utilizado por los triatominos hematófagos para alimentarse de su huésped. Estas proteínas tienen como función suprimir la inflamación, vaso dilatar e inhibir la cascada de la coagulación para alimentarse satisfactoriamente sin que los mecanismos fisiológicos del huésped interrumpan el proceso. Existen diferentes familias en las cuales se agrupan dichas proteínas. Por un lado está la familia de lipocalinas encontrando al menos 62 distintas en las glándulas salivales de *R. prolixus*, y realizan su función mediante la unión a pequeños ligandos moleculares que tienen diversas actividades anti hemostáticas y actúan principalmente como inhibidores de agregación plaquetaria y vasodilatadores (19). El grupo más abundante y de mayor importancia dentro de la familia de lipocalinas para efectos de este estudio incluyen a las heme-proteínas denominadas nitroporinas (NP1-NP4, NP7) que actúan como vasodilatadores al transportar óxido nítrico (NO).

El NO es una molécula producida por el endotelio vascular y que actúa regulando su tono. El NO estimula vías de señalización, lo que ocasiona la relajación de la pared vascular. También es producido por células efectoras para matar microorganismos invasores y es importante como inhibidor de la agregación plaquetaria. *R. prolixus* produce NP's y NO en sus glándulas salivales. El NO es estable en un pH de 5-6, sin

embargo debe estar protegido y ligado a una molécula NP que lo transporta en una relación 1/1; de esta manera se transporta al huésped y se protege de oxidación. Una vez que el complejo se encuentra en la circulación del huésped, el pH elevado desestabiliza el complejo y el NO es liberado. NP1 y NP4 liberan NO de forma rápida ($k_{off}=2.5\text{seg}^{-1}$) resultando en vasodilatación en el sitio cercano a la alimentación. NP2 y NP3 lo liberan de manera más lenta ($k_{off}=0.1\text{seg}^{-1}$) y abarca un área más amplia (20). Las NP's también pueden unir una molécula de histamina a su bolsillo de unión. De esta manera actúa como esponja molecular al absorber las moléculas de histamina evitando su función inflamatoria. Dentro de la familia de Nitroporinas la de mayor utilidad para la chinche es la Nitroporina 2 o también llamada Prolixina S que tiene una masa molecular de 20 kDa y una cadena de 202 aminoácidos. Actúa como anticoagulante evitando el ensamblaje del factor del complejo intrínseco Xasa con las membranas aniónicas fosfolípídicas de plaquetas activadas (21). Interfiere con la interacción del factor IXa, VIIIa y la membrana fosfolípídica. Inhibe la activación del factor de coagulación IX por ambas vías, intrínseca y extrínseca, evitando la activación por VIIa/FT y por XIa. Al unirse al dominio de unión fosfolípídico Gla de la forma enzimática y zimógena del factor IXa, se impide la interacción IXa-XI (22). NP2 es la única nitroporina de la familia de lipocalinas con esta actividad anticoaguladora a excepción de NP3, sin embargo NP3 produce un efecto anticoagulante mucho menos eficiente (23). Al igual que el resto de las NP's, prolixina tiene propiedades antihistamínicas y vaso dilatadoras al tener la capacidad de transportar NO al sitio de penetración.

La Rhodniina también forma parte del repertorio de proteínas anticoagulatorias de *R. Prolixus*, es una proteína de 103 aminoácidos que tiene alta homología a la familia de inhibidores de proteasa Kazal-type con la diferencia de que Rhodniina solo es específica a trombina (24). Está conformada por una estructura de 2 dominios unidos por un enlace peptídico ácido, cada dominio se une de manera separada a diferentes superficies de la trombina. El primer dominio de terminal amino (residuos 11-48) abarca el 63% de la interfase y se une al sitio activo de la trombina que es responsable del corte proteolítico del fibrinógeno. El segundo dominio de terminal carboxyl (residuos 55-103) abarca el 33% de la interfase y se une al exosito de reconocimiento de fibrinógeno de la trombina. Se han encontrado y aislado otras proteínas homólogas a rhodniina en otras especies de chinches, *Triatoma infestans*, *Triatoma megista* y *Triatoma phyllosoma* (25).

PROTEÍNAS CANDIDATAS

Se enfocó a trabajar con enzimas anti hemostáticas específicamente secretadas por una de las chinches mejor estudiadas en Mesoamérica, *Rhodnius prolixus*. Ya no es de mayor prevalencia en México, pero es una chinche que se usa como modelo porque fue muy importante antes de que se utilizaran insecticidas en las casas en México y Centroamérica, ya que era una especie domiciliada.

Las proteínas (Prolixina y Rhodniina) son fundamentales para la acción anticoagulatoria y necesarias para la alimentación de *R. prolixus*. La Prolixina, es la única NP con una acción anticoagulatoria eficiente, y con una función importante antiinflamatoria y de vasodilatación en el huésped (19, 20, 21, 22, 23). De ahí que una función adecuada de

esta proteína esté asociada a la capacidad del insecto para alimentarse de su víctima y que si se pudiera interferir con la función normal de esta proteína, podría afectarse la viabilidad del triatómino y su capacidad vectorial. La segunda proteína, la Rhodniina, como se describió anteriormente, tiene la capacidad de unirse a la trombina e inhibir el componente más potente de la cascada de coagulación, el fibrinógeno (24,25). Asumiendo que una reacción Ag-Ac inhabilite los efectos anticoagulantes y vasodilatadores de la Prolixina y de la Rhodniina, y partiendo de que éstas son proteínas y por lo tanto de naturaleza inmunogénica, es razonable pensar que se pueden elaborar vacunas antiProlixina y/o antiRhodniina que aplicadas a los animales de los que se alimenta la chinche en las áreas domésticas y peri domésticas (humanos, perros, gatos y cerdos, por ejemplo) podría tener efectos negativos sobre la alimentación de la chinche y por tanto sobre su capacidad vectorial. El efecto directo de esta vacuna sobre los triatóminos sería una reducción de la capacidad de alimentarse, y algunos posibles efectos indirectos podrían ser:

- Si la sangre no tuviera un comportamiento normal en el aparato digestivo de la chinche, podría dificultarle la digestión, con lo cual se podría afectar su estado de nutrición.
- Un mal estado nutricional podría a su vez reducir la capacidad reproductiva de las chinches, disminuyendo así su prevalencia.
- Al no poder alimentarse de un huésped inmunizado, el insecto se vería obligado a salir a buscar durante más tiempo a su víctima, aumentando su exposición a un

mayor número de depredadores naturales, lo que en última instancia afectaría su supervivencia.

- Por último, aunque menos probable, sería posible que la falta de alimento produjera la muerte del insecto por inanición.

EPÍTOPOS

Los epítomos o determinantes antigénicos son las secuencias o los relieves en la superficie de una macromolécula que son reconocidos por el sistema inmunológico. La presencia de esta conformación permite el reconocimiento y unión de un antígeno con el sitio de unión a antígeno o parátomo, el cual forma parte de la región Fab de un anticuerpo.

Los epítomos se pueden clasificar de 2 tipos: epítomos lineales o continuos y epítomos discontinuos o no lineales (26). Los epítomos lineales se llaman de esta manera ya que son secuencias lineales de aminoácidos o péptidos de 9-12 monómeros conectados de manera ininterrumpida y tienen una estructura primaria de forma helicoidal que pueden ser reconocidos por los receptores de linfocitos T. Los epítomos discontinuos o no lineales, son estructuras más complejas, con forma tridimensional, conformada por 12-22 monómeros que pueden pertenecer a diferentes segmentos del mismo péptido (discontinuos), que por el doblaje natural de la cadena polipeptídica, pone en estrecho contacto a diferentes porciones de la cadena creando un grupo de residuos con propiedades físico químicas individuales e interacciones específicas entre diferentes grupos atómicos (26). Esta conformación es reconocida específicamente por células B. Es importante tener en cuenta que los epítomos que los linfocitos T reconocen son lineales

ya que son proteínas que han sido lisadas y transportadas por células presentadoras de antígenos. Este no es el caso para los linfocitos B ya que los epítomos lineales representan solamente el 10% de su reconocimiento. La mayoría de los anticuerpos y linfocitos B reconocen la estructura tridimensional (90%) de la proteína nativa. El número de epítomos existentes es enorme, se calcula que existen $>>10^{11}$ de epítomos discontinuos y la cifra para epítomos continuos de mayor de 9 aminoácidos es de 10^{11} (27).

Para la generación de una respuesta humoral es necesaria la interacción entre linfocitos B y linfocitos T. Los linfocitos B vírgenes circulan libremente hasta que entran en contacto con un antígeno que se va unir al receptor de superficie IgM. Es cuando éste se activa y se dirige a los tejidos linfoides secundarios donde entran en contacto con células dendríticas foliculares (FDC) y linfocitos Th foliculares (ThF) que se encuentran activados con antígeno específico. La interacción entre estas células provoca la diferenciación hacia células plasmáticas y de memoria, la proliferación clonal, cambio de isotipo, y la sobrevivencia y selección de células B con mayor afinidad.

Para encontrar epítomos y elegir aquellos que puedan generar una mayor respuesta inmunológica, existen programas y software en línea especializados en analizar las secuencias o estructuras de una proteína o antígeno. Estos programas utilizan algoritmos y bases de datos de epítomos previamente estudiados y registrados, de esta manera los programas comparan los epítomos ya existentes en la base de datos y buscan secuencias homólogas al antígeno candidato (27). Después del análisis, el programa expondrá las

regiones con mayor similitud a otras y por lo tanto, las que tienen mayor posibilidad de unirse a un receptor de membrana (27). Como se mencionó anteriormente, existen epítomos lineales y discontinuos. Es por esta razón que existen diferentes métodos para predecir epítomos, están los métodos que se basan únicamente en el análisis de la secuencia, los que analizan su estructura, y el método de predicción híbrido que combina ambas, secuencia y estructura. Nosotros buscamos estimular una respuesta inmune humoral por lo tanto buscamos encontrar epítomos de células B. Esto nos indica que debiéramos buscar epítomos discontinuos, ya que generan una reacción mucho más fuerte que los fragmentos lineales que no mantienen una conformación doblada y que simplemente podrían formar parte de un epítomo más complejo. Los epítomos B se dividen en 3 categorías de acuerdo a la potencia inmunogénica o bien la presencia de anticuerpos después de una inmunización. 1. Inmunodominante (el doble y/o triple los valores estándar), 2. Inmunogénica 3. No inmunogénica (ausencia de anticuerpos) (27). Sin embargo, las herramientas disponibles hoy en día no son lo suficientemente poderosas para analizar con precisión las estructuras tridimensionales con sus múltiples regiones encimadas y traslapadas, el número reducido de estructuras proteicas registradas en las bases de datos no confiere los recursos suficientes para determinar estructuras homólogas, y el alto costo y complejidad computacional para generar los diseños tridimensionales (27). La predicción de epítomos continuos es mucho más confiable ya que existen más recursos e información en las bases de datos de secuencias. Las herramientas disponibles para predecir epítomos lineales se basan en el análisis de las

propiedades de los aminoácidos, hidrofobicidad, carga, exposición de superficie y estructura determinada por la secuencia (27).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la enfermedad de Chagas es una zoonosis y es transmitido por un vector difícil de erradicar, tiene un alto índice de morbilidad ya que del 10 al 40% de infectados desarrollarán la etapa crónica, y la mortalidad a 10 años se encuentra en un rango de 9-85% dependiendo del daño cardíaco. Esta enfermedad que, abarca una gran parte del país, y la ausencia de un tratamiento 100% efectivo motiva a desarrollar nuevos mecanismos para el control efectivo de su transmisión.

HIPÓTESIS

La inmunización con péptidos correspondientes a las proteínas Rhodniina y Prolixina de la chinche besucona *Rhodnius prolixus* inducirán una respuesta inmune con base en anticuerpos que disminuirá la ingesta de sangre por *R. prolixus* en un modelo de conejo.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por péptidos de las proteínas Rhodniina y Prolixina de *R. prolixus* mediante la técnica de ELISA para valorar la medición de ingesta total de sangre de las chinches en conejos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar in silico y mandar a sintetizar 11 péptidos a partir de la secuencia de las proteínas salivares (Rhodniina y Prolixina) de la chinche *Rhodnius prolixus*.
- Habilitar un insectario que permita reproducir y mantener *Rhodnius prolixus*.
- Estandarizar la técnica de extirpación de glándulas salivales de chinches para la producción de antígeno control.
- Estandarizar las técnicas serológicas (inmunoabsorción ligado a enzimas; ELISA indirecta) para sueros de animales inmunizados con péptidos y proteínas derivados de glándulas salivales de *Rhodnius prolixus*
- Evaluar si los péptidos diseñados in silico inducen una respuesta inmune humoral suficientemente fuerte para afectar el proceso normal de alimentación de *Rhodnius prolixus* en conejos vacunados con dichos péptidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento fue diseñado para medir la eficacia de una vacuna peptídica polivalente en un modelo experimental animal (conejo).

ELECCIÓN DE PÉPTIDOS

Para determinar los epítomos más inmunogénicos de las proteínas Rhodniina y Prolixina, utilizamos los siguientes softwares en línea ABCpred para predecir los péptidos continuos más antigénicos (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) y DiscoTope para predecir epítomos no lineales (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>). Cada proteína que ha sido caracterizada en 3D tiene una clave PDB lo cual permite el acceso directo a su perfil y descripción.

ABCPRED:

Es un software que predice epítomos de células B en secuencias de antígenos utilizando una red neural artificial. Utiliza un algoritmo que funciona con bases de datos de patrones de longitud fija de epítomos de células B, se fija la longitud mediante la eliminación o adición de residuos en las terminales. El conjunto de datos utilizado para el entrenamiento y la prueba consta de 700 epítomos de células B y 700 no epítomos de células B (péptidos al azar) de longitud máxima de 20 residuos. Este servidor cumpliría con una precisión de 65.93% utilizando una red neuronal recurrente (28). Para acceder al servicio debimos

ingresar las secuencias de aminoácidos de cada proteína en el formato FASTA, que fueron obtenidas del Centro Nacional para información de Biotecnología (NCBI) (29). Se puede acceder a la Rhodniina con el número de acceso 1TBQ_S y a la Prolixina con el número Q26241.1.

DISCOTOPE:

Este software calcula epítomos discontinuos de células B utilizando estructuras 3D de proteínas. Se obtienen estas estructuras a partir de bases de datos de investigaciones pasadas y de proteínas descritas anteriormente. Actúa utilizando un método que calcula el acceso a posibles uniones a la superficie proteica y puntuación de propensión a epítomos de aminoácidos. Para el resultado final hace un análisis de la combinación del puntaje de la propensión de aminoácidos con el número de contactos de superficie (30). Cuanto menos es el contacto entre átomos de C alfa intramoleculares de cada residuo aumenta la localización de epítomos cerca de la superficie o en regiones expuestas. El problema con este método es que la medición del acceso de residuos de Ag a la superficie no es universal y no es suficiente para predecir todo tipo de Ag o todos los residuos de dichas proteínas, ya que no se puede predecir de forma eficiente las proteínas elongadas u otras subunidades de complejos biológicos asociados a la membrana (30).

SECUENCIAS DE RHODNIINA Y PROLIXINA

La secuencia FASTA de la Rhodniina comprende 103 aminoácidos a saber:
EGGEPACPHALHRVCGSDGETYSNPCTLNCAKFNKGPELVKVHDGPCEPDEDEDV
CQECDGDEYKPVCGSDDITYDNNCRLECASISSSPGVELKHEGPCRT y su clave PDB
siendo 1TBQ_S (GenBank)

La secuencia FASTA de Prolixina comprende 202 aminoácidos a saber:
MELYTALLAVTILCLTSTMGVSGDCSTNISPQGLDKAKYFSGKWYVTHFLDKDPQVTD
QYCSSFTPRES
DGTVKEALYHYNANKKTSFYNIGEGKLESSGLQYTAKYKTVDKKKAVLKEADEKNSYTL
TVLEADDSSAL
VHICLREGSKDLGDLYTVLTHQKDAEPSAKVKS AVTQAGLQLSQFVGTKDLGCQYDDQ
FTSL con número de acceso Q26241.1. Y su clave PDB siendo 1euo (GenBank).

A partir del análisis con el programa de ABCpred se obtuvieron para Rhodniina 10 posibles epítomos neutralizantes de los cuales solamente elegimos 4 péptidos que resultaron con mayor puntuación de antigenicidad y con menor traslape. Para la Prolixina se obtuvieron 16 posibles epítomos neutralizantes y se eligieron los 4 más antigénicos con el menor traslape posible (TABLA 1)

Para predecir los epítomos discontinuos más antigénicos utilizamos el software Discotope. Elegimos la región con mayor probabilidad antigénica. En el caso de la Prolixina, puesto que había dos regiones con alta probabilidad de ser epítomos antigénicos, se escogieron dos péptidos en lugar de uno (Tabla 2).

Cuadro 1. Epítomos continuos de Rhodniina y Prolixina reconocidos como inmunógenos in silico. Candidatos a vacuna contra *R. prolixus*.

Epítomos Continuos (ABCpred*)	Puntuación como epítomos inmunógenos
Rhodniin	
NPCTLNCAKF	0.79
GGEPACCPHA	0.76
LVKVHDPCE	0.68
ECDGDEYKPV	0.66
Prolixina	
GLDKAKYFSG	0.80
GLQYTAKYKT	0.78
VKEALYHYNA	0.76
LKEADEKNSY	0.75

* <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>

Cuadro 2. Epítomos discontinuos de Rhodniina y Prolixina reconocidos como inmunógenos in silico. Candidatos a vacuna contra *R. prolixus*.

Epítomos Discontinuos (Discotope**)	
Rhodniina	EPDEDED
Prolixina	DPQVTD
	DKKKAVLKEADEK

** <http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>

Los 11 péptidos seleccionados fueron utilizados para la elaboración de la vacuna y fueron sintetizados en Oberhausbergen, Francia, por la empresa Proteogenix (31), utilizando el método reportado anteriormente. Los péptidos fueron resuspendidos en PBS.

ANIMALES DE LABORATORIO

La fase experimental se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). Para este experimento se utilizaron 15 conejos de raza California adquiridos de una granja comercial de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEMex. El número de individuos que se utilizaron para el experimento fue determinado por el método de ecuación de recursos (32). Se obtuvo permiso del Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la FMVZ de la UNAM para poder utilizar conejos para éste experimento. El manejo, cuidado

y alimentación de los conejos fueron estrictamente sujetos a la NOM-062-ZOO-1999 (33). Cada conejo se identificó con un número específico marcado con plumón negro permanente en la parte distal interna de la oreja, que se remarcaba una vez por semana. La asignación de los tratamientos y de los grupos se realizó de forma completamente aleatoria; en breve: se numeraron los conejos del 1 al 15 de manera consecutiva, y se utilizó un programa de números aleatorios (<http://www.alazar.info/generador-de-numeros-aleatorios-sin-repeticion>). Se utilizaron conejas hembras, de 12 semanas de edad. Los animales se dividieron en tres grupos (A, B y C) cada uno integrado por 5 conejos. El grupo (C) fue el control negativo, grupo al cual solamente se le inyectó PBS vía SC en la parte dorsal del cuello. El grupo (B) fueron conejos inyectados vía SC en la parte dorsal del cuello con 50ug del adyuvante QS-21 una saponina inmunoestimulante (34, 35, 36), a una concentración de 500 ug/ml de péptidos, y suspendido en 100ug del diluyente (agua de grado biomolecular) sin péptidos. El grupo B fue diseñado de esta manera para evaluar cualquier posible reacción inmunológica específica hacia el adyuvante que pudiera tener algún efecto no previsto contra las chinches. El grupo (A) estuvo formado por conejos que fueron inyectados con la vacuna compuesta de 110ug de péptidos sintéticos resuspendidos en 100ug de PBS y formulado junto con 50ug del adyuvante QS-21. Las concentraciones experimentales se determinaron en base a datos de vacunas peptídicas encontrados en trabajos previos (36, 48, 50, 54).



Figura 1. La foto corresponde a la sección del bioterio donde se mantuvieron los conejos utilizados para el experimento.

CRÍA DE CHINCHES

Para llevar a cabo el experimento se requirió de un gran número de chinches en los estadios ninfales 4 y 5. Para tener esta cantidad de ninfas, el Dr. Ricardo Alejandro Aguilar de la escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional donó 30 chinches adultas, 20 hembras y 10 machos del género *Rhodnius prolixus*, los cuales fueron alojados en el bioterio del Centro de investigaciones y estudios avanzados

en salud animal de la Universidad Autónoma del Estado de México. Se siguieron las indicaciones y recomendaciones sugeridas por el Dr. Ricardo Alejandro Aguilar para el alojamiento y alimentación de los insectos, los cuales fueron albergados y criados en una incubadora sin marca a 27° C con una humedad relativa de 55% (Figura 2). Las chinches fueron alimentadas durante aproximadamente 1 hora de un conejo adulto macho el cual se utilizó únicamente para este fin. Después de 14 días de la alimentación, las hembras empezaron a poner huevos, los cuales eran recolectados diariamente, separados y alojados en contenedores marcados. Debido a la gran producción de huevos se llegaron a obtener alrededor de 400 ninfas de la primera postura. Cuando la totalidad de los huevos de un contenedor eclosionaban se procedía a alimentar las ninfas. Para realizar este procedimiento las ninfas se colocaban en un contenedor de plástico largo cubierto por tela manto de cielo. Posteriormente se le colocaba un pliegue de papel de manera que las ninfas pudieran trepar hasta el techo del recipiente y alimentarse a través de la tela. El recipiente se colocaba debajo del conejo el cual era inmovilizado y colocado sobre una tabla de madera con una abertura en la parte ventral de la misma de manera que el abdomen del conejo estuviera expuesto al recipiente colocado debajo de la tabla (Figuras 3, 4 y 5). Cuando la mayor parte de las ninfas estuvieran repletas y saciadas, se procedía a contabilizar las chinches que se alimentaron exitosamente, colocarlas en un recipiente limpio y guardarlas en la incubadora hasta las 2 semanas posteriores tiempo que completaban el ciclo hacia el siguiente estadio. Una vez que todas las ninfas hubieron mudado se volvían a cambiar a un recipiente limpio y se registraban los individuos vivos. Estos procedimientos se siguieron hasta obtener la población necesaria para el

experimento. Cabe mencionar que esta etapa del experimento fue de gran éxito ya que se obtuvieron suficientes insectos para este experimento así como otros realizados en el CIESA.



Figura 2. Incubadora insectario. La foto corresponde a la sección del bioterio donde se tiene el insectario y se mantiene bajo condiciones ambientales específicas.



Figura 3. Tabla de inmovilización. La foto corresponde al método en que los conejos eran inmovilizados para permitirle la alimentación exitosa a las chinches.



Figura 4. Tabla de inmovilización. En esta foto se muestra la forma en que se colocaba el recipiente con las chinches para que estas pudieran alimentarse de la parte ventral del conejo.



Figura 5. Chinchas post alimentación. Las chinchas se muestran agrandadas y repletas de la sangre del conejo.

OBTENCIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES

Con el fin de contar con una base para el experimento y con un posible control positivo para la prueba, se prosiguió a inocular dos conejos con una solución que contenía un lisado de glándulas salivales de *Rhodnius prolixus* y coadyuvante QS-21, con esto buscamos generar una respuesta humoral hacia las glándulas y por ende a las proteínas y péptidos en cuestión. Esta solución se inoculó 2 veces con intervalos de 14 días entre inyección. Para elaborar esta solución se utilizaron 10 chinchas adultas de las cuales se les hizo la disección para obtener un par de glándulas salivales de cada individuo. Esto

se logró desprendiendo la cabeza del tórax con unas pinzas entomológicas, se procede a separar la cabeza lentamente hasta que se observan el par de glándulas de color rosa, una vez identificadas, con otras pinzas se tomaron y se depositaron en un vial de 1.5 ml que contenía 50 ul de glutaraldehído para mantener las glándulas hidratadas. Posteriormente se le agregó 30ul de inhibidor de proteasa para evitar la desnaturalización de las proteínas. Después se hizo una lisis por congelación metiendo el vial en nitrógeno líquido durante 10 segundos, después se descongelaba y se mezclaba en un vortex. Esto se repitió 5 veces de manera que la lisis se lograba lo mejor posible. Después se pasaba a centrifugar a 16 000 g a 4° C durante 30 minutos. Al concluir la centrifugación se procedía a colectar el sobrenadante el cual contenía la proteína soluble. El sobrenadante se depositaba en un nuevo vial de 1.5 ml y se procedía al lavado el cual se realizaba mezclando el sobrenadante con 100ul de PBS y centrifugándolo a 14 000 rpm durante 15 minutos, este paso se repetía 3 veces. Terminando este paso se mezclaba la proteína soluble obtenida con 200ul del coadyuvante QS-21. Una vez hecha la solución se inoculó vía subcutánea en la parte dorsal del cuello del conejo. A los 14 días, después de la última inoculación, se obtuvo sangre para extraer suero del conejo y realizar la estandarización de la prueba y determinar si hubo una respuesta humoral a la inyección.

Para estandarizar la prueba y determinar la concentración adecuada de antígeno que se debía utilizar, se evaluaron placas de ELISA que tenían fijados los siguientes antígenos: por un lado glándula salival de *Rhodnius prolixus* a concentraciones de 0.2ug/ml, 2ug/ml o 5ug/ml por pozo y por otro el péptido SDGDEYKPV a concentraciones de 0.1ug/ml,

0.5ug/ml o 5ug/ml por cada pozo. La placa fue probada con sueros de dos conejos previamente inyectados con glándula salival.

SEROLOGÍA

Se extrajo sangre (3mL) de la vena auricular con un vacutainer de 5cc para la obtención de aproximadamente 500ul de suero de cada conejo para realizar un Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA Indirecta) (12 en total) para la detección de anticuerpos anti-peptídicos. La toma de muestra y ensayo inmunológico (ELISA) se realizó los días 14, 28 y 42 post inicio de la primera inyección. También se tomó una muestra y se realizó ELISA a un grupo de 30 conejos negativos para realizar la estandarización de la técnica con el fin de obtener valores de referencia de anticuerpos.

ELISA INDIRECTA

Se tapizaron los pocillos de una placa F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE, con 100ul de una solución compuesta de 5µg/ml de cada péptido diluidos en PBS 0.1 M (Tampón fosfato salino) a un pH de 7.4 y se incubó toda la noche a una temperatura de 4 ° C. Se le agregaron 200ul/pocillo de una solución bloqueadora (leche en polvo sin grasa al 1% en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST)), el cual se dejó incubando por 2 horas a 37 ° C. Después se enjuagó la placa con una solución amortiguada de lavado PBST pH 7.4 y se repitió 2 veces. Posteriormente se añadieron los sueros de los tres grupos de conejos por triplicado, diluido en solución amortiguada de anticuerpos (leche en polvo sin grasa al 1 % en PBST 0.1M pH 7.4) a una dilución 1:1000 y se dejó incubar a 37 ° C

durante 2 horas. Durante el periodo de incubación se preparó el anticuerpo secundario de cabra Anti-IgG:HRP de conejo (Abdserotec); a una dilución de 1:20000, esto es 1ul de Anti-IgG en 6ml de PBS. Concluyendo el periodo de incubación del anticuerpo primario, se volvió a enjuagar 2 veces con solución de lavado PBST. Se le agregó 100ul/pocillo de anticuerpo secundario anti-IgG:HRP (Abdserotec) diluidos en solución amortiguada de anticuerpo. Se dejó incubar a 37 ° C durante 30 minutos. Se enjuagó la placa 5 veces con solución amortiguada de lavado para eliminar anticuerpos que no se hayan unido a los anticuerpos primarios. Posteriormente se agregó 50ul/pocillo del sustrato TMB (3,3',5,5'Tetrametil-Bencidina). Se esperó de 10-15 minutos para que reaccionara el sustrato con los anticuerpos marcados; y se le añadió 100ul/pocillo de solución de paro 2 M H₂SO₄. Se midió a una densidad óptica de 450nm con espectrofotómetro Spectramax 340PC.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Las lecturas de OD que fueron obtenidas por la prueba se evaluaron con análisis de varianza y prueba de comparación múltiple (Tukey) para comprobar diferencias entre las medias de los diferentes grupos.

INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON PÉPTIDOS

La primera dosis de la vacuna peptídica polivalente consistió de 10 ug de cada péptido (110 ug total de péptidos) a una concentración de 1mg/ml suspendidos en un volumen de 100 ul de agua de grado biomolecular, y administrados junto con 50 ug de QS-21 (Saponina), a una concentración de 500ug/ml, que se aplicó el día 0 al grupo A.

Posteriormente se aplicaron los refuerzos los días 15, 30 y 45. El grupo control B fue inyectado únicamente con 50 ug de adyuvante QS-21 suspendido en 100 ul del diluyente (agua de grado biomolecular) los días 0, 15, 30 y 45. Los conejos del grupo C solo fueron inyectados con PBS pH 7.4 los mismos días que los otros grupos. Las concentraciones experimentales se determinaron con base en datos de vacunas peptídicas encontrados en trabajos previos (36, 48, 50, 54).

EFFECTO DE LA INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON PÉPTIDOS SOBRE LA ALIMENTACIÓN DE LA CHINCHE

Se alimentaron 300 chinches en total del género *Rhodnius prolixus* con los conejos del experimento y los insectos fueron del cuarto estadio ninfal, debido a que es en este estadio es en el que se registra mayor consumo de sangre del huésped (37). Al día 45 post primera inyección todos los subgrupos y cada conejo fue desafiado con 15 chinches *Rhodnius prolixus* de 4to estadio ninfal. Se colocaron los conejos sobre una tabla de madera en el cual quedaron inmovilizados para proteger y facilitarle la alimentación a las chinches (fig 5). Se hace énfasis en que las chinches fueron criadas en el bioterio y no están infectadas con el parásito *T. cruzi*. La tabla tiene una abertura en la parte central para que las chinches se alimenten del área abdominal del conejo. Los conejos permanecieron un tiempo máximo de 30 minutos con el fin de reducirles el estrés por estar inmovilizados. Las chinches estuvieron sujetas a ayuno de 15 días anteriores al desafío con el propósito de incentivarlas a que comieran a la repleción. Las ninfas se colocaron en frascos y se pesaron antes y después de la alimentación, se utilizó una

báscula analítica para medir el peso de sangre ingerida. Se registró el tiempo en que tarda el insecto en picar al conejo (tiempo de ataque), tiempo que tardó en alimentarse, tiempo a la primera defecación y su frecuencia durante y después de la alimentación.

Posteriormente, las chinches fueron alojadas en frascos de manera separada de acuerdo al subgrupo y se mantuvieron en observación directa en los frascos dos veces al día durante dos semanas para determinar si hubo un efecto negativo sobre su viabilidad y muda al siguiente estadio ninfal. El consumo de sangre de las chinches fue evaluado con análisis de varianza (ANOVA) y sus diferencias fueron analizados con la prueba t-student ($P < 0.05$).

RESULTADOS

IMPLEMENTACIÓN Y MANUTENCIÓN DE CHINCHES:

Se establecieron las condiciones para la cría y cultivo de *Rhodnius prolixus*. Se estandarizaron procedimientos para mantener las condiciones adecuadas de la incubadora de controlar temperatura, humedad y luz necesarias para la cría de las chinches. Se implementó un protocolo para la alimentación de éstas en conejos y se diseñó y produjo el equipo (inmovilizador de conejos y contenedores de chinches, figuras 2, 3 y 4) necesario para realizar la tarea. Se fertilizaron por apareamiento 20 chinches hembra que produjeron 400 huevos, de los cuales eclosionaron aproximadamente 350. Las ninfas fueron criadas hasta el cuarto estadio alimentándolas cada 15 días durante 2 meses. Al final se prepararon 300 insectos que se utilizaron para la prueba de eficacia de la vacuna para inhibir la alimentación del vector *Rhodnius prolixus*.

EXTRACCIÓN DE ANTÍGENO DERIVADO DE GLÁNDULAS SALIVALES DE *RHODNIUS PROLIXUS*.

Se utilizaron 10 ejemplares adultos de chinches de las que se obtuvieron las glándulas salivales. Estas fueron lisadas y se calculó la concentración de proteína total por el método de Bradford; y se utilizó como antígeno crudo a las siguientes concentraciones: 0.2ug/ml, 2ug/ml y 5ug/ml para la preparación de micro placas para ELISA y para inmunizar 2 conejos que sirvieron como controles positivos en las pruebas serológicas.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR PÉPTIDOS SINTÉTICOS EMPLEANDO LA PRUEBA DE ELISA.

Para estandarizar la prueba y determinar la concentración adecuada de antígeno que se debía utilizar, se evaluaron placas de ELISA que tenían fijado antígeno, por un lado se utilizó lisado de glándula salival de *Rhodnius prolixus* a una concentración de 0.2ug/ml, 2ug/ml y 5ug/ml por pozo y por otro se utilizó como antígeno el péptido SDGDEYKPV a una concentración de .1ug/ml, .5ug/ml y 5ug/ml por cada pozo. La placa fue probada con sueros de dos conejos previamente inyectados con glándula salival con el propósito de contar con un control “positivo”, y 3 conejos negativos.

Los resultados obtenidos mostraron que la concentración ideal de antígeno para ser utilizado en la evaluación fue de 0.5 ug/pozo ya que las placas de 2 y 5 ug/pozo no mostraron gran variación. Posteriormente para estandarizar la dilución se utilizó el péptido SGDEYKPV a una concentración de 0.5 ug/ml por pozo a diferentes diluciones, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100. Obteniendo mejores resultados con la dilución 1:100. Esta prueba nos permitiría demostrar que el protocolo era correcto ya que podríamos observar si hubiera una respuesta humoral al péptido que utilizamos para sensibilizar la placa.

El análisis de los resultados indicó que después de 3 inoculaciones con 10 ug de cada péptido (110 ug total de péptidos) a una concentración de 1mg/ml suspendidos en un volumen de 100 ul de agua de grado biomolecular, y administrados junto con 50 ug de QS-21 (Saponina), a una concentración de 500ug/ml, los animales vacunados no

mostraban diferencia a los controles negativos y solamente se presentaron diferencias a favor del grupo positivo con el valor de $P < 0.05$.

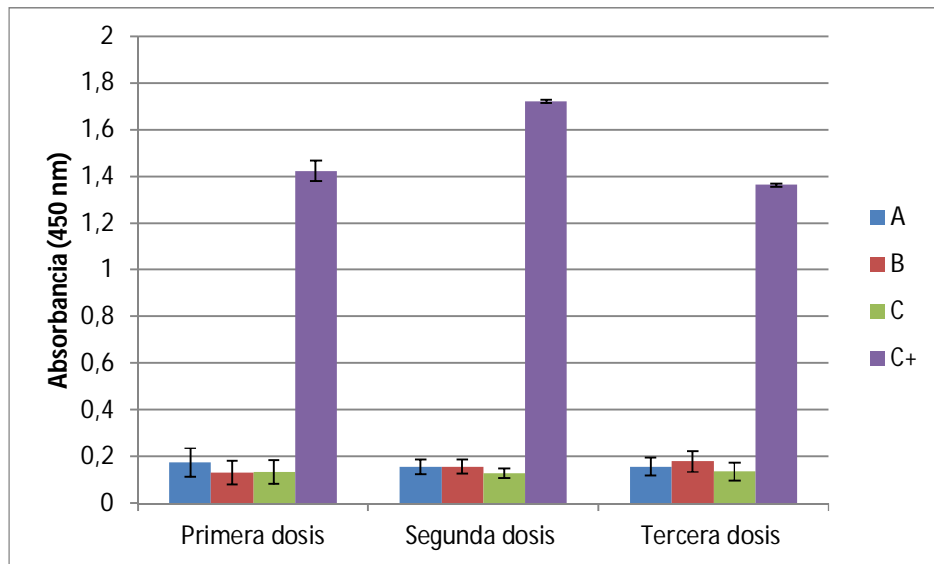


Figura 6. Gráfica comparativa entre los 3 grupos experimentales con control positivo en cada una de las 3 dosis administradas durante el experimento. Se muestran los valores de absorbancia a 450 nm de OD. [A, Grupo inoculado con pool de péptidos y adyuvante; B, Grupo inoculado con PBS y adyuvante; C, Grupo inoculado únicamente con PBS; C+, Grupo inoculado con lisado de glándula salival].

Cuadro 3. Valores de absorbancia de las 3 dosis. [A, Grupo inoculado con pool de péptidos y adyuvante; B, Grupo inoculado con PBS y adyuvante; C, Grupo inoculado únicamente con PBS; C+, Grupo inoculado con lisado de glándula salival]. El análisis estadístico de los resultados mostró que las medias de los valores de absorbancia obtenidos en las pruebas de ELISA para los sueros correspondientes al muestreo inicial y solamente se presentaron diferencias a favor del grupo control positivo.

Primera Dosis		
Grupo	Media	Desviación Std.
A	0,173	0,061
B	0,131	0,050
C	0,133	0,049
Control +	1,424	0,0438
Segunda Dosis		
Grupo	Media	Desviación Std.
A	0,155	0,031
B	0,155	0,030
C	0,128	0,020
Control +	1,721	0,006
Tercera Dosis		
Grupo	Media	Desviación Std.
A	0,156	0,038
B	0,178	0,043
C	0,136	0,038
Control +	1,363	0,006

Cuadro 4. Los valores del desafío de las chinches en el estadio 4 y 5 tampoco mostraron diferencia significativa entre grupos en el peso en gramos de las chinches después de la alimentación.

Estadio 4			
Grupo	N	Media	Desviación Std.
A	75	0,1212	0,011
B	75	0,113	0,01
C	60	0,108	0,006
Estadio 5			
Grupo	N	Media	Desviación Std.
A	75	0,24	0,036
B	75	0,22	0,035
C	60	0,261	0,016

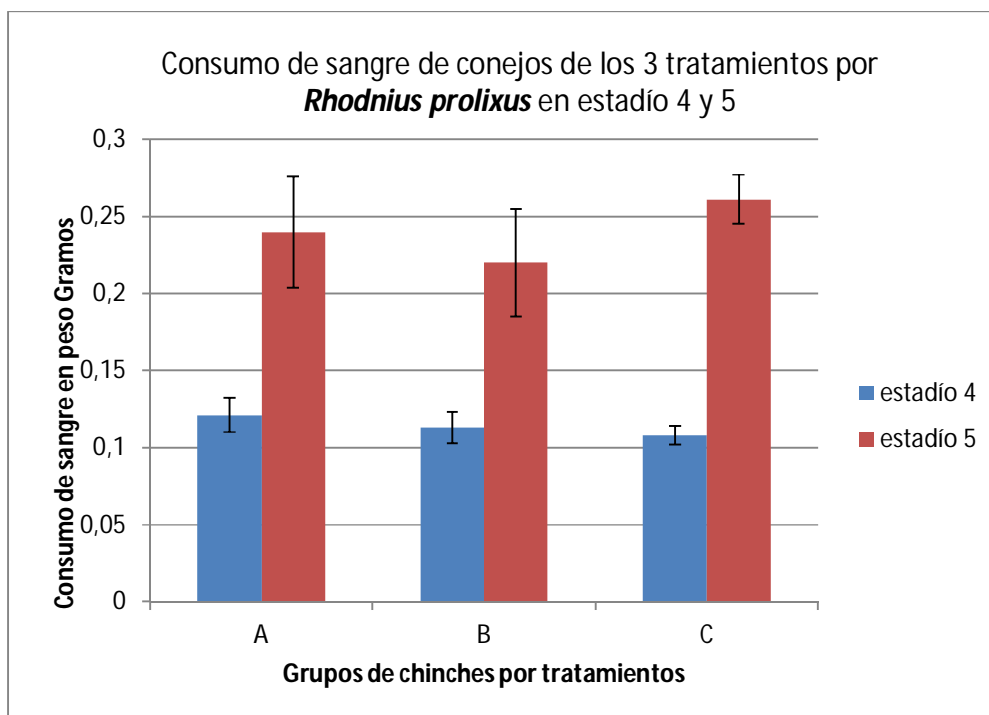


Figura 7. Gráfica comparativa entre los diferentes grupos de chinches que fueron desafiados con su alimentación de los 3 grupos de conejos, se compara el consumo de sangre medido mediante la diferencia de peso en gramos de las chinches antes y después de la alimentación durante el estadio 4 y 5 de los insectos. A, Grupo inoculado con pool de péptidos y adyuvante; B, Grupo inoculado con PBS y adyuvante; C, Grupo inoculado únicamente con PBS.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

Se encontró que los conejos inoculados no tuvieron diferencias serológicas con los controles negativos y que los resultados del peso de sangre consumida por de las chinches entre grupos experimentales tampoco tuvieron diferencia significativa. Incluso se pudo observar que hubo una menor respuesta serológica en los animales vacunados con péptidos, que la producida por la inoculación de glándula salival macerada utilizada para la estandarización de las pruebas de ELISA, por lo tanto se rechaza la hipótesis de que a través de la inmunización de animales con los péptidos utilizados derivados de Rhodniina y Prolixina, se pueda alterar el proceso de alimentación de la chinche besucona.

Sin embargo sí se pudo obtener una respuesta inmune humoral a partir de un inóculo de glándula salival de chinche adicionado con el adyuvante QS-21.

La enfermedad de Chagas, es de gran interés para nuestro país ya que repercute en el desarrollo económico y el bienestar de probablemente más del 5% de nuestra población (1,2). La enfermedad es causada por el *T. cruzi* que es transmitido por vector, la chinche besucona (39). Debido a que este insecto se encuentra de forma silvestre en la mayor parte del país y por la falta de infraestructura y presupuesto público, es casi imposible

erradicarlo por los métodos convencionales de uso de insecticidas (2). Este estudio se derivó de la inquietud de saber si sería posible afectar el desarrollo de la chinche a través del sistema inmune de los animales de los que se alimenta. Dado que las chiches utilizan una batería de enzimas que previenen la coagulación de la sangre mientras se alimentan nos preguntamos si se podría generar una vacuna que inactivara dichas enzimas para reducir su eficiencia de alimentación, de donde se derivaría una reducción en su capacidad de transmitir al *T. cruzi* a su víctima. De ahí que en esta investigación se evaluó la respuesta humoral en conejos inoculados con un combinado de péptidos sintéticos desarrollados a partir de la secuencia de 2 proteínas salivares de *Rhodnius prolixus*, y el efecto de la vacunación sobre la eficiencia de la chinche para alimentarse de esos animales.

En el transcurso de este trabajo se logró implementar protocolos de cría, reproducción y cultivo de *Rhodnius prolixus* y se puede considerar que debido al buen desarrollo reproductivo de esta chinche en el laboratorio, se logró la meta de utilizar 300 ejemplares para el experimento (20 chinches por conejo), y debido al manejo cuidadoso de los insectos, logramos habilitar un insectario para el CIESA de la FMVZ de la UAEM con una gran población de *Rhodnius prolixus* en todos sus estadios de desarrollo, lo cual será de gran utilidad para el grupo de investigación de Chagas del centro de investigación en futuras investigaciones ya sean propias o en colaboración con otras instituciones. El insectario fue acondicionado también como laboratorio para el manejo de las chinches, y se establecieron procedimientos reproductivo y de manejo de las mismas, se establecieron prácticas de bioseguridad tales como el uso de lentes protectores, bata y

guantes, aislamiento del cuarto donde se albergaban los insectos, sala de trabajo, registro de los frascos, sexado de los insectos para evitar tener una sobre producción que dificultaría el manejo. Por último un calendario de sacrificio, alimentación y recolección de huevos para que siempre se cuente con especímenes productivos.

Otro aspecto importante del trabajo fue que se diseñó un inóculo a partir de glándulas salivales de la chinche adicionado de adyuvante (QS-21), que nos permitió demostrar que es posible inducir una respuesta inmune humoral contra los antígenos de la glándula y a las proteínas que la conforman. Obtener el suero de los conejos vacunados con esta solución también nos permitió estandarizar la prueba ELISA para el uso de los péptidos. Desafortunadamente no se buscó una descripción más profunda o una caracterización más a detalle de la vacuna con glándula salival ya que su estudio no estuvo contemplado en este experimento. Sin embargo sería interesante poder identificar y aislar de esta preparación en crudo los elementos que lograron generar una respuesta humoral en la prueba y evaluar si los animales inmunizados evitan la alimentación de las chinches.

Los resultados de las pruebas serológicas y de alimentación de chinches no fueron los esperados, por lo que se rechaza la hipótesis de que a través de la inmunización de animales con los péptidos derivados de Rhodniina y Prolixina siguiendo la metodología descrita, se pueda alterar el proceso de alimentación de la chinche besucona. Esto se afirma porque se encontró que los conejos inoculados no tuvieron diferencias serológicas con los controles negativos y que los resultados del peso de sangre consumida por de

las chinches entre grupos experimentales tampoco tuvieron diferencia significativa. Incluso se pudo observar que hubo una menor respuesta serológica en los animales vacunados con péptidos, que la producida por la inoculación de glándula salival macerada utilizada para la estandarización de las pruebas de ELISA. Todo esto sugiere que el combinado de péptidos inoculado no produjo la respuesta humoral que se buscaba y que habrá que buscar otras alternativas.

Para eso, es importante que se reflexione acerca de los posibles errores en el diseño experimental del estudio y así evitar que se repitan en un futuro. Entre los factores más importantes a considerar en el diseño de vacunas, normalmente se incluye el que los Antígenos (AGs) sean capaces de participar en una respuesta protectora frente a un patógeno, los sistemas y las vías de administración de los antígenos para inducir la respuesta deseada y los potenciadores inmunológicos (adyuvantes) para generar una respuesta eficaz (42). El objetivo del presente estudio fue el de bloquear la alimentación de la chinche en conejos vacunados contra Rhodniina y Prolixina, con la hipótesis de que los anticuerpos generados contra las proteínas anticoagulantes las inhibirían y de este modo la sangre se coagularía en el sitio del piquete y que esto interferiría de alguna forma con la alimentación del insecto. Esta estrategia requiere que se monte una respuesta inmune humoral en los sujetos vacunados. De ahí que se eligieron péptidos que debían activar el sistema inmune por la vía de presentación exógena o endocítica, que es la vía usual de presentación de péptidos derivados de proteínas presentes en los endosomas. De esta forma los péptidos debían ser presentados por las moléculas MHCII de la forma en que se presentan las macromoléculas extracelulares que son internalizadas en los

compartimentos endosómicos mediante fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediada por receptor y otros mecanismos. Luego entonces, estos péptidos debían ser presentados por las moléculas MHCII a los Linfocitos T CD4+. La vía de presentación mediante moléculas MHCII es solo constitutivamente activa en las CPAs, (DCs, LB, macrófagos) y en las células epiteliales tímicas. En este sentido es preciso entender que el inicio de la respuesta de una vacuna después de la inyección depende de que los antígenos usados y el adyuvante concuerden con los patrones de antígenos asociados a patógenos para atraer a las células dendríticas, monocitos y neutrófilos al sitio de inoculación, las señales de peligro producidas por la vacuna deben ser suficientemente fuertes para activar a los monocitos y células dendríticas, de modo que la activación produzca cambios de los receptores de superficie para inducir la migración de estas células a los vasos y nódulos linfáticos, donde serán activadas las células B y T (53).

A pesar de que las vacunas peptídicas de este experimento no generaron una respuesta humoral detectable con nuestros métodos, no se debe perder de vista el enorme potencial que pueden tener las vacunas elaboradas con péptidos. Diversos trabajos demuestran que se puede generar una respuesta inmune ya sea humoral o celular a partir de la inoculación de péptidos sintéticos u obtenidos de diversas estructuras proteicas de organismos patógenos (36,42, 43). Se debe tomar en cuenta el enorme reto de encontrar cadenas peptídicas que presenten la conformación y características moleculares adecuadas que permitan, en primera instancia, generar una respuesta humoral eficaz.

En el desarrollo de vacunas a base de subunidades lo más importante y complejo es la elección de un Ag capaz de montar una respuesta inmune protectora adecuada y eficiente contra el patógeno e inocua contra el paciente. Esta tarea es muy complicada cuando se parte de antígenos de los que poco se sabe cómo es el caso de la Rhodniina y Prolixina y que puede ser costoso y laboriosos producirlos. En el diseño de los antígenos utilizados en el presente estudio se consideró primero la clonación de las proteínas completas a partir de rtPCR de glándula salival de *Rhodnius prolixus*. Sin embargo, se determinó que el tiempo para la implementación de los protocolos requeridos para un proyecto de este tipo sería muy prolongado para esta tesis, por lo que se decidió mandar sintetizar dichas proteínas. Entonces, nos encontrábamos en la disyuntiva de mandar sintetizar la proteína completa, lo cual es muy costoso, o bien mandar sintetizar péptidos que representaran fracciones antigénicas de las proteínas objetivo. Se optó por la segunda alternativa porque existen proveedores comerciales que pueden sintetizar péptidos cortos a un precio relativamente accesible. Por lo que para el diseño de los péptidos, que en teoría tuvieran una buena inmunogenicidad, se acudió a las recomendaciones de los programas ABCpred y Discotope, que son programas computacionales que, como se explicó con anticipación, predicen epítomos de células B en secuencias de antígenos lineales cortos o en tercera dimensión, respectivamente. Desde luego una forma de explicar los resultados negativos del presente estudio, podría ser que los epítomos predichos por estos programas hubieran fallado. Esto podría deberse a que la base de datos utilizada por dichos programas para la predicción de los epítomos no tenga capacidad para trabajar con epítomos de linfocitos B y T CD4+ de conejo, dado que las

bases de datos han sido construidas con información de humanos y de ratón doméstico. Es decir, que los patrones antigénicos asociados a patógenos de humanos no sean suficientemente parecidos a los que se presentan en conejos. En realidad, aunque sabíamos que esto podría suceder, para nuestro nivel de desarrollo biotecnológico, la única forma de averiguarlo era poniendo los péptidos a prueba y así lo hicimos. Probar que el diseño de los epítomos fue equivocado por las razones expuestas puede ser motivo de futuras investigaciones en el desarrollo de programas de predicción de epítomos.

Otra posibilidad sería que algunos de los epítomos (o todos) estuvieran bien diseñados pero que los antígenos se degradaran muy rápidamente después de la entrega. Una solución técnica para este problema sería que los genes de estos péptidos se clonaran en vectores virales o plasmídicos, o bien que se entregaran en bacterias o levaduras recombinantes que los expresaran (47) De estos sistemas probablemente los primeros dos no funcionarían para cumplir los objetivos del proyecto porque este tipo de vectores inducen principalmente respuesta inmune de tipo celular (47). El tercero y cuarto podrían ser motivo de investigación en proyectos futuros en esta área.

El tamaño de nuestros péptidos pudiera ser un motivo de preocupación, dado que la inmunogenicidad de los antígenos es inversamente proporcional a su tamaño, es decir, mientras más pequeños los antígenos menos antigénicos (50). En el caso de nuestro estudio se utilizaron 10 péptidos con una longitud de 7-13 aa. Pudiera ser que el tamaño de los péptidos usados hubiera sido un obstáculo para la inducción de la respuesta inmune. Existen reportes de péptidos relativamente pequeños (con una longitud de 15 a 45 aminoácidos) de los que se obtuvo una inmunogenicidad razonablemente buena. En

la mayoría de estos estudios se elegían diferentes péptidos potencialmente inmunógenos y se ensamblaban para formar una sola cadena (péptidos quiméricos) utilizada para inmunizar, aunque también se administraban de forma individual (36). En futuros estudios sobre proteínas anticoagulantes debería pensarse en la construcción de péptidos de mayor longitud de modo que sean más antigénicos.

En el diseño de la vacuna se asumió que los epítomos estaban bien diseñados, pero sabíamos que la inmunogenicidad de los péptidos puros normalmente es baja, y se requería de incorporar a la vacuna compuestos inmunoestimulantes. Los adyuvantes pueden influir en la respuesta inmune hacia un Ag en varios sentidos ya que pueden mejorar la magnitud de la respuesta inmune contra un Ag débil, aumentar la velocidad y duración de la respuesta inmune, modular la avidéz de los anticuerpos (isotipos o distribución de subclases), estimular y modular la respuesta inmune (Th1, Th2 y/o CTLs), promover la inducción de respuesta inmune local, disminuir la cantidad de Ag necesaria, reducir el costo de la vacuna, o disminuir la competencia entre Ags de las vacunas multicomponentes (40,45,46).

Existen muchos adyuvantes que pueden ser usados, entre los que se encuentra el QS-21 (saponina). En el presente estudio se eligió este adyuvante porque es una emulsión que tiene efecto en la liberación y presentación del antígeno, induce citocinas inmunomoduladoras, tiene efectos sobre las células presentadoras de antígenos y porque en el grupo de investigación del CIESA existen antecedentes del uso de este

adyuvante con proteínas recombinantes de *T. Cruzi* (47) y con lisados de epimastigotes de *Trypanosoma rangeli* (48) que han funcionado razonablemente bien. Los resultados de este trabajo sugieren, asumiendo que los péptidos tuvieran un diseño adecuado, que la saponina no es el adyuvante más indicado para hacer a nuestros péptidos más inmunogénicos. Pero desafortunadamente este tipo de información solo puede generarse probando su funcionamiento experimentalmente.

En próximos experimento se debe elegir un adyuvante más adecuado. Hay varios tipos de adyuvantes: emulsiones de agua en aceite (adyuvante de Freund, completo e incompleto, Montanide ISA51, Montanide ISA 720) que son buenos inmunógenos pero que no cumplen con los requisitos de seguridad (49,50). Las emulsiones de tipo aceite en agua (MF59, AS03) que estimulan la inducción de quimiocinas a nivel local y reclutan monocitos que capturan el Ag e induce su diferenciación a células dendríticas (49,50) y que han sido utilizados con éxito con la una subunidad proteica del virus de la influenza (49,50). Los polímeros (ac. Poliláctico, polipéptidos, poliestireno, polietilen glicol, etc. Estos adyuvantes permiten una continua liberación de los Ags encapsulados lo cual promueve una constante estimulación de los CPA e induce la formación del inflamosoma (51). Existen también los virosomas, liposomas y partículas tipo viral que han probado ser muy útiles como adyuvantes (47) y podrían ser adyuvantes más adecuados para experimentos futuros, ya que estas partículas se asocian a los antígenos y evitan su degradación, los dirigen a las CPA y funcionan como un sistema de depósito y administración de antígenos.

Mientras que algunas vacunas pudieron incitar una respuesta humoral, otras lograron producir una respuesta celular. Nuestro estudio no consideró la evaluación de una respuesta celular, y a pesar de que la vacuna no haya podido estimular una reacción humoral, si es posible que pudiera generar una respuesta celular. Esta pregunta podría responderse en futuras investigaciones.

En otros estudios se puede ver que la presencia de anticuerpos en los sueros desafío pueden observarse desde una dilución de 1:50 y que las mejores diferencias se podían encontrar en diluciones de 1:100 (54). De acuerdo con nuestras pruebas de sensibilización también obtuvimos los mejores resultados con dilución de suero a 1:100 mostrando una reacción distinta entre los controles negativos y las muestras del control con glándula salival y se mostraba de forma más evidente la diferencia entre los sueros de estos grupos.

También se debe tomar en cuenta que este estudio se centró en crear una reacción humoral hacia una proteína perteneciente a un insecto vector de la enfermedad de Chagas. De manera que el antígeno utilizado para la vacuna es una proteína externa y ajena a la patogenia del *T. Cruzi*, esto vuelve más difícil encontrar un control positivo para la prueba. En este caso para poder establecer un tipo de control positivo, utilizamos el suero de un conejo adulto que es utilizado para alimentar a las chinches del bioterio y se le inoculó el antígeno crudo (glándula salival). Asumimos que el conejo tendría AC circulantes contra los antígenos de la saliva de la chinche, esto lo pudimos demostrar en el momento de la estandarización, ya que obtuvimos valores superior a los controles negativos en el momento de la prueba ELISA en el cual se utilizó un péptido sintético

para sensibilizar la placa. Esto nos indica que la vacuna peptídica no fue suficiente para poder estimular una respuesta humoral, al contrario de la que si generaría la inoculación de antígeno crudo.

PROSPECTIVA.

Para poder obtener una perspectiva más clara del funcionamiento de las proteínas salivares y de ellas la identificación de posibles péptidos inmunogénicos, se debe realizar un estudio completo de las proteínas en su estado nativo. Realizándoles un estudio de cristalografía de rayos-x para poder determinar con precisión las características de la estructura proteica, peptídica y atómica al igual que su conformación espacial y utilizar esa información para encontrar zonas que pudieran ser vulnerables a un enlace Ag-AC, de esta manera la elección de péptidos no estaría sujeto a comparaciones subjetivas y subdesarrolladas.

El problema con la predicción de epítomos es que son mayoritariamente discontinuos y enormemente diverso, superando la capacidad de las herramientas computacionales disponibles actualmente. La base de datos está muy limitada ya que ha sido alimentada con solamente unos cuantos miles de complejos Ag-Ac, cuando las posibilidades de interacción Ag-Ac pudiera alcanzar números muy superiores. También la falta de información en la base de datos específicamente acerca de si una proteína o antígeno es inmunogénica o no dificulta las predicciones in sílico. (27)

Debería de haber un mayor desarrollo en el modelaje molecular y matemático de los complejos e interacciones Ag-Ac y en las simulaciones del sistema inmune e interacciones proteicas. También se deberán encontrar epítomos conservados y núcleo de péptidos (peptide core) para mejorar la eficacia del software (28).

Debido a la gran variabilidad de tamaño y longitud de péptidos y residuos, es difícil que los programas puedan predecir eficientemente, ya que muchos de estos requieren de un patrón de longitud fijo para analizar y predecir con mayor precisión. No se sabe la longitud óptima para epítomos de células B y es difícil la predicción por la imposibilidad de computar la composición de epítomos de poca longitud.

A diferencia de las células T, se sabe que estas células requieren de secuencias de 9-12 aminoácidos que pueden ser reconocidos por los receptores de las moléculas de MHC de los linfocitos T (30).

Para la elaboración de una vacuna exitosa se requiere evitar perturbar los pliegues para preservar la conformación espacial usando proteínas nativas y, subdominios, proteínas rediseñadas cargando el epítomo o el uso de péptidos con mimótopos.

Para facilitar y potenciar las reacciones Ag-Ac en la lectura de la ELISA, se recomienda adherir una molécula de biotina en la terminal N del grupo amino alfa durante la síntesis de los péptidos y cubrir la placa con esta y otra molécula llamada estreptavidina la cual es agregada al conjugado, la biotina presenta alta afinidad a la molécula de estreptavidina lo cual puede mejorar la unión Ag-Ac (52). Esta aplicación práctica puede resultar útil debido a que a pesar de que la placa es cubierta y absorbida mediante interacciones hidrofóbicas entre los péptidos y la superficie polímero de la placa, la utilización de

péptidos por si solos puede presentar una disminución en la adherencia a la placa por el uso de detergentes intrínsecos del proceso de ensayo, y/o pueden ocurrir cambios conformacionales afectando significativamente la inmunoreacción.

No queda claro si el adyuvante utilizado para elaborar la vacuna haya sido el correcto o si hubiera sido mejor utilizar otro adyuvante o una mezcla de ellos.

Es probable que la baja inmunogenicidad demostrada por los péptidos se debiera también a su reducido tamaño. Ha sido reportados que moléculas tan pequeñas son malos inmunógenos y que incluso no generan células de memoria. Por lo que algunas alternativas que debería considerarse en futuros experimentos para que la vacuna sea más inmunogénica podrían ser: 1) péptidos en construcciones mucho más grandes, como elementos de un polipéptido de mayor tamaño integrando uno o más péptidos en la construcción con adyuvantes, 2) los péptidos conjugados con polisacáridos, 3) la proteína completa recombinante con adyuvantes, 4) también podrían utilizarse vectores virales o bacterianos recombinantes que sobre expresen los péptidos o las proteínas completas, estas vectores deberían aplicarse inactivados.

También podría cambiarse la forma ruta de administración de los péptidos, se ha visto que la ruta de administración y la forma de administración tienen una gran influencia en la inducción de una respuesta inmune adecuada. De ahí que se podría pensar en la aplicación de los péptidos o proteínas sintéticas o recombinantes ya sea de forma intradérmica, subcutánea o intramuscular acompañadas de electroporación, que es un procedimiento que permite hacer llegar el antígeno de forma más eficiente a las células

presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas y macrófagos). Otras formas de administración podrían ser la aplicación como tatuaje, la utilización de pistolas de genes donde se podrían transferir plásmidos de expresión de los péptidos.

REFERENCIAS

1. - G. A. Schmunis. 2007. The globalization of Chagas disease
- 2.- Juan Diego Maya, Myriam Orellana, Jorge Ferreira, Ulrike Kemmerling, Rodrigo López-Muñoz y Antonio Morello. 2010. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. Chile Biol Res 43: 323-331
- 3.- OPS – Organización Panamericana de la Salud, 2006. Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas. Documento OPS/HDM/CD425-06. Organización Panamericana de la Salud, Montevideo.
4. - Salvatella, R.A., 2007. Achievements in Controlling Chagas Disease in Latin America.
- 5.- Moncayo, A., Silveira, A.C., 2007. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 (Suppl. I), 17–30.
6. - Mazzotti L., 1936. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el país. Demostración de tripanosomas en los reduvidos transmisores. Medicina (Mex).; 16: 584-5.

7. - Cleber Galvao, Rodolfo Carcavallo, Dayse Da Silva Rocha & Jose Jurberg. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36 (2003)
8. - Alejandro Cruz-Reyes, José Miguel Pickering-López, 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years - A Review. Instituto de Biología, UNAM, México
- 9.- Guhl, F., Jamillo, C., Vallejo, G.A., Yockteng, R., Cardenas-Arroyo, F., Forniciari, G., 1999. Isolation of *Tripanosoma cruzi* DNA in 4000 year old mummified human tissue from northern Chile. *Physiol. Anthropol.* 108, 625–635.
10. - WHO—World Health Organisation, 2002. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Tech. Rep.
11. - Higushi, M.L., 1999. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasites antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I), 263–267.

12. - Jose Rodrigues Coura, Jose Borges-Pereira., 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 115 (2010) 5-13
13. - Schmunis GA, Cruz JR 2005. Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev* 18: 12-29.
14. - Fernando Abad-Franch, Walter S. Santos, Christopher J. Schofield, 2010. Research needs for Chagas disease prevention. *Acta Tropica* 115 (2010) 44-54
15. - Vazquez-Prokopec, G.M., Spillmann, C., Zaidenberg, M., Kitron, U., Gurtler, R.E., 2009. Cost-effectiveness of Chagas disease vector control strategies in northwestern Argentina. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e363
16. - Brener, Z., 1975. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv. Pharmacol.Chemother.* 13, 1–81.
17. - Brener, Z., Gazzinelli, R.T., 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114 (2), 103–110.
18. - Julio A. Urbina, 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, Current limitations and new approaches. Venezuela. *Acta tropica*115 (55-68)

19.- John F. Andersen, nanda P. gudderra, Ivo M. B. Francischetti, and Jose M Ribeiro. 2005. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus* Arch Insect Biochem Physiol. 58 (2): 97-105

20. - Andersen JF, Ding XD, Balfour C, Shokhireva TK, Champagne DE, Walker FA, Montfort WR. Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: Evidence for stabilization of a nitric oxide ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap. Biochemistry 2000; 39(33): 10118-10131. PubMed: 10956000

21. - Zhang Y, Ribeiro JM, Guimaraes JA, Walsh PN. Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex. Biochemistry 1998; 37(30):10681–10690.

22. - Haruhiko Isawa, Masao Yuda, Kentaro Yoneda, and Yasuo Chinzei. 1999. The insect Salivary Protein, Prolixin-S, inhibits Factor IXa Generation and Xase Complex Formation in the Blood Coagulation Pathway. The journal of Biological Chemistry. Vol.275, No. 9, Issue of March 3, pp. 6636-6641, 2000

23. - Jose M. C. Ribeiro, Marcelo Schneider and Jorge A. Guimaraes. 1995. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Biochem. J. (1995) 308, 243-249

24.- Thomas Friedrich, Burkhard Kroger, Siegfried Bialojan, Hans Georg Lemaire, Hans Wolfgang Hoffken, Peter Reuschenbach, Markus Otte and Johannes Dodt. 1993. A Kazal-type Inhibitor with Thrombin Specificity from *Rhodnius prolixus*. The Journal of Biological Chemistry. Vol.268, No.22, Issue of August 5, pp.16216-16222, 1993

25.- Andreas van de Locht, Dorian Lamba, Margit Bauer, Robert Huber, Thomas Friedrich, Burkhard Kroger, Wolfgang Hoffken and Wolfram Bode. 1995. Two heads are better than one; crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin, The EMBO Journal vol. 14 no.21 pp.5149-5157, 1995

26.- M.H.V. Van Regenmortel. 2009. Synthetic Peptide Vaccines and the Search for Neutralization B cell Epitopes. The Open Vaccine Journal, 2009, 2, 33-44

27. - Xingdong Yang and Xinglong Yu. 2008. An introduction to epitope prediction methods and software. Reviews in Medical Virology, 2009; 19: 77–96

28. - Saha, S and Raghava G.P.S., 2006. Prediction of Continuous B-cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network.

(<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>.

29. - NCBI, The National Center for Biotechnology Information,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

30. - Pernille Haste Andersen, Morten Nielsen, and Ole Lund. 2006. Center for Biological Sequence Analysis, Biocentrum, Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark.

31.- Proteogenix. <http://www.proteogenix.fr/>

32. - Mead R. 1988. The design of experiments. Cambridge, New York: Cambridge University Press. 620 p.

33. - NOM-062-ZOO-1999

34. - Nils T. Nyberg, Lennart Kennea, Bengt Ronnberg, Bo G. Sundquist. 2000.
Separation and structural analysis of some saponins from *Quillaja saponaria* Molina.
Carbohydrate Research 323:87–97

35. - Amy S. McKee, Michael W. Munks, and Philippa Marrack 2007. How Do Adjuvants Work? Important Considerations for New Generation Adjuvants. J. Immunity commentary. DOI 10.1016/.2007.11.003

36.- Oscar Kashala , Roberto Amador, Maria V. Valero, Alberto Moreno, Arnoldo Barbosa, Beatrice Nickel, Claudia A. Daubenberger, Fanny Guzmanb, Gerd Pluschke , Manuel. E. Patarroyo. 2002. Safety, tolerability and immunogenicity of new formulations of the *Plasmodium falciparum* malaria peptide vaccine SPf66 combined with the immunological adjuvant QS-21. *Vaccine* 20 (2002) 2263–2277

37.- Bar, María E., Alicia M. F. Milano, Miryam P. Damborsky, Elena B. Oscherov y Gilberto Avalos. 2003. Patrones de alimentación y de defecación de *Triatoma rubrovaria* (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. ISSN 0373-5680 *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 62 (1-2): 107-113, 2003.

38.- Antonio R. L. Teixeira, Mariana M. Hecht, Maria C. Guimaro, Alessandro O. Sousa and Nadjar Nitz. 2011. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(3):592-630.

39. - World Health Organization. Chagas disease: control and elimination. In: Report of the secretariat. WHO, Geneva: UNDP/World Bank/WHO. 2010. Available from http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf.

40. - Michael J. Yabsley, Emily L. Brown, and Dawn M. Roellig. Evaluation of the Chagas Stat-Paktm Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Wildlife Reservoirs. *J. Parasitol.*, 95(3), 2009, pp. 775–777

41. - R. E. GÜrtler¹, M. C. Cecere, M. A. Lauricella, M. V. Cardinal, U. Kitron, and J. E. Cohen. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*. 2007 January; 134(Pt 1): 69–82. Doi: 10.1017/S0031182006001259

42. - Coria Mirta Lorena. Estudio de la capacidad adyuvante de la proteína Omp 19 de *Brucella spp.* Sobre la respuesta inmune adaptativa.

43.- Nadja kopp, Diana Diaz, Mario Amacker, David O. Odongo, Konstantin Beier, Cordula Nitsch, Richard Bishop, Claudia a Daubenberger. Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus microplus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* MB86 homologues. *Vaccine* 28 (2010) 261-269

44. - Titball, R.W., Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug Discov Today*, 2008. 13(13-14): p. 596-600.

45. - Purcell, A.W., J. McCluskey, and J. Rossjohn, More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. 6(5): p. 404-14.

46. - Singh, M. and D. O'Hagan, Advances in vaccine adjuvants. Nat Biotechnol, 1999. **17**(11): p. 1075-81.

47. - Shivali Gupta y Nisha Jain Garg. Prophylactic Efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in Mice. PLoS Neglected Tropical Diseases. August 2010. Volume 4. Issue 8. E797

48.- Jose E. Aparicio-Burgos, Jose A. Zepeda-Escobar, Roberto Montes de Oca-Jimenez, Jose G. Estrada-Franco, et al. 2015. Immune Protection against *Trypanosoma cruzi* Induced by TcVac4 in a Canine Model. PLoS Neglected Tropical Diseases. Dis 9(4): e0003625. doi:10.1371/journal.pntd.0003625

49. - Graham, B.S., et al., Immunization with cocktail of HIV-derived peptides in montanide ISA-51 is immunogenic, but causes sterile abscesses and unacceptable reactogenicity. PLoS One, 2010.5(8): p. e11995.

50. Audran, R., et al., Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. Infect Immun, 2005. 73(12): p. 8017-26.

51. - Sharp, F.A., et al., Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(3): p. 870-5.

52.- V.S. Ivanov, Z.k. Suvorova, L.D. Tchikin, et al. Effective method for synthetic peptide immobilization that increases the sensitivity and specificity of ELISA procedures. Journal of Immunological Methods. 153 (1992) 229-233

53. - Jensen, P.E., Recent advances in antigen processing and presentation. Nat Immunol, 2007. 8(10):p. 1041-8.

54. – Gutierrez Maria C, et al., The Immunogenic Activity of Synthetic Peptides Corresponding to *Mycobacterium leprae* Protein Sequences. Asia Pacific of Molecular Biology and Biotechnology, 1994, Volume 2, No. 2 June, pp. 143-150.