



**BENEMÉRITA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EL  
MODELO MURINO INMUNIZADO CON LA rTcENO POR VÍA  
SUBCUTÁNEA**

**Tesis para obtener el título de  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**C. MONTSERRAT GUTIÉRREZ SOTO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D. C. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA**

**PUEBLA, PUE**

**Diciembre 2019**





**BUAP**

Oficio No. BIOSAC/1652/2019  
Asunto: Asignación de Jurado

**Mtra. María Elena Ruíz Velasco**  
Directora de Administración Escolar, BUAP  
**PRESENTE**

Por este conducto le envío un cordial saludo, así mismo me permito informarle que la **C. MONTSERRAT GUTIERREZ SOTO** de la Licenciatura en Biotecnología, presentará su Examen Profesional con el título de tesis: "Caracterización de la respuesta inmune de rTcENO por vía subcutánea" bajo la Dirección del Dr. Alejandro Carabarin Lima. La asignación del Jurado quedará integrado por:

**PRESIDENTE: DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ VAZQUEZ**  
**SECRETARIO: DR. ALEJANDRO CARABARIN LIMA**  
**VOCAL: M. EN C. ELDA CARREON MORENO**

El examen se celebrará en las instalaciones de nuestra Facultad el día **13 de diciembre de 2019** a las **14:00 horas**.

Sin otro particular por el momento, me despido de usted reiterándole la seguridad de mi consideración distinguida.

**Atentamente**

"Pensar bien, para vivir mejor"  
H. Puebla de Z., a 15 de noviembre de 2019

Dr. Salvador Galicia Isasmendi  
Director  
Facultad de Ciencias Biológicas



C.c.p. Archivo  
D'SGI/aoav

Facultad de  
Ciencias Biológicas

Edif. 1 BIO 1, Ciudad Universitaria,  
Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00  
Ext. 7087, 7085, 7084 y 7086

*“Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”.*

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo está dedicado principalmente a mis padres, gracias por brindarme su apoyo, amor y por cada una de sus palabras que me guiarán durante toda mi vida. Este logro es en gran parte de ustedes también.

A mi abuela Gloria, gracias por siempre estar conmigo, cuidarme, escucharme y darme consejos cuando los necesitaba.

A mi asesor de tesis por brindarme la oportunidad de integrarme a su equipo de laboratorio y haberme permitido el desarrollo de esta tesis bajo su tutela, por cada detalle y momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera.

A mis revisores: la Dra. María Cristina González Vázquez y la Mtra. Elda Carreón Moreno, gracias por el asesoramiento otorgado.

A mis compañeros de laboratorio, Fabri, Alex, Ruth, Pily, Cesar y en especial a Alexis, gracias por todas las risas, momentos de estrés y por brindarme su apoyo.

A Aylin, gracias por ser mi amiga durante casi 15 años, has estado en todos los momentos más importantes de mi vida y espero que así siga siendo, gracias, por tanto.

A los mejores amigos que pude encontrar en la universidad, Alexis, Ricardo y Ana, sin ustedes toda esta etapa hubiera sido un tanto aburrida, gracias por todo, los quiero muchísimo.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla gracias por haberme permitido formarme personal y profesionalmente, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, fueron ustedes los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se verá reflejado en la culminación de mi paso por la universidad.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla por otorgarme la BECAS–TESIS CONCYTEP 2019.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por permitirme participar en el programa “Haciendo ciencia en la BUAP 2018”.

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento, que cada investigación, proceso, y proyectos que se realizaron dentro de esta, los disfruté mucho, gracias por todos los conocimientos que me has dejado.

**A mis padres:**

Gloria Soto Suárez y Aldo I. Gutiérrez Vargas

## ABREVIATURAS

Abreviatura	significado
°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ANOVA	Análisis de Varianza
ARN	Ácido ribonucleico
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/Nitroazul de tetrazolio
BSA	Albúmina de Suero Bovina
BET	Bromuro de Etidio
CB	Cuerpo celular
CBP	Péptido de unión a calmodulina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
cGMP	Buenas prácticas de fabricación actuales
CYD	Péptido NorpD covalente pero dissociable
Cm	Cloranfenicol
CTL	Linfocitos T citotóxicos
CRA	Antígeno Recombinante Repetitivo T Citotóxico
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
ESP	Productos secretores excretores
GST	Glutación-S-transferasa
F	Flagelo
FP	bolsillo flagelar
FRA	Antígeno Repetitivo Flagelar
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HPC	Cadena pesada de proteína C
HRP	Peroxidasa de rábano
IF	Forma indeterminada
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
K	Cinetoplasto
Kb	kilobase
KDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramos
LB	Luria Bertani
mL	Mililitro
M	Molar
MBP	Proteína de unión a maltosa
mg	miligramos
mM	Milimolar

<b>MPM</b>	Marcador de Peso Molecular
<b>N</b>	Núcleo
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>Ni-NTA-agarosa</b>	Níquel-Ácido Nitrotriacético-Agarosa
<b>NTD</b>	Enfermedades Tropicales Desatendidas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONU</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>PBS</b>	Buffer salino de fosfatos
<b>PBS-T</b>	Buffer salino de fosfatos-Tween 20
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>PFR</b>	Proteínas de Barra Paraflagelar Recombinante
<b>PGA</b>	D-2-fosfoglicerato
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>pRSETB</b>	Plásmido pRSETB
<b>pRSETB::TcENO</b>	Plásmido pRSETB que expresa a la enolasa de <i>T. cruzi</i>
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
<b>r-Pfen</b>	<i>P. falciparum</i> enolasa
<b>R<sup>2</sup></b>	coeficiente de correlación
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>rTcENO</b>	Enolasa recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>SDS</b>	Sodesilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodesilsulfato sódico
<b>SS</b>	Secretaria de Salud
<b>STR</b>	Estreptavidina
<b>TcENO</b>	Enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TESA</b>	Excretado de Tripomastigote/ antígenos secretados
<b>Th1</b>	Linfocitos T auxiliares 1
<b>Th2</b>	Linfocitos T auxiliares 2
<b>TMB</b>	3,3', 5,5'-tetrametilbencidina
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>V</b>	Volts
<b>Eno1</b>	α-enolasa
<b>Eno2</b>	γ-enolasa
<b>Eno3</b>	β-enolasa
<b>μg</b>	Microgramo
<b>μL</b>	Microlitro

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	4
ABREVIATURAS .....	7
INDICE DE GRAFICAS.....	11
INDICE DE ILUSTRACIONES .....	11
RESUMEN.....	13
1.1 Enfermedad de Chagas .....	14
1.2 Epidemiología.....	15
1.3 Vector de transmisión .....	21
1.4 Transmisión no vectorial .....	24
1.3 Agente etiológico, <i>T. cruzi</i> .....	26
1.4 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	27
1.5 Etapas de la enfermedad de Chagas .....	28
1.6 Diagnóstico .....	29
1.7 Tratamiento .....	30
1.8 Necesidad de una vacuna.....	31
1.9 Enolasa como inmunógeno. ....	32
1.10 Vía de administración, subcutánea.....	37
1.10.1 Factores que influyen en la absorción de fármacos por vía subcutánea..	37
1.10.2 Ventajas y desventajas .....	38
ANTECEDENTES GENERALES.....	39
2.1 Antecedentes directos.....	40
2.2 Justificación.....	43
2.3 Hipótesis .....	44
2.4 Objetivo general.....	44
2.5 Objetivos específicos .....	44
DISEÑO METODOLÓGICO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	45
3.1 Diseño experimental .....	45
3.2 Extracción de plásmido pRSETB::TcENO .....	46
3.3 Células competentes .....	46
3.4 Transformación.....	47
3.5 Inducción de rTcENO.....	47
3.6 Sonicación de las células bacterianas .....	47

3.7 Purificación de la proteína.....	48
3.8 Diálisis.....	48
3.8 Precipitación de la proteína.....	48
3.9 Western Blot.....	48
3.10 Cuantificación de la proteína rTcENO por el método de Bradford.....	49
3.11 Inmunización por vía subcutánea.....	49
3.12 Análisis de interacción del extracto total de <i>T. cruzi</i> con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO.....	50
3.13 Cuantificación de anticuerpos policlonales.....	51
3.14 Determinación del isotipo de inmunoglobulina.....	51
3.15 Análisis estadístico.....	52
RESULTADOS.....	52
4.1 Extracción de plásmido pRSETB::TcENO.....	52
4.2 Expresión, purificación y obtención de la rTcENO.....	53
4.3 Cuantificación de la rTcENO.....	55
4.4 Protocolo de inmunización y sangrado de los ratones.....	56
4.5 Análisis de interacción del extracto total de <i>T. cruzi</i> con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO y títulos de anticuerpos policlonales.....	59
4.6 Cuantificación de anticuerpos policlonales.....	60
4.7 Determinación del isotipo de inmunoglobulina.....	61
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	64
CONCLUSIONES.....	74
PERSPECTIVAS.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS.....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Objetivo, estrategias y líneas de acción para controlar la transmisión vectorial intradomiciliaria	23
2	Tratamiento de la enfermedad de Chagas según la fase de la enfermedad.	31
3	Esquema de inmunización por vía subcutánea	50
4	Concentraciones obtenidas de la rTcENO.	56
5	Cuantificación de anticuerpos policlonales mediante ELISA	61
6	Evaluación de isotipos de inmunoglobulinas de los sueros preinmunes, controles negativos y sueros obtenidos de la inmunización de rTcENO	62
7	Hipótesis nula e hipótesis alternativa.	62
8	Análisis de varianza	62
9	Medias de los grupos hiperinmune, preinmune y blanco.	63
10	Comparación de las tecnologías de etiquetas afinidad.	67

## INDICE DE GRAFICAS

Gráfica	Título	Página
1	Curva patrón de BSA.	56
2	Títulos de anticuerpos totales.	61
3	Evaluación de los isotipos de los anticuerpos.	63
4	Método Tukey de los isotipos de inmunoglobulina de los sueros preinmunes, controles negativos y sueros obtenidos de la inmunización de rTcENO.	64

## INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración	Título	Página
1	Carlos Justiano Ribeira das Chagas	14
2	Distribución mundial de casos de la enfermedad de Chagas	16
3	Estados con notificación de casos enfermedad de Chagas. México, 2009–2013.	18
4	Perfil epidemiológico de Enfermedad de Chagas en México, 2000 – 2017.	18
5	Defunciones por Enfermedad de Chagas según año de ocurrencia. México 2000–2016.	18

<b>6</b>	Distribución de hemípteros en México	21
<b>7</b>	Las diferentes etapas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	27
<b>8</b>	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	28
<b>9</b>	Estructura cristalina de la enolasa de <i>T. cruzi</i> .	34
<b>10</b>	Vía de administración subcutánea.	37
<b>11</b>	Vector de expresión pRSET-B rTcENO.	42
<b>12</b>	Electroforesis de Agarosa al 1%.	53
<b>13</b>	Trasformación de las células competentes <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS::rTcENO.	53
<b>14</b>	SDS-PAGE de la purificación de rTcENO.	54
<b>15</b>	Western Blot de la purificación de rTcENO.	55
<b>16</b>	Vía de administración subcutánea en ratón	58
<b>17</b>	Inmunización por vía subcutánea en ratón BALB/C hembra.	58
<b>18</b>	Punción cardiaca en ratón BALB/C hembra.	59
<b>19</b>	Western Blot, interacción del extracto total de <i>T. cruzi</i> con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO y títulos de anticuerpos policlonales.	60
<b>20</b>	Mecanismo inmunológico de la rTcENO	73

## RESUMEN

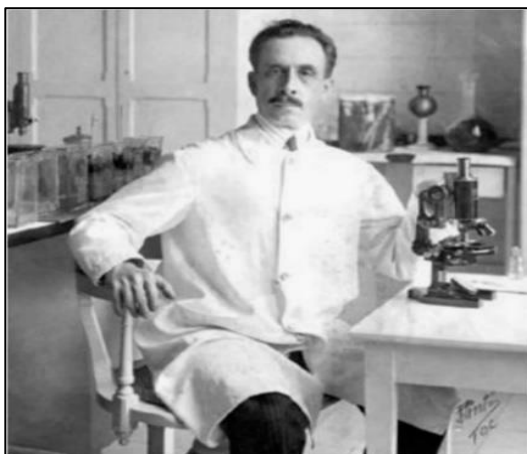
La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical olvidada, se estima que en el mundo hay entre 7 y 8 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, la mayoría de ellas proceden de América Latina. Debido a que la enfermedad puede ser asintomática tanto en la fase aguda como crónica, muchas personas pueden estar infectadas y no saberlo, ya que se necesita un diagnóstico específico como la observación de tripomastigotes circulantes en sangre periférica mediante microscopia, método serológico o qPCR. Existen solo 2 medicamentos para tratarla enfermedad, el benznidazol y el nifurtimox; sin embargo, estos medicamentos solo actúan en la etapa aguda y son altamente hepatotóxicos. Por tal motivo es necesario buscar nuevas alternativas en contra de *T. cruzi*. Una de ellas podría ser el uso de vacunas, actualmente no existe ninguna, la cual permita erradicar o prevenir la parasitosis. Mediante ensayos bioinformáticos, se demostró que la proteína recombinante enolasa de *T. cruzi* (rTcENO) presenta en su secuencia de epítopes, los cuales podrían ser reconocidos por los linfocitos B y T citotóxicos. Por lo tanto, la evaluación inmunológica de rTcENO por vía subcutánea en un modelo murino es de importancia con la finalidad de desarrollar una vacuna protectora contra la enfermedad de Chagas. Se estableció un esquema de inmunización de 4 dosis por vía subcutánea. Al realizar los inmunoensayos se obtuvieron títulos de anticuerpos totales de 1:20,000 y al realizar la isotipificación, se obtuvo un predominio de IgG1>IgG2a>IgG3>IgA>IgG2b>IgM. Estos resultados fueron examinados por un análisis estadístico de ANOVA/tukey, confirmando que los datos son estadísticamente significativos. En conclusión, la inmunización de la rTcENO por vía subcutánea genera una adecuada respuesta inmune por lo que se puede considerar como un inmunógeno con potencial para generar una vacuna contra *T. cruzi*.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o también llamada tripanosomiasis americana es una infección parasitaria causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, un organismo flagelado transmitido principalmente a humanos mediante las heces infectadas de insectos hematófagos (vector de transmisión en áreas endémicas) o mediante la transfusión de sangre infectada, donaciones de órganos infectados, transmisión de una madre infectada a su hijo a través del parto (Carabarin et al., 2013).

El 14 de abril de 1909, el investigador brasileño Carlos Justiano Ribeira das Chagas (ilustración 1) es el primero en describir la enfermedad de Chagas al observar un parásito flagelado (una nueva especie de *Trypanosoma*) en la sangre de una niña llamada Berenice de tres años de la localidad de Lassance, cerca del río Das Velhas en Brasil. Comprobando su teoría de que este parásito, era el mismo que se encontraba en los intestinos de un insecto del género *Triatoma*, muy común en esa región (Lewinsohn, 1979).



**Ilustración 1 Carlos Justiano Ribeira das Chagas.** Laboratorio del Instituto Federal de Seroterapia en Manguinhos, Río de Janeiro (Steverding, 2014).

Sin embargo, fue hasta 1912 que el parasitólogo francés Alexandre Joseph Émile Brumpt proporcionó evidencia clara de que la infección no se produce por inoculación sino por contaminación de la herida por la picadura de la chinche, dejando así sus heces que contienen a los parásitos (Steverding, 2004).

El parásito *Trypanosoma cruzi* fue nombrado en honor al Dr. Oswaldo Cruz, epidemiólogo brasileño y mentor de Carlos Chagas. El Dr. Cruz se distinguió por haber erradicado la Fiebre Amarilla en Río de Janeiro y otras ciudades importantes del Brasil, mediante la eliminación del insecto vector *Aedes egyptti* y el aislamiento de los enfermos, así como ser director del instituto Oswaldo Cruz que se creó como consecuencia de la epidemia de peste bubónica que asoló la ciudad de Santos en 1883 (Telleria & Tibayrenc, 2017).

En 1959 se cumplió el cincuentenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, en el cual se realizó un congreso internacional en conmemoración que se llevó a cabo en Río de Janeiro. En este se trataron de confirmar tres aspectos fundamentales:

- 1) La transmisión congénita de la enfermedad.
- 2) La confirmación de los "megascistos" como de etiología chagásica en gran proporción.
- 3) La aceptación de la concepción patogénica de F. Kóberle (Uriarte, 2012).

De manera reciente, la Organización Mundial de Salud (OMS) declara el 14 de abril, el día mundial de la enfermedad de Chagas en conmemoración de su descubrimiento por el investigador Carlos Ribeira Chagas. (OMS, 2019).

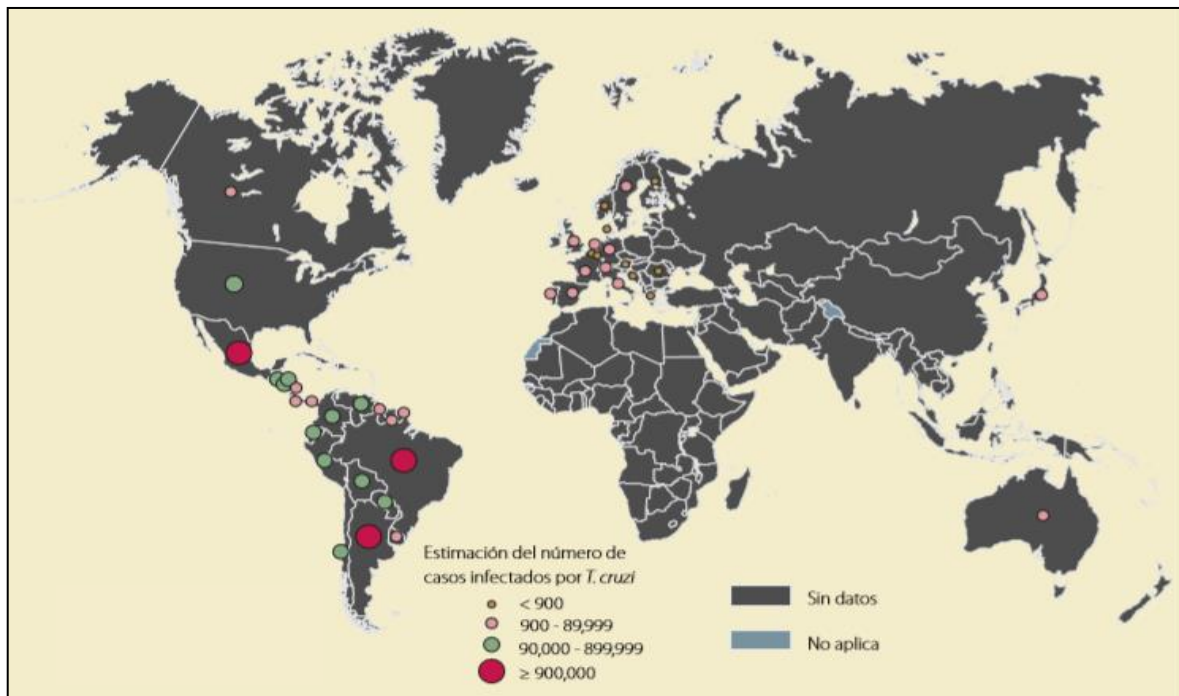
## **1.2 Epidemiología**

Se estima que en el mundo hay entre 7 y 8 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, la mayoría de ellas en América Latina (WHO, 2017). La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América Latina abarcando desde los estados del sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile (ilustración 2). Esta enfermedad, tradicionalmente se ha limitado a las zonas rurales pobres de América Central y del Sur, donde la transmisión vectorial es la principal vía de contagio. Los residentes de casas infestadas están continuamente

expuestos a los vectores, y la incidencia de infección por *T. cruzi* es de menos de 0.1% a 4% por año en regiones hiperendémicas como el Chaco boliviano.

La migración interna reciente de áreas rurales a urbanas, la transmisión congénita y la donación de sangre han permitido que la enfermedad se propague a regiones previamente no afectadas, principalmente grandes áreas urbanas, donde podrían establecerse ciclos de enfermedades urbanas en áreas periféricas (Pérez & Molina, 2017).

De acuerdo con las estadísticas proporcionadas en el trabajo de Pérez y Molina, la prevalencia de infección por *T. cruzi* es más alta en Bolivia (6.1 casos por cada 100 habitantes), Argentina (3.6 por cada 100 habitantes), Paraguay (2.1 cada 100 habitantes), Ecuador (1.4 cada 100 habitantes), El Salvador (1.3 cada 100 habitantes), Guatemala (1.2 cada 100 habitantes) y México (0.70 cada 100 mil habitantes). En Estados Unidos, la transmisión de *T. cruzi* se establece en áreas seleccionadas de algunos estados del sur, aunque solo se han reportado algunas infecciones autóctonas (Pérez & Molina, 2017; Rojo et al., 2018).



**Ilustración 2 Distribución mundial de casos de la enfermedad de Chagas.** Recuperado de: (Salazar et al., 2016).

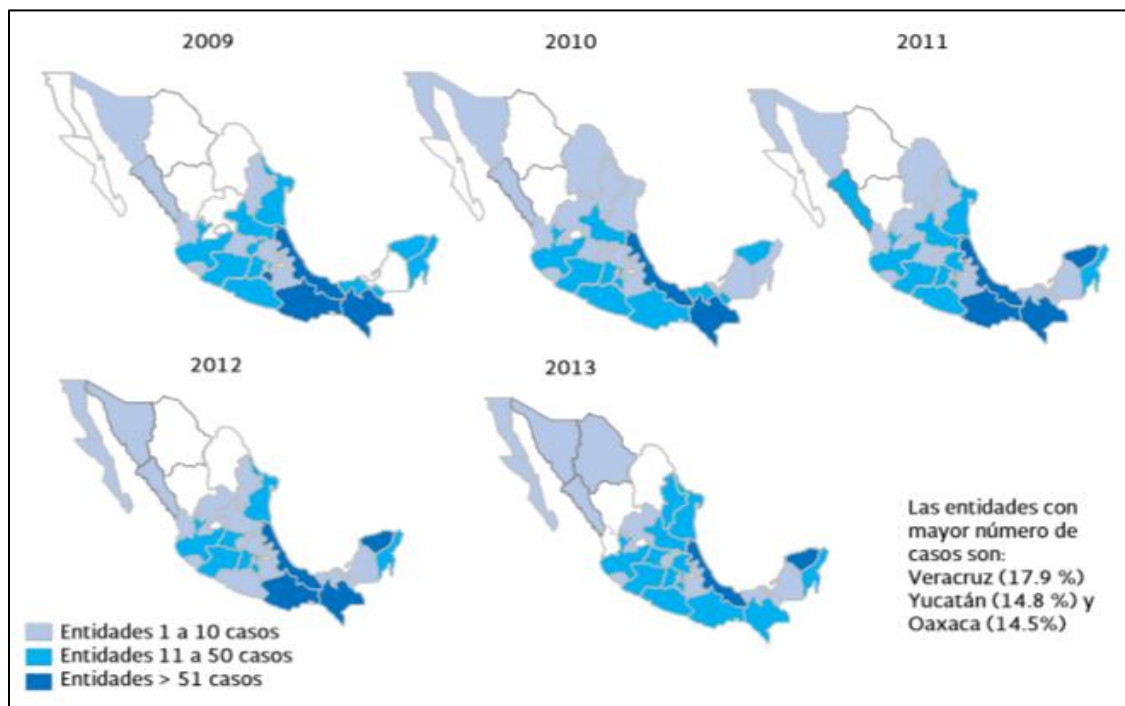
México presenta 18 áreas endémicas en el sur para la transmisión vectorial de *T. cruzi* (ilustración 3), incluyendo los estados de Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Morelos (Dumonteil, 1999), siendo los primeros 5 estados los más afectados respectivamente, ya que su prevalencia excede al 10% (Dumonteil, 1999). Sin embargo, la transmisión de *T. cruzi* ha ido en aumento debido a la migración de áreas rurales a las áreas urbanas (Monteon-Padilla et al., 1999).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), en 2006, estimó que en México existían aproximadamente 1,100,000 individuos infectados y 29,500,000 en riesgo de contraer la infección (OPS, 2006); en el periodo comprendido de 2000 a 2012 (Salazar et al., 2016). Por otro lado, el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) en 2010 reporta el censo nacional, afirmando que en México hay una población de 112.3 millones de personas y basado en el porcentaje de seropositividad publicado por Cruz-Reyes y Pickering-López (2006) se calcula que 5.5 millones de personas estarían potencialmente afectadas por esa enfermedad (Cruz y Pickering, 2006).

La Secretaría de Salud (SS) registró 5,559 casos (cifras proporcionadas por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades) principalmente entre los 25 y 44 años, los estados con mayor incidencia fueron Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco, en 2013 con 762 nuevos casos y 729 en 2014, las defunciones registradas fueron 371, la mayoría en los estados de Oaxaca (54.7%) y Guerrero (15.4%) (ilustración 3) (Salazar et al., 2016). En México, en dos terceras partes del territorio, existen las condiciones para que se lleve a cabo la transmisión vectorial con 32 especies de triatominos. (Carabarin et al., 2013). Las poblaciones vectoriales, por su capacidad de convivencia con el humano, se consideran domiciliadas, peridomiciliadas y selváticas o silvestres (Tay et al., 1981).

En México, las especies intradomiciliadas son *Triatoma barberi*, que son asociadas a la presencia de miocardiopatías y megadilataciones de órganos del tracto digestivo en Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán,

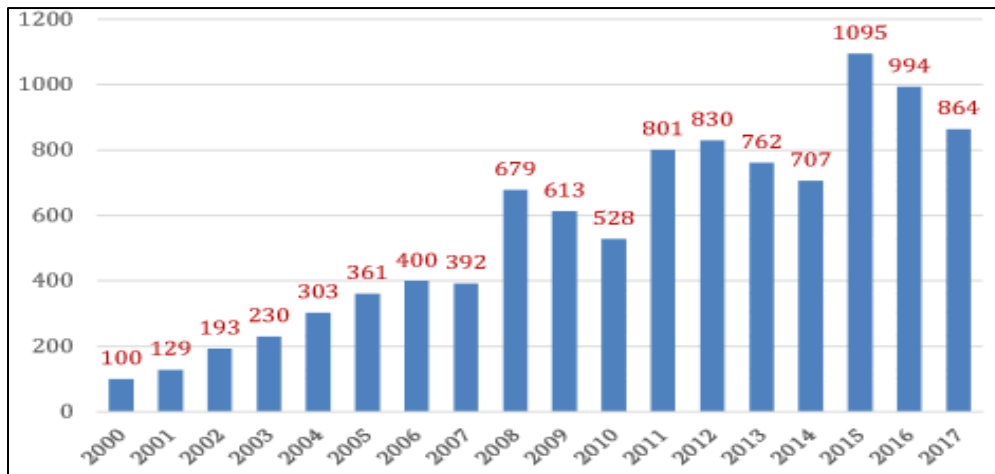
Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz. Por otro lado, *Triatoma dimidiata* está distribuida desde los países andinos y de Centroamérica hasta México, asociada a cardiopatías en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Tay et al.,1981; Salazar et al., 2010)



**Ilustración 3. Estados con notificación de casos enfermedad de Chagas. México, 2009–2013.** Recuperado en: Secretaría de Salud, 2018).

La Secretaría de Salud reporta desde el 2000 un incremento en la notificación de casos (ilustración 4). En el período que comprende del año 2000 al 2017 se registraron 9,981 casos de la Enfermedad de Chagas (agudos y crónicos); mientras que en 2017 el reporte del cierre informa de 126 casos agudos y 738 casos crónicos que fueron notificados a través del Boletín Epidemiológico de la Dirección General de Epidemiología. De manera general, el grupo etario y género más afectado comprende de 25 a 44 años, mayoritariamente a varones. Los estados con mayor número de casos reportados fueron Veracruz (17.8 %), Yucatán (10.3 %), Oaxaca (10.5 %), Morelos (9.2 %), Chiapas (8.1 %), Jalisco (5.9 %), Estado de México (5.2 %). Sin embargo, la problemática es mayor debido a

que los datos reportados se encuentran subestimados, esto por las características de la enfermedad en la fase aguda, en la cual no hay una sintomatología clásica y las personas infectadas pueden morir o no ser diagnosticadas adecuadamente (Secretaría de Salud, 2019).



**Ilustración 4 Perfil epidemiológico de Enfermedad de Chagas en México, 2000 – 2017.** Recuperado de: (Secretaría de Salud, 2019).

La mortalidad registrada de la enfermedad de Chagas del 2000 al 2016 (ilustración 5) fue de 487 decesos en dieciocho entidades del país; la mayoría principalmente en el estado de Oaxaca, seguido de Guerrero y Veracruz (Secretaría de Salud, 2019).



**Ilustración 5 Defunciones por Enfermedad de Chagas según año de ocurrencia. México 2000–2016.** Recuperado de: (secretaría de Salud, 2019).

En Puebla la presencia de Chagas se determinó mediante un estudio confirmando 71 casos clínicos positivos a *T. cruzi*, en un área endémica de la enfermedad de Chagas con seroprevalencia de 7.7%. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se realizó mediante dos pruebas serológicas estandarizadas (ELISA, IHA) (Sánchez-Guillén, 2006).

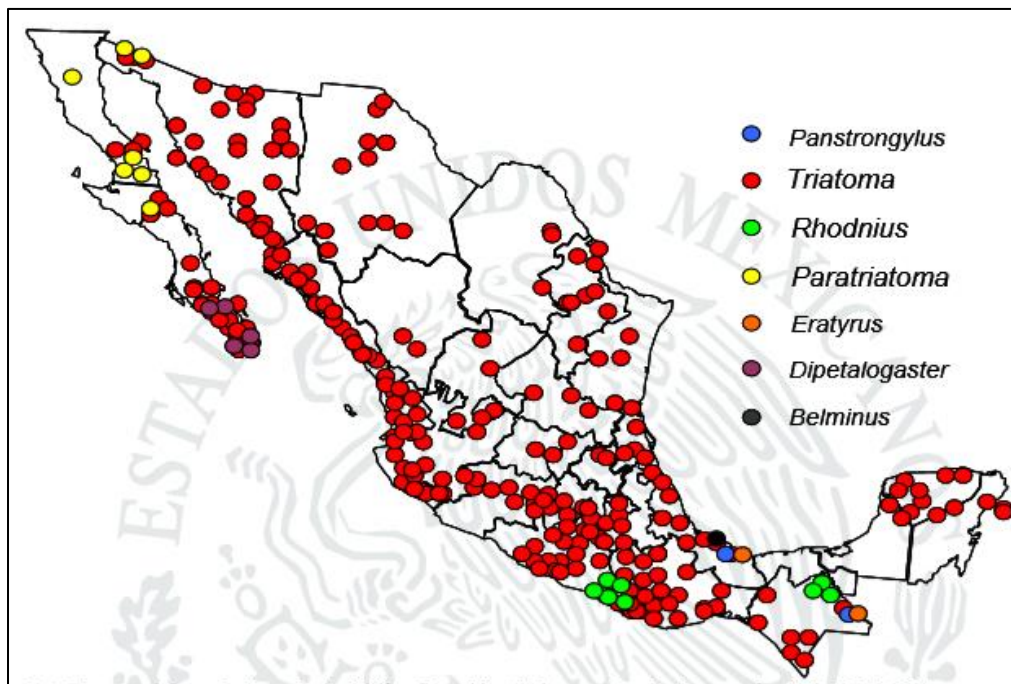
Los grupos se identificaron como individuos asintomáticos de forma indeterminada (IF) sin evidencia de anomalías presentando 34 casos; aquellos con alteraciones gastrointestinales (12 pacientes), pacientes con manifestaciones clínicas y cambios documentados de enfermedad cardíaca de Chagas que se subdividió de la siguiente manera: leve (8 pacientes) cambios electrocardiográficos leves de repolarización ventricular, bradicardia sinusal); moderado (6 pacientes) bloqueo de rama izquierda, paquete derecho bloqueo de rama asociado con bloqueo fascicular anterior izquierdo); severos (8 pacientes) signos de cardiomegalia, dilatados cardiomiopatía); y la forma asociada (3 casos) que incluía la presencia tanto de miocardiopatía como megaesófago (Sánchez-Guillén, 2006). Estas manifestaciones clínicas son prácticamente inmovilizantes; así el paciente infectado, y en la forma crónica de la enfermedad, no tiene la capacidad física para desarrollar un trabajo y esto resulta en una carga económica para la familia y para los organismos de salud, así como al estado. Por lo tanto, el tener una vacuna que prevenga la enfermedad será de gran beneficio para la sociedad (Sánchez-Guillén, 2006).

En suma, la situación actual de la enfermedad de Chagas en México es la de un padecimiento sub-registrado, distribuido prácticamente en todo el territorio nacional y que por la falta de mejoras en el diagnóstico, disponibilidad de medicamento y el registro de casos, cada año revela una magnitud creciente, donde la mayor proporción de enfermos se encuentran en la fase clínica aguda asintomática por haber estado en contacto con el agente sin desarrollar enfermedad aparente y para el que se deberá mejorar el seguimiento clínico, epidemiológico, de laboratorio y gabinete; es un padecimiento cuyo riesgo de transmisión por la vía transfusional, va en descenso pero que pudiera verse

incrementado por vía congénita y del que no tenemos información de infecciones por vía alimentaria, y es un padecimiento que mantiene tasa de mortalidad baja y estable en los últimos trece años (Secretaría de salud, 2018).

### 1.3 Vector de transmisión

Actualmente, se sabe que 40 especies de triatominos están infectadas naturalmente por *T. cruzi* en América del Norte. Los triatominos pertenecientes a los géneros: *Rhodnius* (*R. prolixus*), *Triatoma* (*T. infestans*) y *Panstrongylus* (*P. megistus*) son los más importantes desde el punto de vista epidemiológico (Carabarin et al., 2013). Veintiocho especies se encuentran exclusivamente en México, y 8 se comparten con los Estados Unidos (ilustración 6) (Ibarra-Cerdena et al., 2009).



**Ilustración 6 Distribución de hemípteros en México.** Recuperado en: (secretaría de Salud, 2014).

En México, se cree que más del 96% de la transmisión de la enfermedad ocurre a través de la ruta del vector (Ramsey et al., 2003). México alberga una de las poblaciones de triatominos más diversas, con 39 especies documentadas en el país, al menos 21 de las cuales han sido infectadas por *T. cruzi*, lo que indica que

son vectores potenciales de la enfermedad de Chagas (Bargues et al., 2008; Cruz-Reyes y Pickering-Lopez, 2006).

Recientemente, diferentes informes han revelado información sobre los principales vectores en áreas endémicas de México. En el estado de Veracruz, los principales vectores reconocidos son *Triatoma dimidiata* y *R. prolixus*, y solo se ha identificado *T. dimidiata* en el estado de Chiapas. Sin embargo, *Triatoma phyllosoma* se ha informado solo en el estado de Oaxaca y se considera el vector de transmisión más importante de la enfermedad de Chagas en la parte sur de este estado (Villalobos et al., 2011; Zárata y Zárata, 1985).

En el estudio “”se identificó dos especies de *Triatoma* en la región sur del Estado de México: *Triatoma pallidipennis* (97.4%) y *T. dimidiata* (2.6%), de estos, el 28.94% de los triatominos estaban infectados con *T. cruzi* (Medina-Torres et al. al., 2010).

En otro estudio, *T. barberi*, *T. dimidiata* y *Triatoma mexicana* se identificaron en tres regiones del estado de Hidalgo, con una tasa de infección por *T. cruzi* que oscila entre 6% y 10.3% (Becerril-Flores et al., 2007). En cambio, *T. pallidipennis* fue la única especie encontrada en el Valle de Iguala del estado de Guerrero, donde el 38.2% de los triatominos recolectados estaban infectados con *T. cruzi*. El mayor porcentaje de triatominos infectados se observó en las zonas rurales en comparación con las zonas urbanas (Becerril-Flores y Valle-De La Cruz, 2003). Además, *T. mexicana*, *Triatoma longipennis*, *T. pallidipennis* y *T. barberi* fueron las principales especies recolectadas entre 1998 y 2002 en varias comunidades del estado de Guanajuato, que no se considera un área endémica (López-Cárdenas et al., 2005). Por último, *T. pallidipennis*, *T. barberi*, *Triatoma picturata* y *T. dimidiata* se identificaron en el estado de Puebla en 2006 con tasas de infección por *T. cruzi* del 75%, 50%, 41% y 37%, respectivamente (Romero-Cabello et al, 2006).

México cuenta con el programa “Prevención y control de la enfermedad de Chagas 2013-2018”, en el cual uno de los objetivos es controlar la transmisión vectorial intradomiciliaria por medio de estrategias (tabla 1) (Secretaría de Salud, 2018).

Controlar la transmisión vectorial intradomiciliaria			
	Estrategia 1	Estrategia 2	Estrategia 3
<b>Líneas de acción</b>	Realizar serologías a menores de 5 años.	Promover programas de mejora con materiales locales en paredes y techo.	Aplicar rociado residual de forma intra domiciliar, en dos ocasiones por localidad confirmada como positiva.
	Seleccionar áreas prioritarias de intervención.	Eliminar sitios de refugio de triatominos intradomiciliarios y en peridomicilios	Realizar encuestas entomológicas iniciales y posteriores al rociado residual intradomiciliar
	Actualizar el catálogo de distribución de triatominos en áreas prioritarias	Promover la instalación de pabellones mosquiteros en camas o en cualquier otro sitio de reposo	

**Tabla 1** Objetivo, estrategias y líneas de acción para controlar la transmisión vectorial intradomiciliaria. *Prevención y control de la Enfermedad de Chagas 2013-2018 (Secretaría de Salud, 2018).*

El uso de insecticidas en viviendas y sus alrededores ha disminuido el vector transmisión de *T. cruzi*; sin embargo, estos esfuerzos no han sido suficientes porque la enfermedad no se ha controlado en áreas con ciclos domiciliados (Dias y Schofield, 1999). Las desventajas en la aplicación de insecticidas incluyen los costos operativos resultantes de la aplicación constante en las casas de áreas endémicas, y aunque, el uso de insecticidas ha reducido las poblaciones de triatominos en los hogares en algunas regiones, esto no ha impedido la movilidad continua de los vectores entre áreas silvestres y domésticas con la consiguiente reinfestación de los edificios tratados con pesticidas (Vassena et al., 2000; Ramsey et al., 2003) o la aparición de poblaciones de triatominos resistentes a productos químicos (Zerba, 1999). Otro inconveniente es el daño causado a

muchas otras especies de insectos que deben protegerse mediante estrategias dirigidas específicamente contra especies dañinas. En México, el control de la transmisión vectorial todavía está en las etapas iniciales (Coura y Viñas, 2010).

#### **1.4 Transmisión no vectorial**

Tanto en áreas endémicas como no endémicas, la transmisión puede ocurrir mediante trasplante de órganos, transfusión de sangre, transmisión congénita, vía oral o como resultado de un accidente de laboratorio (Dias, 2000).

En la transmisión no vectorial, la transfusión de sangre y la enfermedad congénita de Chagas han resurgido como dos factores muy importantes para la transmisión en áreas no endémicas. Estos métodos de transmisión no vectoriales son los más problemáticos en las zonas urbanizadas. (Gutiérrez et al., 2009).

La prevalencia de la enfermedad de Chagas en los bancos de sangre se ha observado en varios países de América Latina, como Argentina (4.9–17.6%), Bolivia (51%), Brasil (2.9–14.6%), Chile (3.7–14.5%), Honduras (11.6%), Paraguay (11.3%), Uruguay (4.7–7.7%), Venezuela (1.3%), Colombia (2.5–7.5%), Costa Rica (1.6%), Ecuador (3.2%) y Perú (12.9%) (Moncayo, 2003).

Según las estimaciones realizadas por Petherick, en México existen 69,000 nuevas infecciones anualmente, y solo el 30% de la sangre donada se analiza antes de la transfusión (Petherick, 2010).

Algunos esfuerzos para controlar la propagación de la enfermedad de Chagas a través de la transfusión de sangre están en curso. De acuerdo con la regulación oficial de donación de sangre se debe realizar obligatoriamente una prueba para la enfermedad de Chagas a todos los donantes y este requisito está incluido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-003-SSA2-1993) "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos" Sin embargo, la prueba solo se realizaba en donantes de sangre con antecedentes de residencia u origen en áreas endémicas de *T. cruzi* (Carabarin et al., 2013). Afortunadamente, esta norma se actualizó y quedó como la NORMA Oficial Mexicana NOM-253-

SSA1-2012 donde se establece incluir obligatoriamente la detección de *Trypanosoma cruzi* en todos los donantes de sangre.

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas actualmente tiene efectos epidemiológicos de importancia porque es parcialmente responsable de la diseminación de la enfermedad en áreas no endémicas en todo el mundo. De acuerdo con la estimación de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) hay más de 15,000 casos por año de infección congénita por *T. cruzi* en América Latina (OPS, 2006).

En México, hay exámenes de rutina de mujeres embarazadas; sin embargo, una prueba de la enfermedad de Chagas no está incluida en ese examen. En este caso, el Ministerio de Salud y los laboratorios clínicos deben estudiar y evaluar la incorporación de una prueba de la enfermedad de Chagas. Estos estudios confirman el riesgo potencial de transmisión de la enfermedad de Chagas por formas no vectoriales en áreas no endémicas, lo que demuestra que la transmisión congénita y la transfusión de sangre son formas importantes de propagación de la enfermedad de Chagas, lo que representa un grave problema de salud (Carabarin et al. 2013).

Otra vía de transmisión es la oral que se presenta por contaminación de alimentos o bebidas con deyecciones o trituración de vectores infectados. Actualmente no se han reportado casos de transmisión por esta vía en México, sin embargo, se han descrito brotes importantes con período de incubación de 3 a 22 días desde el año 2005 en Brasil, Venezuela y Bolivia (Shikanai-Carvalho, 2012; Hotez et al., 2013).

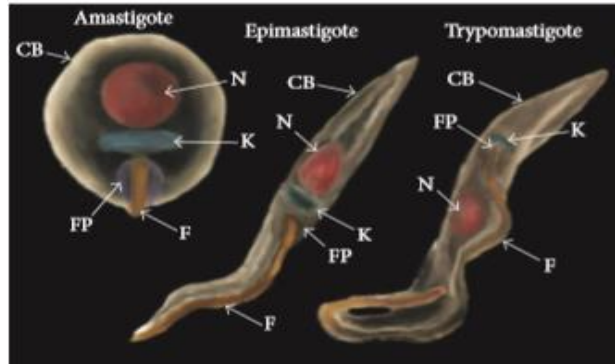
Recientemente se ha discutido otra vía de transmisión no vectorial, se sugiere que *T. cruzi* puede propagarse por transmisión sexual (Chagas, 1909; Vianna, 1911). Los estudios experimentales en animales de laboratorio revelaron la presencia de nidos de amastigotes de *T. cruzi* en los tubos seminíferos, el epidídimo y el conducto deferente, así como en las células de útero, trompas y ovario de ratones con infección aguda (Carvalho et al.2009). Curiosamente, el ciclo de vida de *T. cruzi* se observó en la eyaculación de un ratón chagásico. También se observó la

transmisión sexual de los parásitos de ratones infectados con *T. cruzi* a receptores sin tratamiento previo (Alencar et al. 1991). Además, la amplificación del ADN del parásito de las células de la línea germinal de los huéspedes humanos infectados y sus descendientes indican que las infecciones por *T. cruzi* pueden transmitirse sexualmente (Hecht et al. 2010).

En otro estudio realizado por Araujo y colaboradores se determinó si *T. cruzi* puede transmitirse sexualmente en humanos analizaron cuatro familias con enfermedad de Chagas aguda. Se obtuvieron células mononucleares de sangre y muestras de suero de cada sujeto de estudio una vez al año durante tres años consecutivos. El ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y los exámenes serológicos de inmunofluorescencia indirecta se utilizaron para detectar anticuerpos específicos contra *T. cruzi*. Además, la reacción en cadena de la polimerasa del ADN de *T. cruzi* reveló bandas de 188 nucleótidos, que se hibridaron con una sonda radiomarcada específica y se confirmaron mediante clonación y secuenciación. Por último, se concluyó que las infecciones por *T. cruzi* se pueden transmitir a través del coito. Además, la progenie mostró discrepancias entre las proporciones de huellas de ADN nuclear y anticuerpos específicos que pueden explicarse por la tolerancia alcanzada durante el crecimiento embrionario temprano (Araujo, 2017).

### **1.3 Agente etiológico, *T. cruzi***

*T. cruzi* es un protozoo flagelado el cual presenta varias transformaciones morfológicas dentro de mamíferos e insectos hospedadores, se identifican tres etapas principales de desarrollo: epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes (ilustración 7) (Pech-Canul, 2017).



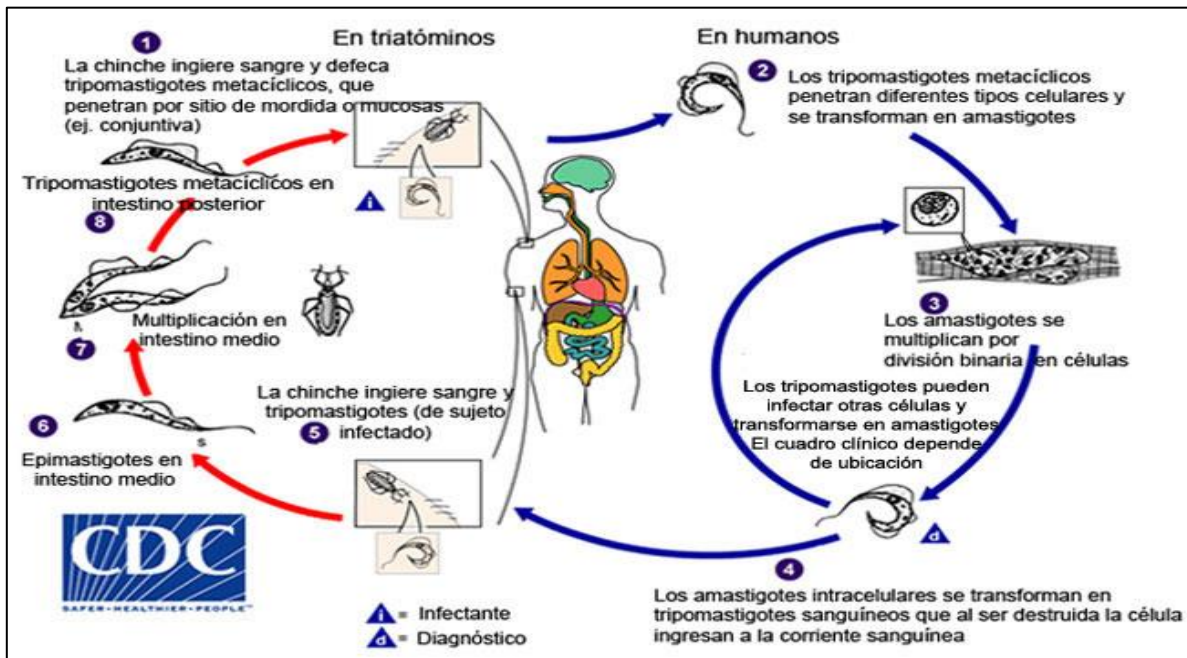
**Ilustración 7** Las diferentes etapas de *Trypanosoma cruzi*. La imagen representaba las etapas de amastigote, epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi* y sus dominios de membrana: núcleo (N), cinetoplasto (K), flagelo (F), bolsillo flagelar (FP) y cuerpo celular (CB). Recuperado en: (Pech-Canul, 2017).

Las etapas de desarrollo de *T. cruzi* alternan entre formas no infecciosas e infecciosas. Los epimastigotes y amastigotes son etapas no infecciosas pero replicativas en el intestino del vector de insectos y dentro de la célula de mamífero, respectivamente. Sin embargo, el tripomastigote es la etapa infecciosa pero no replicativa y se subdivide en otras dos etapas de desarrollo diferentes: los tripomastigotes del torrente sanguíneo; se encuentran en la sangre del huésped vertebrado, y los tripomastigotes metacíclicos; se encuentran en el recto del insecto vector (Souza, 2002; Queiroz et al., 2014; De Souza et al., 2010).

#### 1.4 Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* (ilustración 8) comienza cuando los insectos succionan la sangre del huésped mamífero infectado con los tripomastigotes del torrente sanguíneo, los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el interior de los insectos y se reproducen en el intestino medio. Después estos se transforman en tripomastigotes metacíclicos y se alojan en el intestino posterior del huésped intacto que se eliminan en las heces. La infección generalmente tiene lugar a través de la inoculación directa de tripomastigotes metacíclicos que se forma en la piel lesionada causada por la picadura del vector hematófago. Una vez dentro del huésped mamífero, las formas de tripomastigotes metacíclicos invaden las células hospederas en el sitio de inoculación y se transforman en amastigotes replicativos. Tras completarse el ciclo replicativo como amastigotes intracelulares, se transforman en tripomastigotes del torrente sanguíneo rompiendo la célula

eucariótica del hospedero e infectando a otras células que se encuentren en el torrente sanguíneo (Pech-Canul, 2017).



**Ilustración 8 Ciclo de vida de *T. cruzi*.** Se muestra las diversas formas del protozoo en los hospedadores de invertebrados (triatóminos) y vertebrados (mamíferos) Modificado de: (De Souza et al., 2010).

### 1.5 Etapas de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas se divide en dos fases: la fase aguda y la fase crónica, ambas pueden ser asintomáticas. La fase aguda usualmente es subclínica, muy probablemente porque la carga del parásito es bastante pequeña. La mayoría de los casos agudos son asintomáticos, duran entre 6 y 12 semanas y ocurren en la niñez. La enfermedad presenta una sintomatología general incluyendo: fiebre, dolor de cabeza, dolor en articulaciones y músculos, anorexia, vómito, diarrea, somnolencia, apatía, linfadenopatía, hepatosplenomegalía, edemas y convulsiones, existen síntomas característicos en esta fase los cuales son: inflamación con ulceración en el sitio de inoculación (chagoma) y edema palpebral unilateral (signo de romaña), cuando el vector deyecta en la zona ocular. Esta fase se resuelve espontáneamente de 2 a 4 meses; sin embargo, en algunos casos graves (2-6%) pueden llegar a la muerte lo cual es principalmente debido a miocarditis y meningoencefalitis severas. Su diagnóstico clínico es difícil debido a los hallazgos clínicos heterogéneos y no específicos, lo que sugiere que la

mayoría de los casos agudos no se diagnostican y solo se informan esporádicamente (Carabarin et. al., 2013).

En el caso de la fase crónica se observa en dos formas, una indeterminada, también conocida como latente, y una sintomática. Un alto porcentaje de pacientes con la enfermedad de Chagas permanece en la forma indeterminada durante 10 a 30 años o incluso por toda su vida. Estos pacientes usualmente permanecen asintomáticos, con signos de la enfermedad no clínicos o físicos, pero con una serología positiva. Algunas veces el corazón y el tracto gastrointestinal revelan hallazgos no patológicos cuando se utiliza electrocardiografía, ecocardiografía y/o radiología, pero en otros pacientes, la forma cardiaca temprana de la fase crónica aparece como cambios en el electrocardiograma. Los pacientes asintomáticos solo son diagnosticados por detección de anticuerpos circulantes de *T. cruzi*. Aproximadamente el 30 a 40% de los individuos infectados desarrollan síntomas clínicos, varios años después de la exposición inicial, los cuales se caracterizan por un crecimiento exacerbado de los órganos digestivos (Megacolon y Megaesófago) y del corazón (cardiopatía chagásica crónica) lo que imposibilita a la persona a desarrollar actividades físicas (Carabarin et al., 2013b).

## **1.6 Diagnóstico**

El estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas sigue siendo la microscopía convencional, es decir, la visualización de tripomastigotes circulantes en sangre periférica o frotis de leucocitos, tanto en los casos agudos como en recién nacidos infectados congénitamente. Sin embargo, no es muy sensible y requiere personal altamente capacitado (Freilij y Altcheh, 1995; Gomes, Lorena y Luquetti, 2009).

Otro posible diagnóstico es por medio de un método serológico llamado ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), utilizando fracciones antigénicas de parásitos purificadas bioquímicamente. Entre estos se encuentran: TESA (Trypomastigote Excreted / Secreted Antigens) y F2/3, mucinas de tripomastigotes

altamente O-glicosilados obtenidos por particiones de solventes secuenciales (Balouz et al., 2017).

Un diagnóstico más novedoso es la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) que permite la detección y cuantificación del ADN del parásito a partir de muestras clínicas con niveles variables de confiabilidad, complejidad, selectividad y sensibilidad analítica (Duffy et al., 2013).

## **1.7 Tratamiento**

En la actualidad, existen solo dos medicamentos, benznidazol y nifurtimox, que están autorizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Ambos han sido el pilar del tratamiento parasiticida durante casi 50 años, aunque su perfil de seguridad y eficacia dista mucho de ser ideal (Pérez & Molina, 2017).

El benznidazol (derivado de nitroimidazoles) actúa a través de la unión covalente de compuestos intermedios de nitroreducción a moléculas de parásitos, ADN, lípidos y proteínas. En comparación con el nifurtimox (compuesto de nitrofurano) su mecanismo de acción es a través de la producción de metabolitos de oxígeno reducidos para los cuales los parásitos tienen menor capacidad de desintoxicación, en comparación con las células de vertebrados (Bern, C. 2011).

Dado que la efectividad del tratamiento parece disminuir con el tiempo desde la infección primaria, la detección temprana y la intervención son cruciales. El nifurtimox fue el primer fármaco utilizado y se administra por vía oral en tres a cuatro dosis durante 60 a 90 días. Generalmente se prefiere el benznidazol sobre el nifurtimox debido a su mejor perfil de tolerabilidad, penetración en el tejido y, posiblemente, su eficacia. Se administra por vía oral en dos o tres dosis, generalmente durante 60 días (tabla 2). Se recomiendan dosis más altas de hasta 15 mg/ kg en casos de meningoencefalitis. El benznidazol tiene una actividad considerable durante las fases aguda y temprana de la infección por *T. cruzi*, la curación serológica se alcanza en hasta el 100% de los pacientes con enfermedad

congénita tratados durante el primer año de vida y en el 76% de los pacientes con enfermedad aguda (Pérez & Molina, 2017).

Dado que la persistencia de parasitosis y la inflamación crónica concomitante subyacen a la miocardiopatía chagásica crónica, el tratamiento parasiticida generalmente se ofrece a pacientes con enfermedad de Chagas crónica (tabla 1). A comparación con el tratamiento en la fase aguda, el tratamiento en la fase crónica con beznidazol las tasas de curación son mucho más bajas: de 60 a 93% en niños de hasta 13 años y de 2 a 40% en adultos con enfermedad crónica tardía, aunque estos valores mejoran con un seguimiento más prolongado. Además, los resultados de una revisión sistemática y un metanálisis (Pérez et al., 2009) mostraron que el tratamiento con benznidazol tenía poco beneficio, y que el efecto observado podría ser marginal en comparación con placebo o ningún tratamiento en la fase crónica. En el ensayo BENEFIT, el tratamiento con benznidazol no redujo significativamente el deterioro clínico cardíaco en pacientes con miocardiopatía moderada a severa (Morillo et al., 2015).

Dosis/Medicamento	Nifurtimox		Beznidazol	
	Fase aguda	Fase crónica	Fase aguda	Fase crónica
<b>Niños (menores de 12 años)</b>	15 mg/kg cada 24 horas por 60 días.	8–10 mg/kg cada 24 horas pr 60 a 90 días.	10 mg/kg cada 24 horas por 60 días.	5–7.5 mg/kg 24 horas por 60 días.
<b>Adultos</b>	10-15 mg/kg cada 24 horas por 60 a 90 días.	8–10 mg/kg cada 24 horas pr 60 a 90 días.	5–10 mg/kg cada 24 horas por 60 días.	5–7.5 mg/kg 24 horas por 60 días.

**Tabla 2 Tratamiento de la enfermedad de Chagas según la fase de la enfermedad.** (Pérez & Molina, 2017).

### 1.8 Necesidad de una vacuna

A nivel mundial, las enfermedades tropicales desatendidas (NTD) comprenden 17 infecciones parasitarias crónicas. Es importante destacar que no solo afectan negativamente la salud de las personas infectadas, sino que también mantienen a

las personas en la pobreza, debido a su impacto a largo plazo en el crecimiento infantil y el desarrollo cognitivo, el resultado del embarazo y la productividad laboral (Hotez et al., 2007).

Las vacunas para combatir las NTD también se conocen como "vacunas contra la pobreza" debido a su impacto potencial en el desarrollo económico, además de mejorar la salud (Hotez & Ferris, 2006; Hotez, 2011)

La enfermedad de Chagas se considera una NTD según la ONU, actualmente no existe una vacuna capaz de contrarrestar, ni prevenir la enfermedad y su diseminación en el organismo. Recientemente, se realizan esfuerzos para desarrollar una vacuna efectiva por el Sabin Vaccine Institute PDP y el Texas Children's Center for Vaccine Development en colaboración con los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. y tres instituciones mexicanas, la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), CINVESTAV y Birmex (sector público de México, fabricante de vacunas) (Dumonteil et al., 2004). La vacuna que se ha desarrollado en estas instituciones es una vacuna bivalente que se compone de dos proteínas recombinantes de *T. cruzi* formuladas en aluminio. Se compone de 2 antígenos, el primero es un antígeno único de *T. cruzi* de 24 kDa (Tc24) y el otro pertenece a una familia de transialidasas de superficie de *T. cruzi* (TSA-1) (Zapata et al., 2006; Sánchez et al., 2007; Limón et al., 2010).

La vacuna de Chagas se propone como una vacuna terapéutica para el tratamiento de individuos que han sido infectados con *T. cruzi*. Los grupos destinatarios son los adultos, en particular las mujeres embarazadas para mejorar los resultados del parto y prevenir la infección congénita, y los niños mayores de dos años, en áreas endémicas de la enfermedad de Chagas. Esta vacuna se encuentra en la etapa de fabricación piloto bajo cGMP (buenas prácticas de fabricación actuales) o en el desarrollo clínico temprano (Hotez, 2011).

### **1.9 Enolasa como inmunógeno.**

En 1934, Lohman and Mayerhof descubrieron a la enolasa, también llamada fosfopiruvato hidratasa, es una de las proteínas citolíticas más abundantes en

muchos organismos (Díaz et al., 2012). Las enolasas de bacterias e invertebrados más grandes, muestran secuencias de aminoácidos altamente conservadas, lo que es particularmente evidente en el sitio catalítico, en consecuencia, ha conducido a que enzimas de diversas especies compartan propiedades cinéticas similares (Pancholi, 2001).

En vertebrados, la enzima puede estar en 3 isoformas:  $\alpha$ -enolasa (Eno1) en casi todos los tejidos humanos,  $\beta$ -enolasa (Eno3) es predominante en tejidos musculares y  $\gamma$ -enolasa (Eno2) solo se encuentra en neuronas y tejidos neuroendocrinos (Díaz et al., 2012).

La enolasa (ilustración 9) es una metaloenzima que requiere el ión magnesio para catalizar la deshidratación del 2-fosfo-D-glicerato (PGA) hacia el fosfoenolpiruvato (PEP) en dirección directa o catabólica en la segunda mitad de la vía glucolítica Emden-Mayerhoff-Parnas. En la reacción inversa (vía anabólica) que ocurre durante la gluconeogénesis, la misma enzima cataliza la hidratación de PEP a PGA (Pancholi, 2001).

Enzimáticamente, la enolasa activa se encuentra en una forma dimérica (homo o heterodímero) está compuesta de 2 subunidades enfrentadas de forma antiparalela. La estructura cristalizada de la enolasa de la levadura y humanos ha sido determinada y se han propuesto mecanismos catabólicos (Díaz et al., 2012).



**Ilustración 9 Estructura cristalina de la enolasa de *T. cruzi*.** Recuperado en: (RCSB PDB, 2012).

Por otra parte, se ha demostrado que la enolasa se expresa en la superficie de una variedad de células eucariotas como un fuerte receptor de unión al plasminógeno (Miles et al., 1991). La importancia bioquímica y la relevancia biológica de la enolasa permiten su posible aplicación como candidato a vacuna en diversas enfermedades parasitarias, ya que es un componente clave de los productos secretores excretos (ESP) de muchos parásitos como *Ascaris suum* o *T. cruzi*. Se han reportado un número considerable de informes describiendo a la enolasa expresarse en la superficie celular de varios organismos no patógenos y patógenos. (Wang et al., 2014).

El plasminógeno es uno de los componentes clave del sistema fibrinolítico y se une a una variedad de células sanguíneas. Estudios realizados por Miles y Plow mostraron que el aumento de la unión del plasminógeno a las células plaquetarias estimuladas por la trombina se debe al aumento de la expresión de ciertas integrinas y al reclutamiento de fibrina adicional que sirve como receptor del plasminógeno. Sin embargo, no se sabía cómo otras células sanguíneas que no expresan integrinas de unión a fibrina podrían unirse al plasminógeno con gran afinidad. Posteriormente, el mismo grupo de investigación utilizó las células monocíticas U937 como sistema modelo y encontró que la  $\alpha$ -enolasa era un receptor de plasminógeno candidato en las células sanguíneas nucleadas (Plow y Miles, 1991). Se utilizó el anticuerpo monoclonal específico de  $\alpha$ -enolasa 9C12, los investigadores identificaron su epítipo expuesto a la superficie en neutrófilos y células U937 utilizando el método de visualización de fagos. Este epítipo expuesto a la superficie, que abarca un tramo de 16 aminoácidos (257–272,  ${}_{257}\text{DLDFKSPDDPSRYISP}_{272}$ ), se encuentra en el bucle central de la enolasa humana (Arza et al. 1997). Ahora se sabe que está presente en la superficie de las células hematopoyéticas, como los monocitos, las células T y las células B, las células neuronales y las células endoteliales (Radlitz et al., 1995). Se ha descubierto que la expresión de  $\alpha$ -enolasa en la superficie de los neutrófilos humanos, las células T, las células B y las células monocitoides depende de las condiciones fisiopatológicas de estas células (Giallongo et al, 1986).

Diferentes estudios han mostrado que la enolasa es una proteína la cual posee propiedades antigénicas y está presente en la pared celular de ciertos organismos invasivos como *Plasmodium falciparum* (PalBhowmick et al., 2007), *Candida albicans* (Li et al., 2011) y *Ascaris suum* (Chen et al., 2012). En algunos patógenos bacterianos, como *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mutans*, la enolasa superficial se ha destacado como un importante factor de virulencia. En *Entamoeba invadens*, la expresión de enolasa es inducida por señales ambientales, y muestra asociación con estructuras similares a vesículas citoplasmáticas que transportan la proteína a la pared del quiste, donde desempeña una función esencial, pero hasta ahora desconocida (Avilán, L. et al 2011).

En el trabajo de Pal-Bhowmick y colaboradores se evaluó a la enolasa de *Plasmodium falciparum* como antigénica, se analizaron sueros de residentes de una región del este de la India donde la malaria es endémica contra la proteína recombinante de *P. falciparum* enolasa (r-Pfen). Alrededor del 96% de las muestras de sueros inmunes adultos reaccionaron con r-Pfen por encima de los controles seronegativos. Los anticuerpos anti-r-Pfen de conejo inhibieron el crecimiento de cultivos in vitro de *P. falciparum*. Los ratones inmunizados con r-Pfen mostraron protección contra un desafío con la cepa letal 17XL del parásito de la malaria de ratón *Plasmodium yoelii*. Los anticuerpos generados contra r-Pfen fueron específicos para *Plasmodium* y no reaccionaron a los tejidos del huésped. La inmunofluorescencia y los exámenes microscópicos electrónicos revelaron la localización de la proteína enolasa en la superficie celular del merozoito. Estas observaciones establecen que la enolasa es un posible antígeno protector (Pal-Bhowmick et al., 2007).

En años posteriores, en 2011 Quinj Li y colaboradores evaluaron a la enolasa de *Candida albicans*. En ese trabajo se clonó, purificó y caracterizó por clonación molecular. Además, se inmunizaron ratones C57BL / 6J con enolasa recombinante por vía subcutánea cada dos semanas, y se evaluó el efecto protector contra la exposición sistémica mediante el reto fúngico en órganos diana, títulos de

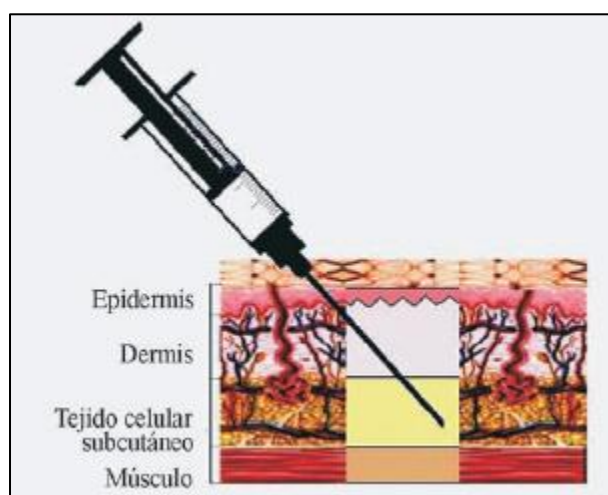
anticuerpos específicos para enolasa y por niveles de citocinas en suero. Después del desafío con las cepas SC5314 y 3630 de *C. albicans*, los retos fúngicos en el hígado, riñón, cerebro, bazo y pulmón disminuyeron significativamente en ratones inmunizados. La evaluación histopatológica demostró que la enolasa protegía la estructura del tejido y disminuía la infiltración de las células inflamatorias. Los títulos de IgG1 e IgG2a específicas de enolasa en el suero inmune alcanzaron hasta 1: 51,200. Además, la opsonización con suero inmune dio como resultado una mayor destrucción de 3630 y SC5314 por neutrófilos murinos. Los niveles de IL-12 e IL-8 en el suero inmune aumentaron, mientras que la concentración de la citocina Th2, IL-10, fue significativamente mayor en los ratones inmunizados en comparación con el grupo de control. Se concluyó que la enolasa recombinante protegió efectivamente a los ratones contra la candidiasis diseminada, y puede ser un objetivo prometedor para la vacunación contra diferentes cepas de *C. albicans* (Quinj et al., 2011).

Otro modelo que utilizó a la enolasa como inmunógeno se reportó en el trabajo de Chen y colaboradores en el 2012, el gen que codifica a la enolasa de *Ascaris suum* (As-enol-1) fue amplificado, clonado y secuenciado. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos indicó que As-enol-1 estaba altamente conservado entre diferentes nematodos y compartía la identidad más alta (87%) con enolasa de *Anisakis simplex* s.l. El pVAX-Enol recombinante se expresó con éxito en células Marc-145. La capacidad del pVAX-Enol para inducir respuestas inmunitarias protectoras contra la infección de desafío con *A. suum* L3 se evaluó en ratones Kunming. La respuesta inmune se evaluó mediante un ensayo linfoproliferativo, mediciones de citocinas y anticuerpos, y la tasa de reducción de las larvas de recuperación. Los resultados mostraron que los ratones inmunizados con pVAX-Enol desarrollaron un alto nivel de respuestas de anticuerpos específicos contra *A. suum*, una fuerte respuesta linfoproliferativa y niveles significativos de producción de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10, en comparación con los otros grupos inmunizados con plásmido vacío o controles, respectivamente. Hubo una reducción del 61.13% en la recuperación de larvas en comparación con la del

grupo de control. Los datos indican que la enolasa de *A. suum* es un posible candidato a la vacuna contra la infección por *A. suum* (Chen et al., 2012).

### 1.10 Vía de administración, subcutánea.

La administración de sustancias por vía subcutánea o también llamada hipodérmica (ilustración 10) consiste en la administración de pequeñas cantidades de medicamento que, tras ser inyectado, queda alojado en la hipodermis o tejido celular subcutáneo desde donde es absorbido lentamente (Soriano et al. 2009).



**Ilustración 10 Vía de administración subcutánea.** La administración se debe realizar en un ángulo de 45° grados para lograr una efectiva administración en el tejido celular subcutáneo (Paneagui & Saez, 2016).

La vía proporciona una lenta liberación, evitando el metabolismo de primer paso por el hígado (Morton et al., 2001). La administración de fármacos por vía subcutánea supone una técnica muy útil, permitiéndonos usar diferentes principios activos y en casos necesarios proporcionar una hidratación adecuada (Soriano, 2009).

#### 1.10.1 Factores que influyen en la absorción de fármacos por vía subcutánea

Los principales factores que intervienen en la absorción de fármacos son:

- Flujo sanguíneo de la zona: Se puede incrementar la velocidad de absorción, por ejemplo, añadiendo hialuronidasa, con el masaje, el ejercicio y la aplicación de calor en el punto de inyección.
- Características del fármaco: Los fármacos deben ser soluciones neutras o isotónicas, pues si no serán irritantes, pudiendo provocar dolor y/o necrosis. Las soluciones oleosas pueden producir un absceso. También puede influir el peso molecular y la concentración del fármaco.
- Volumen administrado: El volumen máximo es de 2 mL por bolo.
- Eficacia. Los niveles alcanzados en plasma son similares a los obtenidos vía intramuscular y vía intravenosa. Se asume de modo general que los fármacos administrados por vía subcutánea se absorben de modo completo, tal y como sucede con la vía intramuscular, teniendo una biodisponibilidad cercana al 100% (Soriano et al. 2009).

### **1.10.2 Ventajas y desventajas**

Entre las ventajas que presenta la vía subcutánea son:

- Es una técnica poco agresiva: sólo se introduce el tejido celular subcutáneo con agujas de pequeño calibre.
- Es una técnica sencilla y poco dolorosa.
- Presenta menos efectos secundarios que la vía intravenosa.

Las complicaciones derivadas del uso de la vía subcutánea son escasas. Los inconvenientes más frecuentes son:

- Irritación local. Es la complicación más frecuente. Suele resolverse cambiando el lugar de punción.
- Edema.
- Hematoma.
- No se pueden utilizar todos los fármacos (Soriano et al. 2009).

## ANTECEDENTES GENERALES

En un estudio realizado por Pereira y colaboradores llamado “Respuestas de isotipo de anticuerpo en ratones BALB/c inmunizados con el antígeno citoplásmico repetitivo y el antígeno flagelar repetitivo de *Trypanosoma cruzi*” se inmunizaron en tres ocasiones a ratones BALB/c por vía subcutánea con un antígeno recombinante repetitivo T citotóxico (CRA) y un antígeno repetitivo flagelar (FRA). El CRA recombinante generó altos niveles de IgG3 e IgG1, mientras que solo la IgG1 fue inducida por FRA recombinante. Continuando con su investigación, sugirieron que el isotipo IgG3 juega un papel importante en la protección. La complejidad o estructura del antígeno puede generar una respuesta humoral diferente. En la enfermedad de Chagas, la respuesta inmune humoral es importante porque los anticuerpos pueden proteger a los animales, reduciendo así la parasitemia y la mortalidad (Pereira et al, 2003).

En otro estudio se produjeron proteínas de barra paraflagelar recombinante (PFR), se analizó la secuencia del gen PFR-2 en siete cepas muy diversas de *T. cruzi* y descubrieron que están muy conservada. Una vez obtenidas las PFR se inmunizaron ratones y se infectaron con *T. cruzi*, estos animales mostraron protección asociada con un perfil de citoquinas Th1. La inmunización con PFR-1, PFR-2, PFR-3 o una mezcla equimolar favoreció una reducción del 70%, 73%, 51% y 74% en la parasitemia, respectivamente. Es importante identificar nuevos epítomos protectores para optimizar el diseño de las vacunas (Lursh, 2003).

La proteína enolasa se ha evaluado como inmunógeno en diferentes modelos como *Ascaris suum* y *P. falciparum* debido a que posee propiedades antigénicas y está presente en la pared celular de ciertos organismos invasivos. De acuerdo con el estudio de Chen y colaboradores, el gen que codifica a la enolasa de *Ascaris suum* (As-enol-1) fue amplificado, clonado y secuenciado. El pVAX-Enol recombinante se expresó con éxito en células Marc-145. Se evaluó la capacidad del pVAX-Enol para inducir respuestas de protección inmunitaria contra la infección por desafío con *A. suum* L3 en ratones Kunming. Los resultados mostraron que los ratones inmunizados con pVAX-Enol desarrollaron un alto nivel

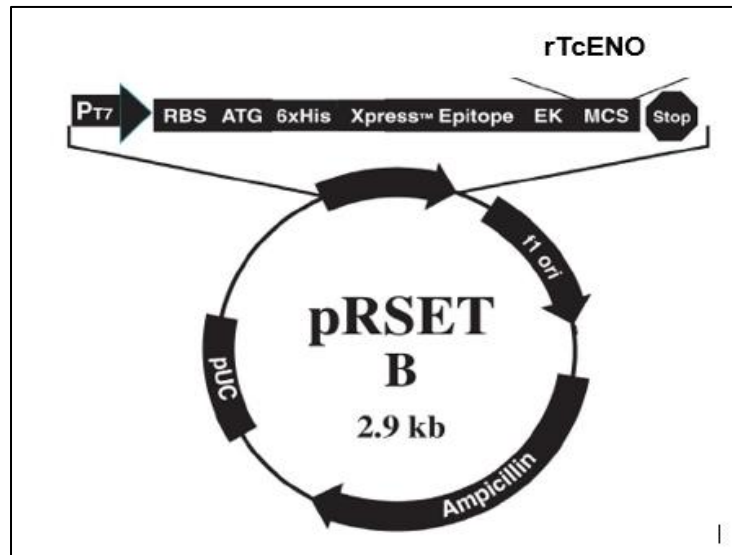
de respuestas de anticuerpos específicas contra *A. suum*, una respuesta linfoproliferativa fuerte y niveles significativos de producción de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 en comparación con los otros grupos inmunizados con plásmido vacío o controles blanco, respectivamente. Estos datos indicaron que *A. suum* enolasa es un potencial candidato de vacuna contra la infección por *A. suum* (Chen et al, 2012). Por otro lado, Pal-Bhowmick y colaboradores evaluaron los sueros de residentes de una región del este de la India donde la malaria es endémica, se analizaron los sueros con la proteína recombinante *P. falciparum* enolasa (r-Pfen). Alrededor del 96% de las muestras reaccionaron con r-Pfen por encima de los controles seronegativos. Los anticuerpos de conejo anti-r-Pfen inhibieron el crecimiento de cultivos *in vitro* de *P. falciparum*. Los ratones inmunizados con r-Pfen mostraron protección contra un desafío con la cepa letal 17XL del parásito malarial del ratón *Plasmodium yoelii*. Los anticuerpos producidos contra r-Pfen fueron específicos para *Plasmodium* y no reaccionaron a los tejidos del huésped. La inmunofluorescencia, así como los exámenes de microscopía electrónica, revelaron la localización de la proteína enolasa en la superficie celular del merozoito. Estas observaciones establecen que la enolasa de la malaria es un posible antígeno protector (Pal-Bhowmick et al, 2007).

## 2.1 Antecedentes directos

En el estudio realizado por Carabarán y colaboradores, “Enfoque *in silico* para la identificación de propiedades inmunológicas de la enolasa de *Trypanosoma cruzi* y su posible utilidad como vacuna en la enfermedad de Chagas” se evalúa a la enolasa de *T. cruzi* como una proteína inmunogénica para desarrollar una posible vacuna candidata contra la enfermedad de Chagas, en su procedimiento se clonó el gen de la enolasa de *T. cruzi*, se expresó la proteína recombinante (rTcENO) y se realizaron ensayos bioinformáticos, como resultado mostró que la secuencia de rTcENO tiene epítopes que podrían ser reconocidos por las células B y linfocitos T citotóxicos (CTL), además, un ensayo de transferencia de western blot mostró que los sueros de humanos con la enfermedad de Chagas y los ratones infectados experimentalmente de *T. cruzi* reaccionaron contra rTcENO. Con estos resultados,

se concluye que rTcENO es un candidato potencial para desarrollar una vacuna contra la enfermedad de Chagas (Carabarán et al., 2014).

La construcción del plásmido fue gracias a la extracción de RNA de los parásitos, seguido de la síntesis de cDNA que codifica para la TcENO, este gen fue amplificado con un par de oligonucleótidos que confieren sitios de corte para las enzimas de restricción KpnI y HindIII. Este amplificado fue clonado en el vector pCR®4-TOPO invitrogen™, y transformado en *E. coli* DH5α. Esta cepa tiene tres mutaciones, la mutación endA1 que inactiva la endonucleasa intracelular que degrada el DNA plasmídico, la mutación hsdR17 elimina la endonucleasa de restricción del sistema de modificación-restricción EcoK1, por lo tanto, los fragmentos de DNA que poseen metilaciones en los sitios EcoK1 no son degradados y la mutación recA elimina la posibilidad de la recombinación homóloga (María Soledad Brea, 2013). Posteriormente, se obtuvo el DNA plasmídico y usando los dos sitios de restricción se subclonó en pRSETB (vector de expresión procariota) (ilustración 11), este tiene la capacidad de ayudar con la expresión de la proteína a través del promotor T7, dando estabilidad, así como la fusión de la proteína de interés a una bandera de histidinas que facilita su purificación en columna de níquel y le confiere resistencia a ampicilina. Por último, fue transformado en *E. coli* BL21(DE3)pLysS, cepa que confiere buenos rendimientos en cuanto a expresión de proteína por su gen que codifica para la T7 RNA polimerasa, y una resistencia a cloranfenicol; dando así al vector pRSETB::tcENO(Carabarán et al., 2014).



**Ilustración 11. Vector de expresión pRSET-B rTcENO.** Modificado de: Addgene, 2019.

En 2018, Arce y colaboradores utilizaron a la enolasa recombinante de la cepa *T. cruzi* H8 (MHOM / MX / 1992 / H8 Yucatán) (rTcENO) y su ADN codificante (pBKTcENO) para inmunizar ratones por vía intraperitoneal y evaluar sus efectos protectores en un modelo murino experimental de infección de fase aguda. Sus resultados mostraron que los ratones vacunados con rTcENO o su ADN codificante podían generar anticuerpos específicos típicos (IgG1, IgG2a e IgG2b), lo que sugiere que se indujo una respuesta inmune mixta Th1 / Th2. La carga de parásitos en la sangre se redujo a 69.8% y 71% en ratones vacunados con rTcENO y pBKTcENO, respectivamente. El grupo vacunado con rTcENO logró un 75% de supervivencia, en contraste con el grupo vacunado con pBKTcENO que no mostró supervivencia en comparación con los grupos control. Además, la inmunización con rTcENO elevó la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 después del desafío del parásito, lo que sugiere que la respuesta inmune de tipo Th1 estaba presente. Estos resultados indicaron que rTcENO podría usarse como una vacuna contra la enfermedad de Chagas (Arce et al., 2018).

## 2.2 Justificación

El desarrollo de una vacuna humana eficaz contra la enfermedad de Chagas ha tenido muchas dificultades, y el progreso ha sido muy lento debido a que todavía hay controversias sobre su etiología autoinmune y el desinterés de las autoridades en países endémicos donde existe este NTD (Hotez et al., 2007). La complejidad genética de *T. cruzi*, así como el conjunto limitado de técnicas de ingeniería eficientes para la manipulación del genoma contribuyen significativamente a la falta de progreso relativa en la comprensión del microorganismo. A pesar de varios estudios proteómicos de *T. cruzi*, la evaluación del perfil de tripomastigotes del torrente sanguíneo permanece sin explorar. El enfoque de los estudios bioinformáticos para desarrollar vacunas que incluyan antígenos tanto de forma intracelular (amastigote) como extracelular (tripomastigote) es necesario. El uso de antígenos nativos definidos purificados de *T. cruzi* es conveniente y aceptable, pero es difícil obtener estos antígenos en los volúmenes necesarios para realizar los estudios. La producción de anticuerpos monoclonales y los avances en los métodos para obtener proteínas han mejorado la identificación, el aislamiento y la purificación de las proteínas parásitas definidas, pero han aumentado la dificultad en el rendimiento y la producción sostenible de vacunas (Rodríguez et al., 2015).

La vacunación profiláctica ideal sería aquella que no permita el establecimiento del parásito o reduzca la carga del parásito, por lo que tiene una base científica para el uso de la inmunización en humanos y reservorios domésticos en áreas endémicas para la prevención y el control de la enfermedad de Chagas (Rodríguez et al., 2015).

La enolasa se propone como un candidato al desarrollo de una vacuna contra *T. cruzi*, ya que estudios anteriores señalan que esta proteína es capaz de generar una respuesta inmune en el hospedero y está presente en la pared celular de ciertos organismos invasivos (Carabarin et. al, 2014).

### **2.3 Hipótesis**

Las características estructurales de la enolasa recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rTcENO) podrían generar una respuesta inmune favorable con la producción de anticuerpos policlonales protectores.

### **2.4 Objetivo general**

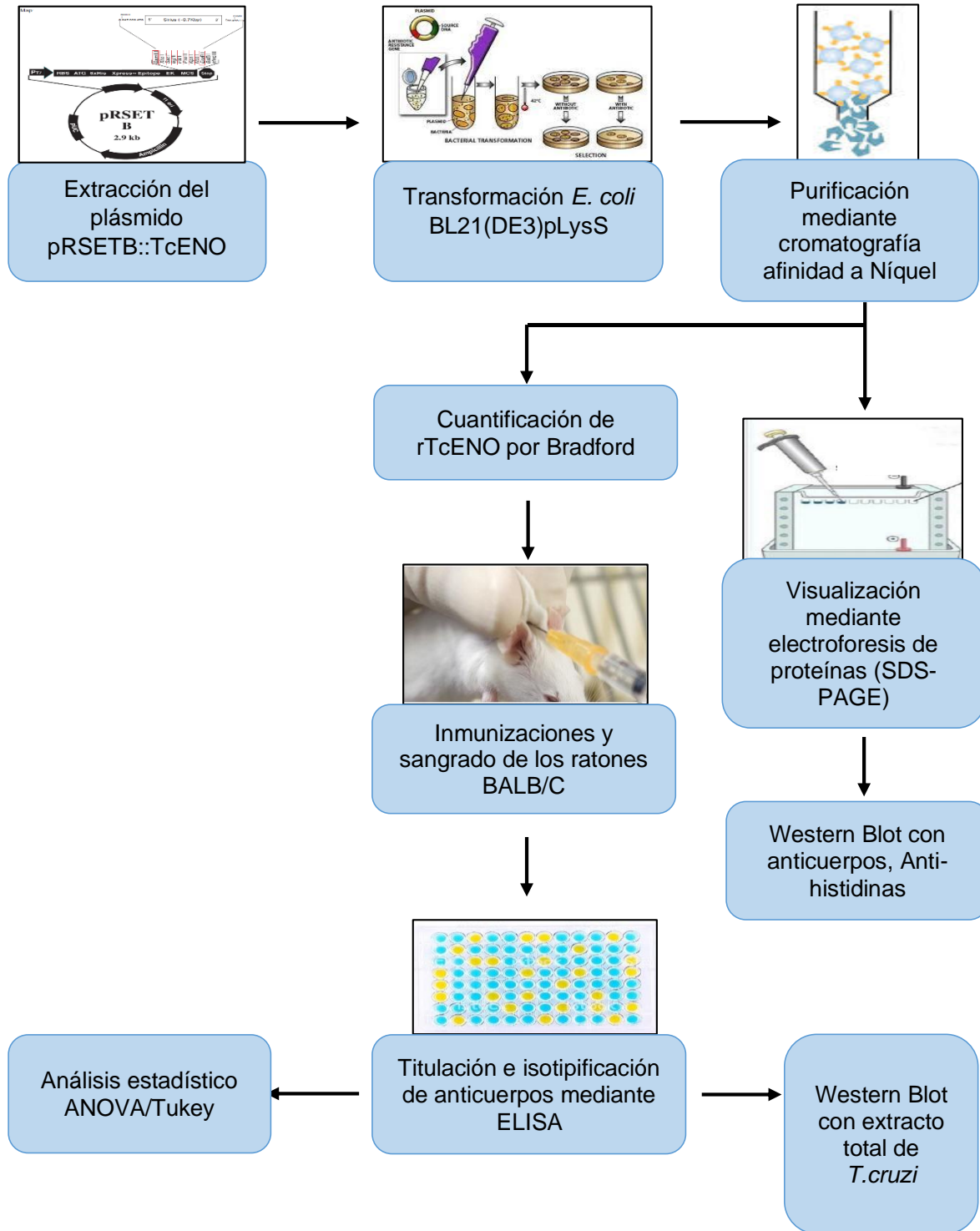
Evaluar las propiedades inmunogénicas de la proteína recombinante enolasa de *Trypanosoma cruzi* (rTcENO) para determinar su uso potencial como vacuna en la enfermedad de Chagas.

### **2.5 Objetivos específicos**

- Purificar la proteína rTcENO a homogeneidad mediante columna de afinidad a níquel.
- Diseñar un protocolo de inmunización de la proteína rTcENO en un modelo murino por vía subcutánea.
- Evaluar la inmunogenicidad de los anticuerpos policlonales generados.
- Cuantificar los anticuerpos policlonales mediante inmunoensayos.
- Determinar el isotipo de los anticuerpos generados por la inmunización con la enolasa recombinante de *T. cruzi*.

# DISEÑO METODOLÓGICO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

## 3.1 Diseño experimental



### 3.2 Extracción de plásmido pRSETB::TcENO

El plásmido pRSETB::TcENO se purificó de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . En tubo Eppendorf se centrifugaron las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  a 13000 RPM durante 2 minutos. Se agregó 700  $\mu$ L de solución 1 (Tris-HCl 25mM, Sacarosa al 15%, EDTA 10mM) y lisozima, dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se agregaron 300  $\mu$ L de solución 2 (SDS al 1%, NaOH 0.2M) se mezcló suavemente para incubarse en hielo durante 5 minutos. Pasado los 5 minutos se agregaron 200  $\mu$ L de la solución 3 (Acetato de potasio 3M pH5.5) y se mezcló en el vórtex durante 3 minutos. Se volvió a incubar en hielo por 10 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó 15 minutos a 12,000 RPM. Se pasó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf y se agregaron 500  $\mu$ L de isopropanol para posteriormente dejarlo reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se volvió a centrifugar a 12,000 RPM durante 15 minutos. La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó por última vez a 12,000 RPM durante 2 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50  $\mu$ L de agua tridestilada. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X a un voltaje de 90 V por 40 minutos, usando un marcador de peso molecular con un rango que va de 200 a 12000 pb, GeneRuler<sup>TM</sup>, posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (BET) para ser observado en el foto-documentador Minibis Pro, Bioimaging System.

### 3.3 Células competentes

A partir de una placa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS se tomó una asada y se coloca en un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB adicionado con cloranfenicol (Cm) a 34  $\mu$ g/mL y se dejó incubar en a 37°C por 24 horas (precultivo). Pasadas las 24 horas, el precultivo se adicionó a un matraz con 50 mL de medio LB con Cm, se dejó incubar a 37°C con agitación de 250 RPM hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.<sub>600 nm</sub>) de 0.4 a 0.6. Al alcanzar la D.O. deseada se colocó el matraz en hielo durante 30 minutos. Después, se centrifugó en 2 tubos tipo Falcon estériles a 4°C a 6000 RPM por 6 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió suavemente las pastillas en 10 mL de CaCl<sub>2</sub>(200mM) cada uno y mantenerlo en

hielo durante 1 hora. Se centrifugó a 4°C a 6000 RPM por 6 minutos y se resuspendió en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> en cada tubo. Se resguardo 800 µL en tubos tipo Eppendorf que contengan 200 µL de glicerol.

### **3.4 Transformación**

Se colocó en hielo las células competentes obtenidas durante 15 minutos, se agregó 5 µL del plásmido pRSETB::TcENO directo a las células competentes y se colocó en hielo durante 30 minutos. Pasado los 30 minutos, se colocó a 42°C por 1 minuto y rápidamente se regresa a hielo por 10 minutos. Posteriormente, se agregó 1 mL de medio LB y se dejó incubando a 37°C por 1 hora. Posterior a la hora, se centrifugó a 3000 RPM por 2 minutos. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió con 100 µL de medio LB, se plaqueo en medio LB sólido adicionado con ampicilina (Amp) a 100 µg/mL y cloranfenicol (Cm) 34 µg/mL y se dejó incubando a 37°C durante 24 horas.

### **3.5 Inducción de rTcENO**

A partir de una placa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS conteniendo el plásmido pRSETB::TcENO se tomó una asada y se colocó en un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB adicionado con Amp a 100 µg/mL y Cm a 34 µg/mL y se dejó incubar a 37°C por 24 horas (precultivo). Pasadas las 24 horas, el precultivo se adiciona a un matraz con 50 mL de medio LB, además de Amp y Cm, se dejó incubar a 37°C con agitación de 250 RPM hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.<sub>600 nm</sub>) de 0.4 a 0.6. Al alcanzar la D.O. deseada se agregó al matraz el isopropil-β-ditiogalactósido (IPTG) 1mM e se incubó durante las primeras 3 horas a 37°C, las 21 horas restantes se incubaron a 30°C. Por último, las células se obtuvieron centrifugando a 8,000 RPM por 5 minutos a 4°C.

### **3.6 Sonicación de las células bacterianas**

Las células bacterianas se resuspendieron en 20 mL de solución de lisis (50mM Tris HCl pH 8, 4M tiocianato de guanidina y 10mM NaCl). Se adicionó 200-250 µL de inhibidores de proteasas. Después se sonicó (Amplitud 50; Pulsos 10

segundos) durante 1 hora y media aproximadamente hasta que la solución se logrará apreciar trasparente. Al tener la solución transparente se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Obteniendo el sobrenadante.

### **3.7 Purificación de la proteína**

La proteína rTcENO está marcada con una etiqueta de histidinas, se purificó mediante una cromatografía de afinidad de Ni-NTA-agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó un análisis de expresión de la proteína rTcENO mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración del 12% y se tiñó el gel con azul de Coomasie.

### **3.8 Diálisis**

La proteína rTcENO obtenida en la purificación se dializó durante 2 horas en 200 mL de solución (20mM Tris HCl pH 8 y 50 mM NaCl), pasado este tiempo, se cambió la solución y se dejó 24 horas a 4°C.

### **3.8 Precipitación de la proteína**

La proteína rTcENO recuperada se recolectó en un tubo tipo Falcon, se le adicionó acetona fría (proporción 1:1) y se dejó a 4°C toda la noche. Pasado este tiempo, se centrifugó a 6,000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se decantó el sobrenadante y se agregó PBS estéril a 1X.

### **3.9 Western Blot**

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración del 12% que se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 100V durante 40 minutos. Para bloquear la membrana se utilizó leche sin grasa al 5% (p/v) en PBS estéril durante una hora. Al pasar la hora, se lavó la membrana tres veces con PBS Tween 20 (PBST) al 0.05% agitando a 20 RPM durante 10 minutos cada lavado. Después de los 3 lavados, se colocó el anticuerpo Anti-histidinas (dilución 1:5000 con PBS estéril) y se incubó a 37°C por 2 horas. Se

realizaron otros tres lavados con las mismas condiciones antes descritas. A continuación, se colocó el segundo anticuerpo IgG anti-ratón en cabra acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1:5000 con PBS estéril) y se volvió a incubar la membrana a 37°C por una hora. Se volvieron a realizar 3 últimos lavados. Se concluyó con el revelado de la membrana usando el sustrato de fosfatasa BCIP/NBT.

### **3.10 Cuantificación de la proteína rTcENO por el método de Bradford**

La curva estándar de albumina se realizó bajo a las siguientes concentraciones (0.25 µg/µL, 0.5µg/µL, 2.5µg/µL, 5µg/µL, 10µg/µL,15µg/µL), después se colocó 1 µL de la muestra de rTcENO y 399 µL de agua, a continuación, se agregó 100µL del reactivo Bradford. Se agitó e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Por último, se leyó la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas ELISA (lector Multiskan MS, Labsystems, Finlandia). Las absorbancias fueron graficadas con respecto a las concentraciones de albumina, se realizó la curva estándar y se obtuvo la ecuación de la recta, despejando para obtener la concentración de todos los eluidos.

### **3.11 Inmunización por vía subcutánea**

Se adquirió 6 ratones hembras BALB/C (de 8 semanas de edad y con un peso promedio de 22 gramos) del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla quienes los tuvieron en condiciones de limpieza con comida y agua “ad libitum”. El manejo de los animales se llevó a cabo acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los 6 ratones se dividieron en 2 grupos, 4 ratones como grupo problema y 2 como control negativo.

Con la ayuda de los trabajadores del Bioterio, a los 6 ratones se les sangró, previamente anestesiados por vía intraperitoneal con Ketamina 80 mg y Xilacina 10 mg en relación con su peso para obtener el suero preinmune.

Se realizó un esquema de vacunación (tabla 3) en el cual se administraron 4 inmunizaciones en un periodo de 7 días entre cada una. Se administró 10 µg/µL

de la proteína rTcENO (a proporción 1:1 con el adyuvante de Freund) por vía subcutánea a los ratones del grupo problema, la primera inmunización fue con el adyuvante completo de Freund y las siguientes 3 inmunizaciones se realizaron con el adyuvante incompleto de Freund. Para el grupo control negativo se realizaron las mismas inmunizaciones sin la proteína recombinante, solo el adyuvante de Freund (a proporción 1:1 con PBS estéril).

Al terminar las inmunizaciones y pasando 30 días, los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal con Ketamina 80 mg y Xilacina 10 mg en relación con su peso. Posteriormente, se realizó una punción cardíaca a los ratones con ayuda de personal del Bioterio Claude Bernard, los animales fueron sangrados recolectando el suero inmune con el fin de obtener los anticuerpos policlonales anti-rTcENO.

Periodo de inmunización	Primera inmunización	Segunda inmunización	Tercera inmunización	Cuarta inmunización	Post-inmunización
<b>Grupo problema (4 ratones)</b>	rTcENO con adyuvante completo de Freund (1:1).	rTcENO con adyuvante incompleto de Freund (1:1).	rTcENO con adyuvante incompleto de Freund (1:1).	rTcENO con adyuvante incompleto de Freund (1:1).	Sangrado de los ratones.
<b>Grupo control negativo (2 ratones)</b>	PBS estéril con adyuvante completo de Freund (1:1).	PBS estéril con adyuvante incompleto de Freund (1:1).	PBS estéril con adyuvante incompleto de Freund (1:1).	PBS estéril con adyuvante incompleto de Freund (1:1).	Sangrado de los ratones.

**Tabla 3 Esquema de inmunización por vía subcutánea.** Composición de las inmunizaciones.

### 3.12 Análisis de interacción del extracto total de *T. cruzi* con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO

Al realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración del 12% se coloca de muestra 10 µL de extracto de *T. cruzi* en 5 pozos, se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa a 100V durante 40 minutos. Para bloquear la membrana se utilizó leche sin grasa al 5% (p/v) en PBS estéril durante una hora. Al pasar la hora, se lavó la membrana tres veces con PBS Tween 20 (PBST) al 0.05% a 20 RPM durante 10 minutos cada lavado.

Después de los 3 lavados, se divide la membrana en 5 tiras y se colocó 5 mL de anti-rTcENO de ratón (diluciones 1:1000, 1:5000, 1:10,000 y 1:20,000 con PBS estéril), el control negativo se hizo con anti-rTcENO de suero preinmune y se incubaron a 4°C durante 24 horas. Al día siguiente, se realizaron otros tres lavados con PBST al 0.05% a 20 RPM durante 10 minutos cada lavado para continuar colocando el segundo anticuerpo Anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1:5000 con PBS estéril) y se incubó la membrana a 37°C por una hora. Se realizaron los 3 últimos lavados con PBST al 0.05% a 20 RPM durante 10 minutos cada lavado para concluir con el revelado de la membrana usando el sustrato de fosfatasa BCIP/NBT.

### **3.13 Cuantificación de anticuerpos policlonales**

Se recubrió una placa de MICROELISA de 96 pozos con la proteína rTcENO (10 µg/µL), incubar a 4°C por 24 horas. Posteriormente, se realizan 3 lavados con Tween al 0,5% (PBST) y se incubaron durante 1 hora a 37°C con solución de bloqueo (PBS que contenía 5% de leche sin grasa). Pasando los 3 lavados con PBST, se adicionaron 100 µL de los sueros de los ratones inmunizados por pozo (diluciones 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10,000 y 1:20,000 en PBS) incubando 2 horas a temperatura ambiente. Después de las 2 horas, se volvieron a realizar 3 lavados con PBST. Se adicionaron 50 µL de anticuerpo IgG anti-ratón hecho en cabra y acoplado a peroxidasa de rábano por pozo, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se decantó y se dieron 3 lavados con PBST. Por último, se adicionó 100 µL de la solución de sustrato por pozo TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina), incubándose 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la densidad óptica a 630 nm en un lector de microplacas ELISA (lector MultisKan MS, LabSystems, Finlandia).

### **3.14 Determinación del isotipo de inmunoglobulina**

Una vez que los títulos de anticuerpos estén por igual o encima de 1: 10,000 se analizaron los isotipos de inmunoglobulina. Los niveles de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), IgA e IgM se evaluaron mediante el método ELISA de acuerdo con

las instrucciones del fabricante (Zymed, ZymedLabs, San Francisco, CA, EE. UU.). Brevemente, las placas se recubrieron con rTcENO (10 µg/µL) y se incubaron durante 24 horas a 4 ° C. Las placas se lavaron con PBS que contenía Tween al 0,5% (PBST) y se incubaron durante 1 hora a 37°C con solución de bloqueo (PBS que contenía 1% de leche sin grasa). Después, las placas se lavaron con PBST, y se incubaron con 100 µl de anti-rTcENO de ratón (dilución 1:1000 en PBS). Se llevaron a cabo otras etapas de lavado y se añadieron los anticuerpos anti-IgG de ratón hechos en cabra y marcados con peroxidasa de rábano. Todos los anticuerpos se diluyeron (1:1000) en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados como se describió anteriormente, se añadieron 100 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (Zymed, ZymedLabs, San Francisco, CA, EE. UU.) como sustrato y después de 10 minutos la reacción se leyó a 630 nm en un lector de microplacas ELISA (lector Multiskan MS, Labsystems, Finlandia).

### **3.15 Análisis estadístico**

Con la ayuda del programa Minitab® 18, se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos de los inmunoensayos de ELISA en la determinación de los isotipos de inmunoglobulina. El análisis que se realizó fue ANOVA/tukey.

## **RESULTADOS**

### **4.1 Extracción de plásmido pRSETB::TcENO**

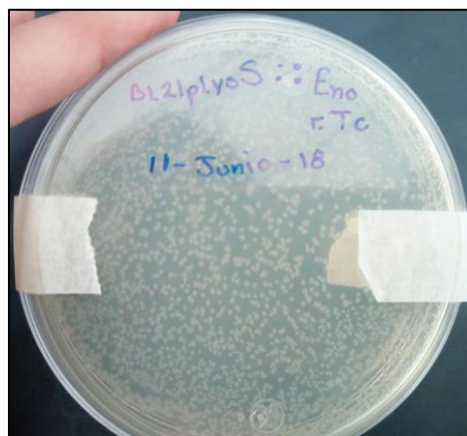
El plásmido pRSETB::TcENO está contenido en la cepa de mantenimiento *E. coli* DH5α. A partir de esta cepa se obtuvo el plásmido utilizando el método de miniprep. La digestión del plásmido pRSETB::rTcENO con las enzimas KpnI y HindIII liberó un fragmento con un peso molecular de 1.1 Kb, que corresponde con el gen de la rTcENO reportada por Carabarín en 2014 (Carabarín et al., 2014) (ilustración 12).



**Ilustración 12 Electroforesis de Agarosa al 1%.** Extracción de DNA plasmídico (pRSETB::TcENO), digestión con KpnI y HindIII en una doble reacción enzimática. Carril 1: Fragmento liberado; carril 2: marcador de peso molecular GeneRuler™.

#### 4.2 Expresión, purificación y obtención de la rTcENO

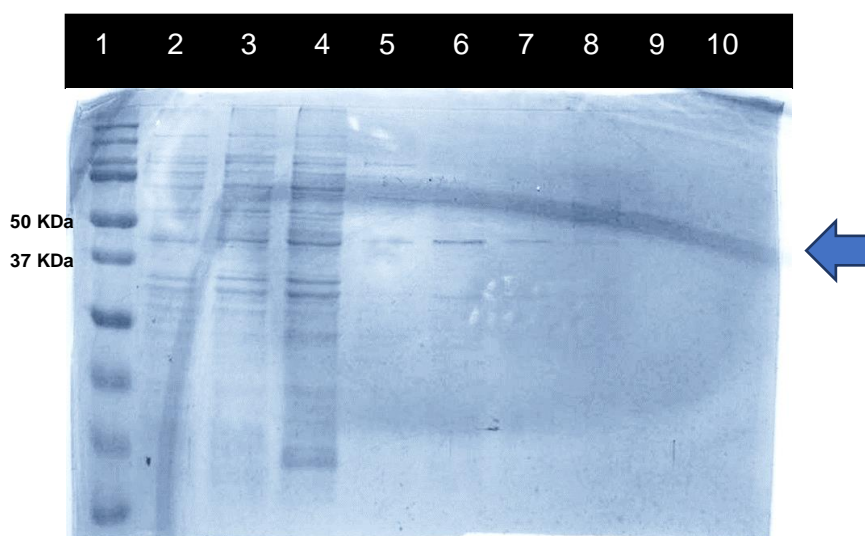
Al confirmar que el plásmido era pRSETB::TcENO, se transformaron las células competentes *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Con el fin de asegurar que la cepa transformada contenía el gen que codifica para la enolasa se siembra en un medio selectivo de LB adicionado con Amp a 100 µg/mL y Cm a 34 µg/mL (ilustración 13).



**Ilustración 13 Transformación de las células competentes *E. coli* BL21(DE3)pLysS::rTcENO.** Las células *E. coli* BL21(DE3)pLysS se transformó con el plásmido pRSETB::TcENO y se sembró en medio LB adicionado con Amp y Cm.

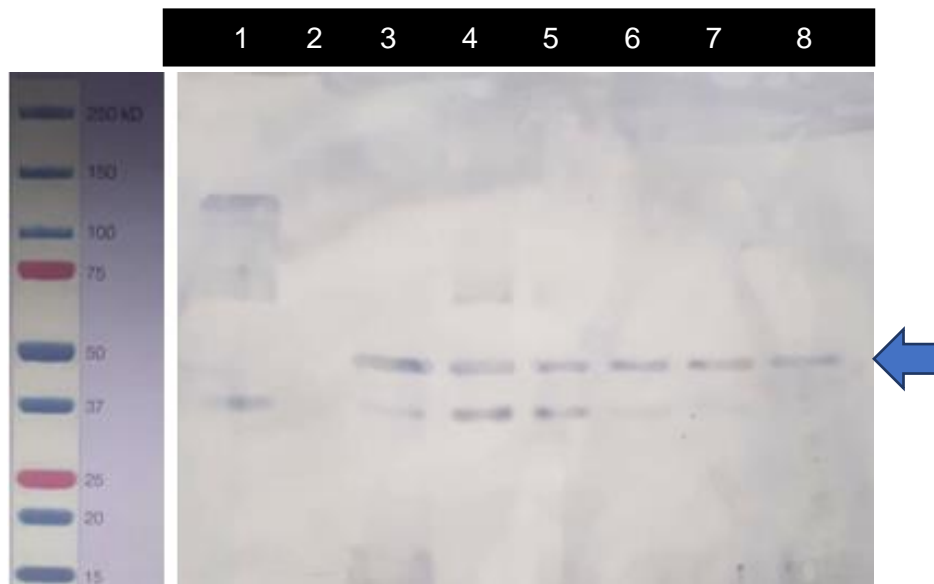
Posteriormente, se realizó la inducción de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG 1 mM, dejándose incubar a 30°C en agitación a 250 RPM por 24 horas. Al terminar el tiempo transcurrido, se recuperó por centrifugación, se resuspendió en buffer de lisis, se sonicó y se purificó mediante cromatografía de afinidad de Ni-NTA agarosa. Se realizó un SDS-PAGE al 12% para la visualización de la rTcENO, posteriormente fue teñido con azul de Comassie G250 de Merck™.

La rTcENO se muestra con un peso molecular de 46.5 KDa, además se logra apreciar una banda de menor peso molecular debido a que la enolasa es susceptible a la proteólisis enzimática (ilustración 14).



**Ilustración 14 SDS-PAGE de la purificación de rTcENO.** La proteína rTcENO fue inducida con IPTG y migrada mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Commassie. La flecha azul indica la ubicación de la proteína recombinante. carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: Inducido; carril 3: Pastilla; carril 4: lavado 1; carril 5: lavado final; carriles 6,7, 8: eluciones de rTcENO.

La purificación se realizó varias veces hasta obtener la cantidad necesaria para realizar el esquema de inmunización y se confirmó la presencia de nuestra proteína de interés mediante un Western Blot, utilizando como primer anticuerpo Anti-histidinas y posteriormente, el segundo anticuerpo IgG Anti-ratón hecho cabra y conjugado con fosfatasa alcalina. Se observa una segunda banda de menor peso molecular que es la degradación de nuestra proteína de interés (ilustración 15).



**Ilustración 15 Western Blot de la purificación de rTcENO.** La proteína rTcENO fue inducida con IPTG, migrada mediante electroforesis SDS\_PAGE al 12% y transferida a una membrana de nitrocelulosa. El primer anticuerpo es Anti-histidinas y el segundo es IgG Anti-ratón hecho cabra y acoplado a fosfatasa alcalina. La flecha azul indica la ubicación de la proteína recombinante. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: no inducido; carril 3: inducción; carril 4: pastilla; carril 5: lavado final; carriles 6,7, 8: eluciones de rTcENO.

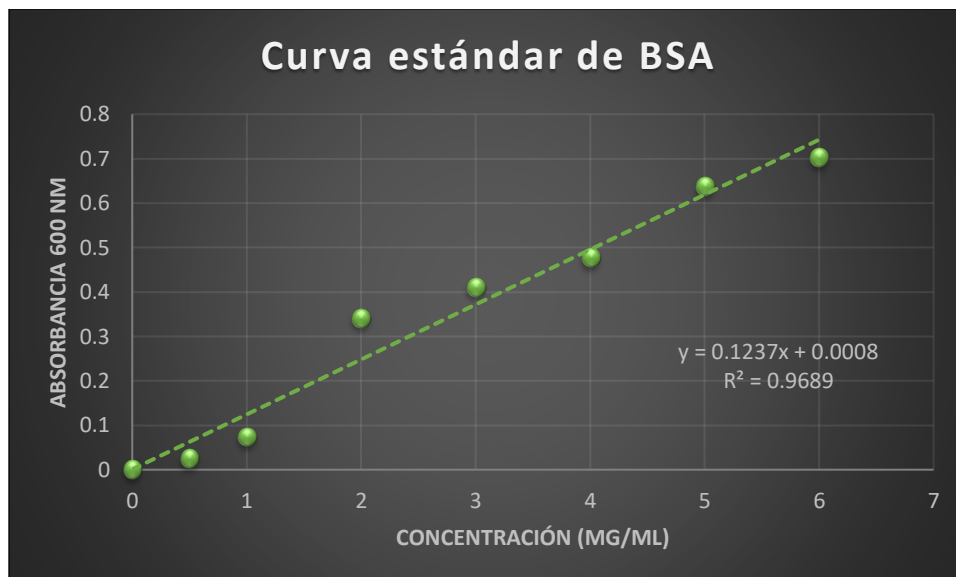
### 4.3 Cuantificación de la rTcENO

Se realizó la cuantificación de 16 eluidos obtenidos de la purificación por cromatografía de afinidad a Níquel. Cada eluido contenía 1 mL de la proteína rTcENO. La cuantificación se realizó a partir de una curva estándar de BSA en 7 concentraciones y un blanco. (0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Se graficó y se realizó un ajuste por mínimos cuadrados para obtener la ecuación general de la recta de esta gráfica (ecuación 1).

$$y = mx + b$$

Sustituyendo los valores, **y** corresponde al valor de la absorbancia a la cual se leyó, 595 nm; **m** es igual a la pendiente de la recta, 0.1237; **b** es la ordenada en el origen, 0.0008 y **x** es la concentración de proteína de interés.

También se calculó el coeficiente de correlación ( $R^2$ ), con el fin de determinar la calidad del modelo para replicar los resultados y la proporción de variación de los resultados. Obteniendo un resultado de 0.9689 (Gráfica 1).



**Gráfica 1 Curva patrón de BSA.** Se realizó a 7 concentraciones diferentes (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

Al obtener la ecuación de la recta se despeja x para obtener las concentraciones de la proteína rTcENO recolectada de distintas purificaciones, siendo la más alta concentración 7.91  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabla 4).

Proteína	Concentración final $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Concentración final $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Concentración final $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Concentración final $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
	1ra purificación	2da purificación	3ra purificación	4ta purificación
Eluido 1	5.818108327	6.335489086	7.919967664	7.19240097
Eluido 2	3.287793048	4.945028294	6.392077607	5.721099434
Eluido 3	3.166531932	3.64349232	5.818108327	4.120452708
Eluido 4	0.143088116	0.151172191	0.620048504	0.506871463

**Tabla 4 Concentraciones obtenidas de la rTcENO.** Concentraciones de la proteína rTcENO en diferentes purificaciones.

#### 4.4 Protocolo de inmunización y sangrado de los ratones

Se estableció el protocolo de inmunización con un tiempo de duración de 30 días, contemplaba 4 inmunizaciones de la proteína rTcENO en el grupo problema, la primera inmunización fue con adyuvante de Freud completo y las 3

inmunizaciones restantes con adyuvante de Freud incompleto. En el caso del grupo control negativo se inmunizó PBS estéril y adyuvante de Freud.

El manejo de los animales se llevó a cabo acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El peso de cada uno de los ratones oscilaba entre los 20 a 25 gramos.

El animal se sujetó realizando una pinza en el pliegue cutáneo dorsal del cuello con los dedos índice y anular. El animal debe permanecer en posición horizontal sobre una mesa y con el resto de la mano se debe hacer una leve fuerza para garantizar la inmovilidad del animal. Luego el pliegue dorsal debe dirigirse levemente con los dedos en dirección vertical con lo cual se formará un triángulo cutáneo con la piel estirada y el aspecto dorsal del cuello (Pontificia Universidad Javeriana, 2009).

Una vez el animal este inmovilizado, se sujetó la jeringa con la mano libre. Para ello se tomó la jeringa con los dedos índice y anular en dirección latero medial, el dedo pulgar debe ubicarse en el mango del embolo. Con esta ubicación se observó que el embolo de la jeringa este hacia arriba, así la jeringa debe dirigirse en ángulo de 45 grados con relación al aspecto dorsal del animal, se realizó un movimiento suave de la mano que sostiene la jeringa en dirección caudal y se percibe como la aguja atraviesa las capas de la piel que ofrecen una leve resistencia. Cuando se han penetrado estas capas la aguja se siente libre en el espacio subcutáneo.

Una vez esté ubicada la jeringa, se inició la administración de la sustancia, esta se hizo a una velocidad media observando si hay algún tipo de reacción anormal en el animal (ilustración 16). Si durante la administración se empieza a formar un abultamiento debe detenerse el procedimiento y reubicar la aguja a un espacio subcutáneo libre (el abultamiento indica que el inoculo está acumulándose en las capas de la piel o en las fascias musculares). Una mala administración de la sustancia puede desarrollar un seroma en donde se perderá el efecto deseado por la inoculación.

Una vez se termine la instilación, la jeringa debe ser retirada del animal, esto no suele presentar complicaciones (Pontificia Universidad Javeriana, 2009).



**Ilustración 16 Vía de administración subcutánea en ratón.** Administración de una sustancia por vía subcutánea en ratón (Pontificia Universidad Javeriana, 2009).

En las inmunizaciones realizadas por vía subcutánea (ilustración 17) no se presentó ningún inconveniente ni complicación, los ratones presentaban una conducta normal antes y después de ser inmunizados. La inmunización no causó alguna reacción que pudiera afectar con el estudio, los animales no sufrieron daño visible (caída de pelo, cojera temporal, inflamación) ni su peso se vio afectado durante el tiempo del estudio.

Tres días después de concluir con las inmunizaciones, se sangro de la cola para comprobar que se tenía un buen título de anticuerpos (1:10,000). El rendimiento de suero fue de 100  $\mu$ L.



**Ilustración 17 Inmunización por vía subcutánea en ratón BALB/C hembra.** Inmunización de la rTcENO con adyuvante de Freud incompleto.

Al pasar 30 días después de la última inmunización, los ratones fueron sangrados por una punción cardíaca, previamente sedados por vía intraperitoneal con Ketamina 80 mg y Xilacina 10 mg en relación con su peso, obteniendo de cada ratón aproximadamente 600  $\mu$ L de sangre y 200  $\mu$ L de suero (ilustración 18).



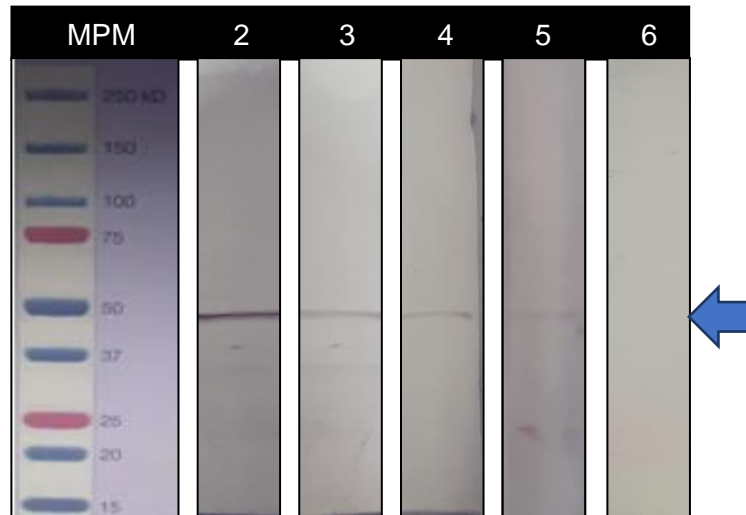
*Ilustración 18 Punción cardíaca en ratón BALB/c hembra.*

#### **4.5 Análisis de interacción del extracto total de *T. cruzi* con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO y títulos de anticuerpos policlonales**

Después de obtener el suero hiperinmune de los 6 ratones mediante un Western Blot se realizó la interacción del extracto total de *T. cruzi* con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO, al igual que se observó los títulos de anticuerpos que estén presentes en el suero hiperinmune. Se colocó el extracto total de *T. cruzi* como muestra, se corrió en un gel de poliacrilamida SDS.PAGE, se realizó la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa.

Previamente se realizaron 2 pools, el primero con 10  $\mu$ L de suero hiperinmune de cada ratón del grupo problema y el segundo pool fue con el grupo control negativo. Después se realizó 4 diluciones con el primer pool (1:1000, 1:5000, 1:10,000 y 1:20,000 con PBS estéril a 1x) siendo estos los anticuerpos anti-rTcENO y con el segundo pool se hizo una dilución (1:1000 con PBS estéril a 1x).

En el caso del grupo problema se observa una banda de 46.01 KDa en todas las diluciones lo que indica la presencia de anticuerpos anti-rTcENO, por el contrario, en el grupo control no hay presencia de anticuerpos (ilustración 19).



**Ilustración 19 Western Blot, interacción del extracto total de *T. cruzi* con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO y títulos de anticuerpos policlonales.** La proteína rTcENO fue inducida con IPTG, migrada mediante electroforesis SDS\_PAGE al 12% y transferida a una membrana de nitrocelulosa. El primer anticuerpo es Anti-rTcENO y el segundo es IgG Anti-ratón en cabra acoplado a fosfatasa alcalina. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: dilución 1:1000; carril 3: 1:5000; carril 4: 1:10,000; carril 5: 1:20,000; carril 6: control negativo (1:1000).

Al colocar extracto total de *T. cruzi* (enolasa nativa) se corrobora que los anticuerpos generados en la inmunización de rTcENO son altamente específicos y alcanzan un título de anticuerpos 1:20,000.

#### 4.6 Cuantificación de anticuerpos policlonales

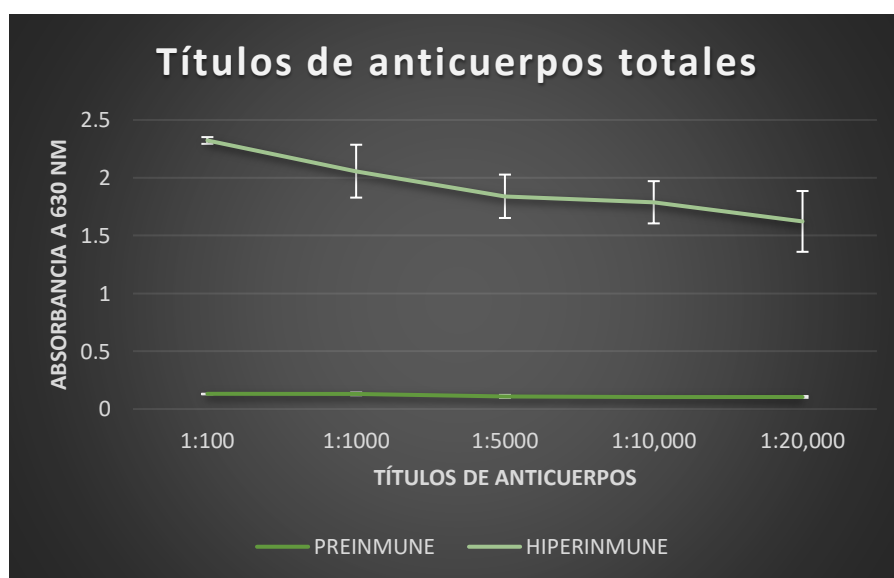
Con el fin de corroborar los datos obtenidos anteriormente y conocer si existía diferencia entre el suero preinmune e hiperinmune de los 4 ratones del grupo problema y los 2 ratones del grupo control negativo se realizó un ELISA, en el cual fueron evaluados por separado junto con un blanco los títulos de anticuerpos (1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10,000, 1:20,000), esto se hizo por triplicado. Además, se calculó la desviación estándar de ambos grupos en los títulos de anticuerpos totales (tabla 5).

Títulos de anticuerpos	1:100	1:1000	1:5000	1:10,000	1:20,000
Preinmune	0.130	0.131	0.109	0.104	0.105
Hiperinmune	2.19	1.92	1.73	1.68	1.51
Desviación estándar	0.03	0.23	0.19	0.18	0.26

**Tabla 5 Cuantificación de anticuerpos policlonales mediante ELISA.** Se observa las absorbancias de los títulos de anticuerpos en los dos grupos, el preinmune y el hiperinmune, además de la desviación estándar

entre estos dos grupos.

Al graficar la absorbancia de los sueros preinmunes e hiperinmunes acorde con los títulos de anticuerpos policlonales que se evaluó (1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10.000, 1:20,0000) se observó que el suero hiperinmune es mucho mayor en absorbancia que el suero preinmune en todos los títulos. Se obtuvo la desviación estándar de los datos antes reportados para ver qué tan dispersos están estos con respecto a la media (Gráfica 2).



**Gráfica 2 Títulos de anticuerpos totales.** Evaluación del grupo preinmune y del grupo hiperinmune a los diferentes títulos de anticuerpos policlonales mediante ELISA, la desviación estándar de cada uno fue: 1:100 (0.03), 1:1000 (0.23), 1:5000 (0.19), 1:10,000 (0.18) y 1:20,000 (0.26).

#### 4.7 Determinación del isotipo de inmunoglobulina

El ensayo para determinar el isotipo de los anticuerpos generados por la inmunización de rTcENO fue mediante un ELISA (tabla 6).

ISOTIPO	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM
Blanco	0.1475	0.1475	0.1475	0.1475	0.1475	0.1475
Preimmune	0.0945	0.1325	0.0965	0.1105	0.1325	0.1265
Control 1	0.1845	0.2185	0.1995	0.2175	0.2095	0.2175
Control 2	0.1885	0.2015	0.2185	0.2215	0.1985	0.2465
Ratón 1	1.7015	1.3475	0.9305	1.1625	1.2235	0.4355
Ratón 2	1.8925	1.4155	0.9355	1.2465	1.1845	1.2305
Ratón 3	1.8055	1.5045	1.3935	1.2685	1.2975	1.4045
Ratón 4	1.8245	1.6195	1.7295	1.6975	1.6225	1.8235

**Tabla 6 Evaluación de isotipo de inmunoglobulina de los sueros preinmunes, controles negativos y sueros obtenidos de la inmunización de rTcENO. En los datos obtenidos se restó el blanco.**

Al realizar el análisis estadístico ANOVA se ocupó el programa Minitab® 18 que proporcionó la hipótesis nula y alternativa para determinar si las diferencias entre las medias de los grupos son estadísticamente significativas (tabla 7).

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

**Tabla 7 Hipótesis nula e hipótesis alternativa. Esta tabla fue recuperada de un análisis estadístico realizado en Minitab® 18, Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.**

En el análisis de varianza se calculó mediante este programa los grados de libertad (GL), el ajuste de suma de cuadrados (SC Ajust), el ajuste de cuadrados medios (CM), valor F y el valor p (tabla 8). El valor p da un resultado de 0.001, siendo menor que el valor del nivel de significancia, 0.05 rechazando la hipótesis nula, no todas las medias de población son iguales.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Anticuerpos	8	5.066	0.6332	6.31	0.001
Error	18	1.806	0.1003		
Total	26	6.871			

**Tabla 8 Análisis de Varianza. El valor p es menor al nivel de significancia ( $\alpha$ ), lo que indica que la diferencia de los datos proporcionados es estadísticamente significativa y se rechaza la hipótesis nula de la prueba.**

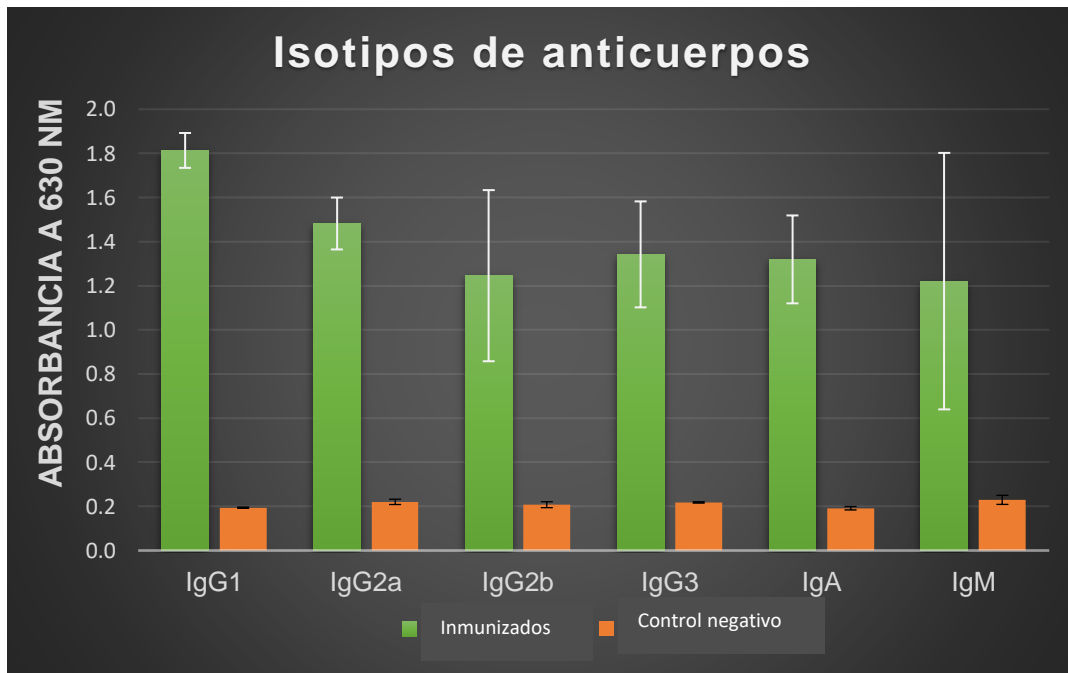
De misma manera se obtuvo las medias de los anticuerpos generados, el suero preimmune y el control negativo. La desviación estándar (Desv. Est.) también fue

reportada de cada uno como la agrupada que dio un valor de 0.3167, el número de datos de cada grupo de datos (N) y el intervalo de confianza de 95% (tabla 9).

Anticuerpos	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Control negativo	1	0.2125	0.013	(-0.4529, 0.8770)
Control negativo	1	0.2078	0.021	(-0.4576, 0.8732)
IgA	4	1.3320	0.20	(0.9993, 1.6647)
IgG1	4	1.8060	0.08	(1.4733, 2.1387)
IgG2a	4	1.5398	0.12	(1.2070, 1.8725)
IgG2b	4	1.247	0.39	(0.915, 1.580)
IgG3	4	1.344	0.24	(1.011, 1.676)
IgM	4	1.224	0.58	(0.891, 1.556)
Preinmune	1	0.1155	0.012	(-0.5499, 0.7809)

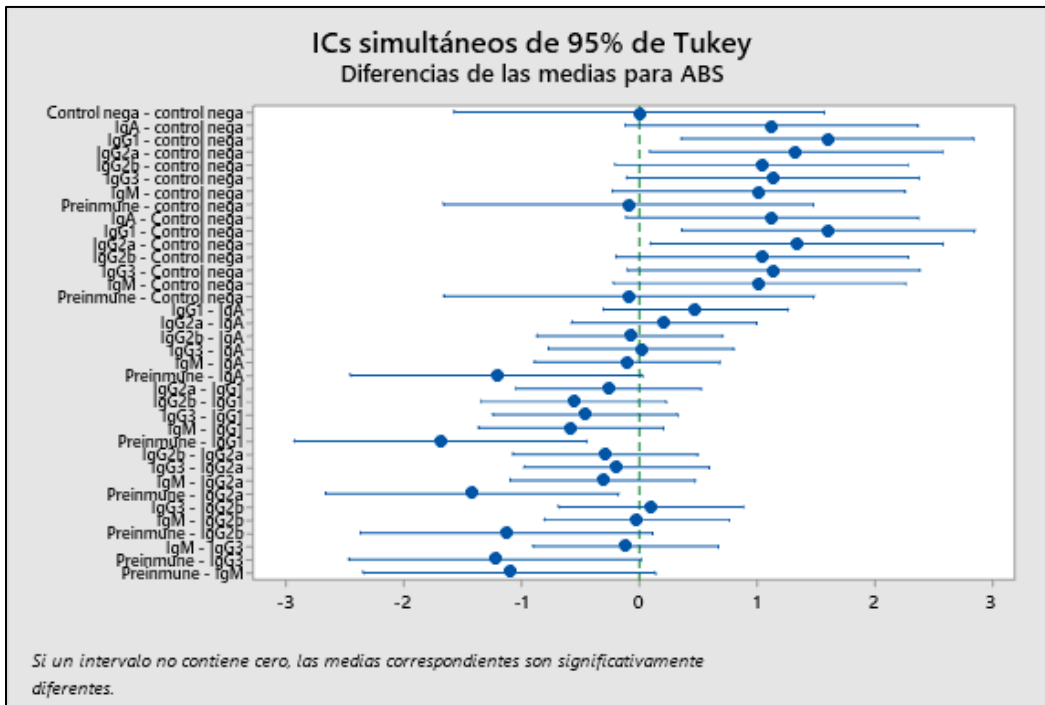
**Tabla 9 Medias de los grupos hiperinmune, preinmune y blanco.** Se reportan los números de datos (N), la desviación estándar (Desv. Est.) y el intervalo de confianza de 95% de cada uno de los grupos.

De acuerdo con la tabla 8, las medias de los isotipos de los anticuerpos fueron: IgG1>IgG2a>IgG3>IgA>IgG2b>IgM (gráfica 3).



**Gráfica 3 Evaluación de los isotipos de los anticuerpos.** Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los sueros del control negativo y los hiperinmunes, inmunizados con la rTcENO \*(p=0.001).

En el ensayo Tukey (gráfica 4) se muestra una gráfica que incluye los intervalos de confianza simultáneos de Tukey. Los rangos no incluyen cero, lo que indica que la diferencia entre estas medias es significativa.



**Gráfica 4 Método Tukey de los isotipos de inmunoglobulina de los sueros preinmunes, controles negativos y sueros obtenidos de la inmunización de rTcENO. Ningún intervalo contiene 0, las medias correspondientes son significativamente diferentes.**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, es transmitido principalmente a humanos mediante heces infectadas de insectos triatomíneos hematófagos o mediante la transfusión de sangre infectada, trasplante de órganos infectados, transmisión de una madre infectada a su hijo vía connatal (Carabarin et al., 2013). Se estima que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, la mayoría de ellas proceden en América Latina, por lo cual se considera una enfermedad de importancia para su tratamiento (WHO, 2017). Actualmente, solo dos medicamentos, benznidazol y nifurtimox están autorizados, aunque su efectividad solamente es en la fase aguda (Pérez y Molina, 2017). Debido a esto, es necesario una vacuna contra la enfermedad de Chagas, basándonos en el estudio “Enfoque *in silico* para la identificación de propiedades inmunológicas de la enolasa de *Trypanosoma cruzi* y su posible utilidad como vacuna en la enfermedad de Chagas” realizado por Carabarin-Lima y colaboradores se

concluye que la enolasa de *T. cruzi* es un potente inmunógeno para desarrollar una vacuna candidata (Carabarán et al., 2014).

En lo ya descrito anteriormente, este trabajo se estudió las propiedades inmunogénicas de la proteína recombinante enolasa de *Trypanosoma cruzi* (rTcENO) para determinar su uso potencial como vacuna en la enfermedad de Chagas.

En este trabajo se obtuvo el plásmido pRSETB::TcENO de la cepa de mantenimiento *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se realizó una digestión enzimática con las enzimas KpnI y HindIII que liberó un fragmento con un peso molecular de 1.1 Kb, que corresponde con el gen de la rTcENO reportada por Carabarán en 2014 que se muestra con una flecha azul en la ilustración 12 (Carabarán et al., 2014).

Al purificarse la rTcENO se visualizó en un SDS-PAGE al 12% con un peso molecular de 46.5 kDa como se había reportado previamente (Carabarán et al., 2014) como se muestra en la ilustración 14 hay una banda de menor peso que corresponde a proteólisis de la proteína recombinante, esto puede deberse por el exceso de sonicación, cambios de temperatura en la columna y proteólisis por metaloproteasas. Sin embargo, se confirmó mediante western blot utilizando el anticuerpo anti-histidinas; debido a que la proteína está fusionada a una etiqueta de histidinas (His-tag). En este resultado se observa una banda de peso menor que muestra la degradación de la rTcENO como se muestra en la ilustración 15 ya que también esta fusionada con la His-tag, se confirma que es nuestra proteína degradada. El peso observado en la rTcENO coincide con los pesos de las enolasas de *V. parahaemolyticus* (48 kDa), *S. iniae* (47 kDa), *C. albicans* (47 kDa), *T. cruzi* (46.01 kDa.) *A. actinomycetemcomitans* (47 kDa) (Hara et al., 2000) (Jiang et al., 2014; Wang et al., 2015; Sundstrom et al., 1992; Carabarán-Lima et al., 2014), de tal manera que el aumento en el peso de la recombinante, es debido a la etiqueta de histidinas fusionada al extremo N-terminal, una secuencia estabilizadora de transcripción del gen 10 del fago T7, el epítipo Xpress™ y la secuencia de reconocimiento de escisión de la enteroquinasa, las cuales se

encuentran río arriba del inserto de ADN y son codificadas por el plásmido (Carabarán-Lima et al., 2014).

Las etiquetas de afinidad son herramientas altamente eficientes para purificar proteínas de extractos crudos. Se realizó la cuantificación de nuestra proteína gracias a una curva estándar de BSA que se muestra en la gráfica 1, al ajustar por mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación general de la recta, por ende, se despejó la ecuación y se obtuvo las concentraciones que hubo en los eluidos de diferentes purificaciones como se muestra en la tabla 4, siendo la concentración más alta  $7.91 \text{ mg/mL}$ .

En el trabajo “*Comparison of affinity tags for protein purification*” de Lichty y colaboradores publicado en 2005 comparan la eficiencia de ocho etiquetas de afinidad eluibles para purificar proteínas de extractos de *Escherichia coli*, levadura, *Drosophila* y HeLa para facilitar la selección de etiquetas de afinidad para proyectos de purificación. Sus resultados muestran que las etiquetas de péptido HIS, CBP, CYD (péptido NorpD covalente pero dissociable), Strep II, FLAG, HPC (cadena pesada de proteína C) y los sistemas de etiqueta de fusión de proteínas GST y MBP difieren sustancialmente en rendimiento y pureza como se muestra en la tabla 10 La etiqueta CBP produjo proteína de pureza moderada a partir de extractos de *E. coli*, levadura y *Drosophila*, pero mejor pureza a partir de extractos de HeLa. Las etiquetas basadas en epítomos como FLAG y HPC produjeron la proteína de mayor pureza para todos los extractos, pero requieren resina costosa y de baja capacidad. Esos resultados sugieren que la etiqueta Strep II puede proporcionar un compromiso aceptable de excelente purificación con buenos rendimientos a un costo moderado. A comparación con las otras etiquetas de afinidad, la etiqueta de HIS proporciona buenos rendimientos de proteína marcada de resinas económicas y de alta capacidad, pero con una pureza moderada de los extractos de *E. coli* y una purificación relativamente pobre de los extractos de levadura, *Drosophila* y HeLa (Lichty et al., 2005). La rTcENO en su rendimiento más alto fue de  $7.9 \text{ mg/mL}$  y los eluidos tuvieron una pureza buena como se

muestra en la ilustración 14. Por lo tanto, la His-tag es una alternativa viable para la purificación de la enolasa recombinante de *T. cruzi*.

<b>Etiqueta</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Resina</b>	<b>Agente eluyente</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Fuente</b>
<b>Glutación-S-transferasa (GST)</b>	218	GSH-Sepharose	Glutación	10 mg/ml	Amersham
<b>Histidinas (HIS)</b>	6	Ni-NTA	Imidazol	5–10 mg/ml	Qiagen
<b>Proteína de unión a maltosa (MBP)</b>	396	Amilasa	Maltosa	3 mg/ml	Biolabs
<b>Péptido de unión a calmodulina (CBP)</b>	28	Afinidad de la calmodulina	Ácido egtazico	2 mg/ml	Stratagene
<b>Estreptividina (STR)</b>	8	Strep-Tactin-Sepharose	Destiobiotina	50–100 nmol/ml	IBA
<b>Cadena pesada de proteína C (HPC)</b>	12	Matriz de MAb anti-proteína C	EDTA	2–10 nmol/ml	Roche
<b>FLAG</b>	8	Anti-FLAG M2 MAb agarosa	Péptido FLAG	0.6 mg/ml	Sigma
<b>Péptido NorpD covalente pero disociable (CYD)</b>	5	InaD	Dicloro difenil tricloroetano	>0.2 mg/ml	N/A

**Tabla 10 Comparación de las tecnologías de etiquetas afinidad.** Modificado de: (Lichty et al. 2005).

A continuación, se realizó el esquema de inmunización que se muestra en la tabla 3 junto con los componentes de cada una, se realizaron un total de 4 inmunizaciones y se dividieron al azar los 6 ratones hembra BALB/C; 4 como

grupo problema y 2 como control negativo. Todas las inmunizaciones fueron por vía subcutánea como se observa en la ilustración 17.

Esta vía se administra en la capa subcutánea sobre el músculo y debajo de la piel. Después de que se inyecta un medicamento, se mueve hacia pequeños vasos sanguíneos (capilares) y se lo lleva el torrente sanguíneo. Alternativamente, un medicamento llega al torrente sanguíneo a través de los vasos linfáticos. La ruta subcutánea se usa para muchos medicamentos proteicos porque dichos medicamentos se destruirían en el tracto digestivo si se tomaran por vía oral (Le, 2019).

Realizando una comparación con otras rutas de administración se sabe que la vía intradérmica es muy difícil en el ratón debido a su piel delgada por lo cual no se recomienda en general y debería restringirse a casos de absoluta necesidad (Saloga et al.,1993). Se verá una ampolla dura después de una inyección intradérmica exitosa e incluso una pequeña cantidad de fluido (Suckow et al., 2000).

Por ejemplo, en la vía intramuscular, la absorción aún puede ser impredecible si las periferias son mal perfundidas, además pueden causar hematomas. Aunque tiene una mejor absorción de la sustancia inyectada. Finalmente, en la vía oral tiene una absorción muy lenta e impredecible debido a la degradación por el ácido del estómago y enzimas (Shimizu,2004).

Las administraciones subcutáneas son fáciles, ya que es raramente doloroso y generalmente, se puede usar un ratón consciente (Wolfensohn y Lloyd, 1994) En contraste, la tasa de absorción es menor que las inyecciones intraperitoneales o intramusculares (Simmons y Brick, 1970).

Sin embargo, la vía de administración subcutánea se ha utilizado en diversos estudios para administrar una vacuna que proteja contra la enfermedad de Chagas. En el estudio *“Respuestas de isotipo de anticuerpo en ratones BALB/c inmunizados con el antígeno citoplásmico repetitivo y el antígeno flagelar repetitivo*

de *Trypanosoma cruzi*” realizado por Pereira y colaboradores se inmunizaron en tres ocasiones a ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad por vía subcutánea con un antígeno recombinante repetitivo T citotóxico (CRA) (20µg) y un antígeno repetitivo flagelar (FRA) (12 µg) a intervalos de 20 días. La primera dosis se emulsionó en adyuvante completo de Freud y la siguiente en adyuvante incompleto de Freud. Se usó el mismo programa para ratones de control que recibieron solo adyuvante. El CRA recombinante generó altos niveles de IgG3 e IgG1, mientras que solo la IgG1 fue inducida por FRA recombinante. Concluyendo su investigación, sugirieron que el isotipo IgG3 juega un papel importante en la protección (Pereira et al, 2003).

En otro estudio realizado por Luhrs y colaboradores, llamado “*La inmunización con proteína de barra paraflagellar recombinante induce inmunidad protectora contra la infección por Trypanosoma cruzi*”, se clonó, purificó e inmunizó por vía subcutánea a ratones hembra C57BL/6 de seis a ocho semanas de edad, la proteína de barra paraflagellar recombinante (PFR), estos animales mostraron protección asociada con un perfil de citoquinas Th1. La inmunización con PFR-1, PFR-2, PFR-3 o una mezcla equimolar favoreció una reducción del 70%, 73%, 51% y 74% en la parasitemia, respectivamente (Lursh, 2003).

Estos estudios nos confirman que la vía subcutánea es una buena opción para administrar una vacuna contra la enfermedad de Chagas, ya que en ambos estudios se reportó una respuesta inmune Th1.

Los sueros preinmunes e hiperinmunes (los inmunizados con la rTcENO y los inmunizados con PBS estéril) se realizaron inmunoensayos. El primero fue en análisis de interacción del extracto total de *T. cruzi* con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO y títulos de anticuerpos policlonales mediante western blot, en la ilustración 19 se muestra la interacción del extracto total con los anticuerpos policlonales generados por la respuesta de la rTcENO además de analizarse los títulos de anticuerpos que estén presentes en el pool de suero hiperinmune y el pool del grupo control negativo, dando como resultado en los sueros hiperinmune una banda de 46.5 KDa en las diluciones 1:1000, 1:5000,

1:10,000 y 1:20,000, en cambio en el grupo control negativo no se observa ninguna banda por lo que se concluye que los anticuerpos policlonales generados por las inmunizaciones de la rTcENO son altamente específicos.

Los títulos de anticuerpos policlonales generados y el suero preinmune fueron analizados mediante un ELISA obteniendo las absorbancias a 630 nm que se muestran en la tabla 5. Se adicionó un análisis estadístico mostrando la desviación estándar de ambos grupos y se observa su dispersión con respecto a la media y dando una diferencia estadísticamente significativa. Al graficar los datos, en todos los títulos analizados se aprecia una gran diferencia entre los sueros preinmunes y los sueros hiperinmunes de todos los títulos (1:1000, 1:5000, 1:10,000 y 1:20,000). Se observó la inducción de títulos altos de anticuerpos policlonales a 1:20,000 en contra de rTcENO. En los sueros preinmunes se observan las absorbancias muy bajas en todos los títulos. Con este experimento se confirma que las inmunizaciones con la rTcENO tienen una buena inmunogenicidad con respecto a los sueros preinmunes.

La rTcENO tiene un alto nivel de títulos de anticuerpos en comparación de una vacuna de ADN-prime / MVA-boost (TcVac3) realizada por Gupta y Garg en 2013, en el cual su nivel de títulos de anticuerpos es de 1:100 a 1:1000 (Gupta y Garg, 2013).

En la tabla 6 se muestran los isotipos de anticuerpos generados por rTcENO, del suero preinmune y del grupo control negativo que fueron evaluados mediante un ELISA. Para este experimento se realizó un análisis estadístico en el programa Minitab® 18, para realizar un análisis de varianza (ANOVA) el cual ayudo a probar las diferencias en los resultados entre todos los grupos que recibieron diferentes esquemas de inmunización. Además, se utilizó el método Tukey para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel específico.

El programa proporciona 2 hipótesis: una nula (las medias son iguales) y una alternativa (las medias no son iguales) que se muestra en la tabla 7. En la tabla 8, se muestra **p** el con un valor de 0.019, siendo menor que el nivel de significancia; al ser menor se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa concluyendo que las inmunoglobulinas tienen medias diferentes.

En la tabla 9, se muestran las medias, la desviación estándar y el intervalo de confianza de los anticuerpos generados, el suero preinmune y el blanco. De acuerdo con esto, el isotipo de anticuerpos fue: IgG1>IgG2a>IgG3>IgA>IgG2b>IgM.

Al tener altos niveles de producción de IgG se puede inferir que la expresión de estos isotipos sugiere la inducción de una respuesta inmune mixta Th1/Th2, lo que indica una respuesta humoral y celular. El subconjunto Th1 tiene a su cargo muchas funciones mediadas por células, por ejemplo, hipersensibilidad de tipo tardío activación de células T citotóxicas y la producción de anticuerpos IgG que promueven la opsonización, los anticuerpos se unen a receptores Fc de alta afinidad de fagocitos e interactúan con el sistema del complemento. Este subconjunto también interviene en la promoción de inflamación y lesión tisular excesiva. El subconjunto Th2 estimula la activación y diferenciación de eosinófilos, proporciona ayuda a células B y favorece la producción de cantidades relativamente grandes de IgM, IgE e isotipos de IgG que no activan complemento (Kindt, T. J. et al., 2007).

La producción de los anticuerpos IgG2a e IgG2b se debe a la proliferación policlonal de linfocitos B de memoria, la presencia de estos en mayor cantidad causados por una respuesta Th2, los anticuerpos IgG1 e IgG3 dan como respuesta Th1 para la eliminación del parásito. Tras la presentación antigénica a las células Th y su diferenciación a células Th2, las citocinas interleucina-10 (IL-10), IL-4 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) están involucradas en la maduración preferencial de las células B (cambio de isotipo y diferenciación) comprometidas en la producción de IgA. La IgM es el primer tipo de inmunoglobulina sintetizada en respuesta a una infección (Arce et al., 2018).

En los estudios realizados en este trabajo antes descritos, los estudios experimentales e *in silico* realizados por Carabarán y colaboradores en 2014 nos ayudó a confirmar la hipótesis que las características estructurales de la rTcENO generaron una respuesta inmune favorable con la producción de anticuerpos policlonales protectores contra el agente etiológico, *T. cruzi* que causa la infección parasitaria llamada enfermedad de Chagas (Carabarin et al., 2014).

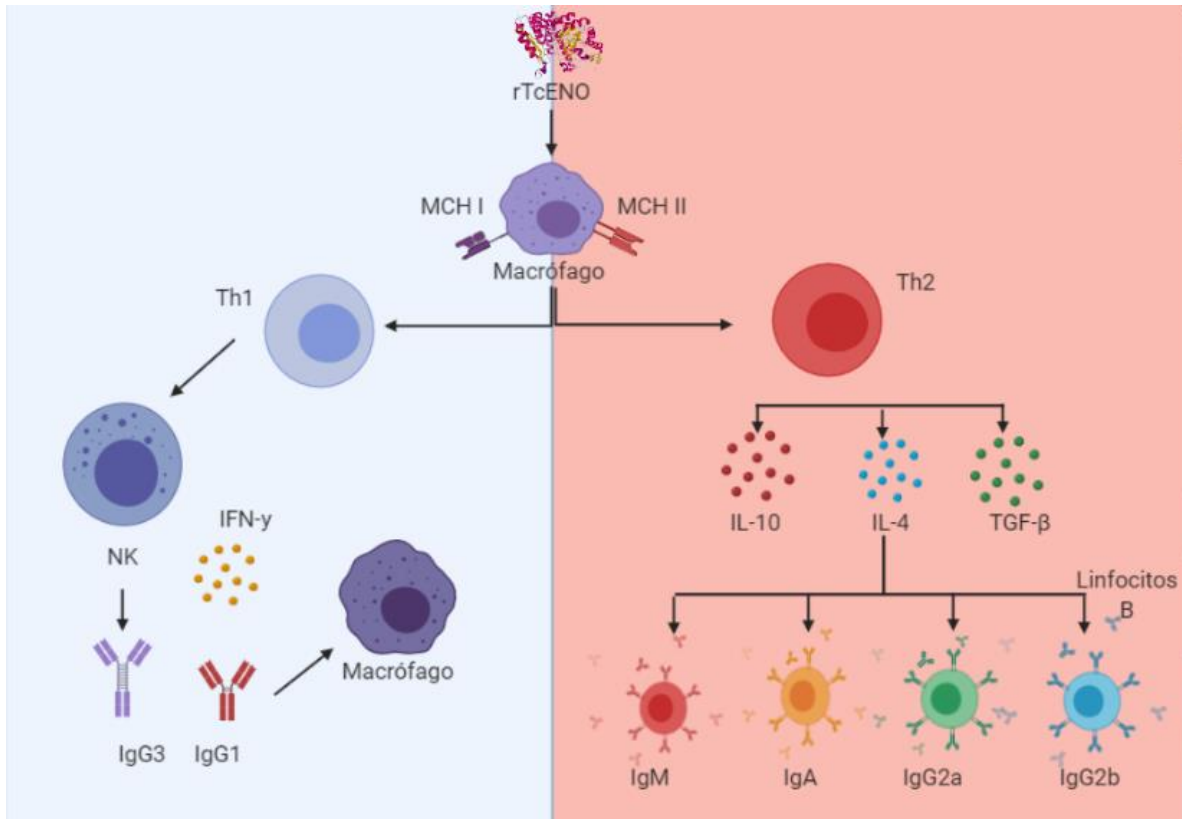
La vía subcutánea se ha utilizado para otros estudios de inmunización, en el estudio de Pereira y colaboradores el CRA recombinante generó altos niveles de IgG3 e IgG1, mientras que solo la IgG1 fue inducida por FRA recombinante. En la enfermedad de Chagas, la respuesta Th1 es importante porque los anticuerpos pueden proteger a los animales, reduciendo así la parasitemia y la mortalidad (Pereira et al, 2003).

Al igual que CRA y FRA recombinante, la proteína de barra paraflagelar recombinante (PFR) ha demostrado previamente que es altamente efectiva para reducir la parasitemia aguda y proporciona una protección del 100% contra un desafío letal con una cepa altamente virulenta de *T. cruzi*. Esta inmunidad protectora se caracteriza por una respuesta inmune Th1 altamente polarizada, demostrada por la producción de altos niveles de IFN y niveles indetectables de IL-4 por células T CD4+ específicas de PFR en respuesta al antígeno PFR en presencia de células presentadoras de antígeno (Lursh, 2003).

Sin embargo, ninguno de estos 2 estudios obtuvo una respuesta mixta Th1/Th2 como la rTcENO, confirmando que es un buen candidato como inmunógeno.

Por último, Arce y colaboradores en el 2018, reporta haber obtenido resultados similares a este trabajo en el cual el sistema inmune fue capaz de generar anticuerpos específicos típicos (IgG1, IgG2a e IgG2b). Se considera obligatoria la respuesta Th1 para la eliminación del parásito, la cual se comprobó con los niveles altos de anticuerpo IgG1 y al haber una proliferación de linfocitos B de memoria, una característica importante es la producción de anticuerpos IgG2a e IgG2b, los cuales fueron causados por una respuesta de tipo Th2. Esto sugiere que la

respuesta inmune de citocinas es mixta Th1/Th2, indicando una respuesta inmune humoral y celular, lo cual es ideal para la eliminación del parásito (Arce et al., 2018).



**Ilustración 20** Mecanismo inmunológico de la rTcENO.

## CONCLUSIONES

- La purificación de la proteína rTcENO se logró purificar a homogeneidad mediante columna por afinidad a níquel.
- Se elaboro un protocolo de inmunización por vía subcutánea en un modelo murino.
- Los anticuerpos policlonales generados demostraron ser específicos al reconocer a la TcENO nativa.
- Se determinó Los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM de los anticuerpos generados por la inmunización con la rTcENO.
- Estos resultados indican que rTcENO administrada por vía subcutánea podría ser un candidato potencial para el desarrollo de una vacuna en contra de *T. cruzi*.

## PERSPECTIVAS

- Diseñar un protocolo más eficiente de purificación para la rTcENO para posteriormente, escalarlo.
- Retar a un biomodelo con una dosis letal del parásito para evaluar la protección que confiere la inmunización con rTcENO por vía subcutánea mediante curvas de sobrevivencia.
- Determinar y caracterizar el tipo de citocinas producidas mediante citometría de flujo.

## BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Serrano, A., Almeida, I. C., Freitas-Junior, L. H., Yoshida, N., & Schenkman, S. (2001). The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Molecular and biochemical parasitology*, 114(2), 143-150.

Addgene Vector Database (2019). Plasmid: pRSET-B. Recuperado de: <https://www.addgene.org/vector-database/3991/>. consultado el: 07/10/2019.

Alencar, A. A., Brito, C. M. M., & Azevedo, B. A. (1991). Studies on the infectivity of semen from *Trypanosoma cruzi*-infected mice with destruction of neuronal structures. *Rev Bras Neurol*, 27, 51-56.

Arce-Fonseca, M., González-Vázquez, M. C., Rodríguez-Morales, O., Graullera-Rivera, V., Aranda-Fraustro, A., Reyes, P. A., ... & Rosales-Encina, J. L. (2018). Recombinant enolase of *Trypanosoma cruzi* as a novel vaccine candidate against Chagas disease in a mouse model of acute infection. *Journal of immunology research*, 2018.

Araujo, Perla F, Almeida, Adriana B, Pimentel, Carlos F, Silva, Adriano R, Sousa, Alessandro, Valente, Sebastião A, Valente, Vera C, Britto, Manuela M, Rosa, Ana C, Alves, Rozeneide M, Hagström, Luciana, & Teixeira, Antonio RL. (2017). Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(6), 437-446. <https://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160538>

Arza B., Felez J., Lopez-Aleman R., Miles L. A. and Munoz-Canoves P. (1997) Identification of an epitope of a-enolase (a candidate plasminogen receptor) by phage display. *Thromb. Haemost.* 78: 1097–1103

Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P. A., & Concepción, J. L. (2011). Enolase: a key player in

the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme research*, 2011.

Balouz, V., Agüero, F., & Buscaglia, C. A. (2017). Chagas Disease Diagnostic Applications: present knowledge and future steps. In *Advances in parasitology* (Vol. 97, pp. 1-45). Academic Press.

Bargues, M.D., Klisiowicz, D.R., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J.M., Monroy, C., Ponce, C., et al., (2008). Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e233.

Becerril-Flores, M.A., Valle-De La Cruz, A., 2003. Description of Chagas disease in the Valle de Iguala, Guerrero state, Mexico-Marco. *Gac. Med. Mex.* 139, 539–544.

Becerril-Flores, M.A., Rangel-Flores, E., Imbert-Palafox, J.L., Gomez-Gomez, J.V., Figueroa-Gutierrez, A.H., (2007). Human infection and risk of transmission of Chagas disease in Hidalgo State, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 318–323.

Bern, C. (2011). Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 364(26), 2527-2534.

Carabarin-Lima, A., González-Vázquez, M. C., Rodríguez-Morales, O., Baylón-Pacheco, L., Rosales-Encina, J. L., Reyes-López, P. A., & Arce-Fonseca, M. (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta tropica*, 127(2), 126-135.

Carabarin-Lima, A., Rodríguez-Morales, O., González-Vázquez, M. C., Baylón-Pacheco, L., Reyes, P. A., Arce-Fonseca, M., & Rosales-Encina, J. L. (2014). In silico approach for the identification of immunological properties of enolase from *Trypanosoma cruzi* and its possible usefulness as vaccine in Chagas disease. *Parasitology research*, 113(3), 1029-1039.

Carrasco, H. J., Torrellas, A., García, C., Segovia, M., & Feliciangeli, M. D. (2005). Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *International Journal for Parasitology*, 35(13), 1379–1384. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2005.05.003>

Carvalho, L. O. P., Abreu-Silva, A. L., Hardoim, D. D. J., Tedesco, R. C., Mendes, V. G., Da Costa, S. C. G., & Calabrese, K. D. S. (2009). *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *International journal of experimental pathology*, 90(1), 52-57.

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

Chen, N., Yuan, Z. G., Xu, M. J., Zhou, D. H., Zhang, X. X., Zhang, Y. Z., ... & Zhu, X. Q. (2012). *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine*, 30(23), 3478-3482.

Coura, J.R., Viñas, P.A., (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6–S7

De Souza, W., de Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International journal of cell biology*, 2010.

Dias, J., Schofield, C., (1999). The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1), 103–121.

Dias, J.C., (2000). Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad. Saude Publica* 16 (Suppl. 2), 43–59.

Díaz-Ramos, À., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A., & López-Aleman, R. (2012).  $\alpha$ -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *BioMed Research International*.

Doumonteil, E., (1999). Update Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública Mex.* 41, 322-327

Dumonteil E., Escobedo-Ortegon J., Reyes-Rodriguez N., Arjona-Torres A., Ramirez-Sierra J. (2004) Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infect Immun* 72(1):46–53

Duffy, T., Cura, C.I., Ramirez, J.C., Abate, T., Cayo, N.M., Parrado, R., Bello, Z.D., Velazquez, E., Muñoz Calderon, A., Juiz, N.A., Basile, J., Garcia, L., Riarte, A., Nasser, J.R., Ocampo, S.B., Yadon, Z.E., Torrico, F., de Noya, B.A., Ribeiro, I., Schijman, A.G. (2013) Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 7:e2000. [PubMed: 23350002]

Freilij, H., & Altcheh, J. (1995). Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clinical Infectious Diseases*, 21(3), 551-555.

Giallongo A., Feo S., Showe L. C. and Croce C. M. (1986) Isolation and partial characterization of a 48-kDa protein which is induced in normal lymphocytes upon mitogenic stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* 134: 1238–1244

Gomes, Y. M., Lorena, V., & Luquetti, A. O. (2009). Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 115-121

Gutierrez, F.R., Guedes, P.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31,673–685.

Gupta, S., & Garg, N. J. (2013). TcVac3 induced control of *Trypanosoma cruzi* infection and chronic myocarditis in mice. *PLoS One*, 8(3), e59434.

Hecht, M. M., Nitz, N., Araujo, P. F., Sousa, A. O., de Cássia Rosa, A., Gomes, D. A., ... & Teixeira, A. R. (2010). Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. *PLoS One*, 5(2), e9181.

Hotez P.J., Ferris M. (2006) The anti-poverty vaccines. *Vaccine* 24:5787–5799

Hotez P.J., Fenwick A., Kumaresan J., Molyneux D.H., Ehrlich Sachs S., Sachs J.D., Savioli L. (2007) Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 357:1018–1027

Hotez P. (2011) A handful of ‘anti-poverty’ vaccines exist for neglected diseases, but the world’s poorest billion people need more. *Health Aff* 30:1080–1087

Ibarra-Cerdena, C.N., Sanchez-Cordero, V., Townsend, P.A., Ramsey, J.M., 2009. Ecology of North American triatominae. *Acta Trop.* 110, 178–186.

Luhrs, K. A., Fouts, D. L., & Manning, J. E. (2003). Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 21(21-22), 3058-3069.

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Inmunología de Kuby* (No. Sirsi) i9789701064542.

Le J. (2019). Drug Administration. Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA. Recuperado en: <https://www.msmanuals.com/home/drugs/administration-and-kinetics-of-drugs/drug-administration> Consultado en: 07/10/2019

Lewinsohn, R. (1979). Carlos Chagas (1879–1934): The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American Trypanosomiasis (foot-notes to the history of

Chagas's disease). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(5), 513-523.

Limon-Flores A.Y., Cervera-Cetina R., Tzec-Arjona J.L. et al (2010) Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4+ and CD8+ cells. *Vaccine* 28(46):7414–7419

Lichty, J. J., Malecki, J. L., Agnew, H. D., Michelson-Horowitz, D. J., & Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein expression and purification*, 41(1), 98-105.

Luhrs, K. A., Fouts, D. L., & Manning, J. E. (2003). Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 21(21-22), 3058-3069.

Medina-Torres, I., Vazquez-Chagoyan, J.C., Rodriguez-Vivas, R.I., de Oca-Jimenez, R.M., (2010). Risk factors associated with triatomines and its infection with *Trypanosoma cruzi* in rural communities from the southern region of the State of Mexico, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 49–54.

Miles L. A., Dahlberg C. M., Plescia J., Felez J., Kato K. y Plow E. F. (1991) Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolases as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30: 1682–1691

Moncayo, A., (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 577–591.

Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi Jr, A., Rosas, F., ... & Guhl, F. (2015). Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 373(14), 1295-1306.

Morton, D. B., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C., Holgate, B., ... & Verschoyle, R. (2001). Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory animals*, 35(1), 1-41.

Organización Panamericana de la Salud. (2006). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/HDM/CD/425-06.

Pal-Bhowmick, I., Mehta, M., Coppens, I., Sharma, S., & Jarori, G. K. (2007). Protective properties and surface localization of Plasmodium falciparum enolase. *Infection and immunity*, 75(11), 5500-5508.

Panamerican Health Organization, 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas (Quantitative Estimation of Chagas Disease in the Americas. OPS/HDM/CD/425-06). Pan American Health Organization, Washington,DC.

Pancholi, V. (2001). Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(7), 902-920.

Paneagui, M. & Saez, E. (2016). Vía subcutánea. Ilustración. Recuperado en: <https://sademi.com/wp-content/uploads/2016/02/via-subcut%C3%A1nea.pdf>

Pech-Canul, Á. D. L. C., Monteón, V., & Solís-Oviedo, R. L. (2017). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of parasitology research*, 2017.

Petherick, A., 2010. Country by country. *Nature* 465, S10–S11.

Pereira, V. R., Lorena, V. M. B., Verçosa, A. F. A., Silva, E. D., Ferreira, A. G., Montarroyos, U. R., ... & Gomes, Y. M. (2003). Antibody isotype responses in Balb/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(6), 823-825. Urban, I., Santurio, L. B., Chidichimo, A., Yu, H., Chen, X., Mucci, J., ... & Buscaglia, C. A. (2011). Molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* TcSMUG family of mucin genes and proteins. *Biochemical Journal*, 438(2), 303-313.

Pérez-Molina, J. A., Pérez-Ayala, A., Moreno, S., Fernandez-Gonzalez, M. C., Zamora, J., & Lopez-Velez, R. (2009). Use of benznidazole to treat chronic

Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), 1139-1147.

Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2017). Chagas disease. *The Lancet*.

Plow E. F., Felez J. and Miles L. A. (1991) Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 66: 32–36

Pontificia Universidad Javeriana. (2009) “Procedimiento operativo estándar (POE) procedimiento de administración de sustancias y toma de muestras sanguíneas incluyendo rutas y volúmenes en roedores de laboratorio” Recuperado en:<https://ciencias.javeriana.edu.co/documents/3722984/3758101/PROCEDIMIENTO+DE+ADMINISTRACION+DE+SUSTANCIAS+Y+TOMA+DE+MUES.pdf/f26dd3ba-bb09-4c08-bdc8-6c813d0b7863>

Queiroz, R. M., Charneau, S., Bastos, I. M., Santana, J. M., Sousa, M. V., Roepstorff, P., & Ricart, C. A. (2014). Cell surface proteome analysis of human-hosted *Trypanosoma cruzi* life stages. *Journal of proteome research*, 13(8), 3530-3541.

Qing Li, W., chu Hu, X., Zhang, X., Ge, Y., Zhao, S., Hu, Y., & Ashman, R. B. (2011). Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine*, 29(33), 5526-5533.

Queiroz, R. M., Charneau, S., Bastos, I. M., Santana, J. M., Sousa, M. V., Roepstorff, P., & Ricart, C. A. (2014). Cell surface proteome analysis of human-hosted *Trypanosoma cruzi* life stages. *Journal of proteome research*, 13(8), 3530-3541.

Qing Li, W., chu Hu, X., Zhang, X., Ge, Y., Zhao, S., Hu, Y., & Ashman, R. B. (2011). Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine*, 29(33), 5526-5533.

Ramsey, J.M., Cruz-Celis, A., Salgado, L., Espinosa, L., Ordonez, R., Lopez, R., (2003). Efficacy of pyrethroid insecticides against domestic and

peridomestic populations of *Triatoma pallidipennis* and *Triatoma barberi* (Reduviidae: triatominae) vectors of Chagas' disease in Mexico. *J. Med. Entomol.* 40, 912–920.

Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).

RCSB PDB TI-Crystal Structure of Enolase from *Trypanosoma Cruzi* FAU - Craig, T.K., Edwards, T.E., Staker, B., Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSGCID) CRDT - 2012/07/20 12:00 AID - 10.2210/pdb4g7f/pdb [doi]SO- <http://www.rcsb.org/structure/4G7F>

Redlitz A., Fowler B. J., Plow E. F. and Miles L. A. (1995) The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur. J. Biochem.* 227: 407–415

Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A. J., ... Muñoz, J. (2015). Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), e0003540. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>

Rodríguez-Morales, O., Monteón-Padilla, V., Carrillo-Sánchez, S. C., Rios-Castro, M., Martínez-Cruz, M., Carabarin-Lima, A., & Arce-Fonseca, M. (2015). Experimental vaccines against Chagas disease: a journey through history. *Journal of immunology research*, 2015.

Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta medica de Mexico*, 154(5), 605-612.

Romero-Cabello, R., Tay-Zavala, J., Sánchez-Vega, J.T., Ruíz-Sánchez, D., Calderón-Romero, L., Cruz-López, A., et al., (2006). Enfermedad de Chagas en el

estado de Puebla. Reporte de nuevas localidades infectadas. Rev. Fac. Med. UNAM 49,194–202.

Salazar-Schettino, P. M., Rojas-Wastavino, G. E., Cabrera-Bravo, M., Bucio-Torres, M. I., Martínez-Ibarra, J. A., Monroy-Escobar, M. C., ... & Torres-Gutiérrez, E. (2010). A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(1), 57-80.

Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., de Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., ... & Perera-Salazar, M. G. (2016). Chagas disease in Mexico. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 59(3), 6-16.

Saloga, J., Renz, H., Lack, G., Bradley, K. L., Greenstein, J. L., Larsen, G., & Gelfand, E. W. (1993). Development and transfer of immediate cutaneous hypersensitivity in mice exposed to aerosolized antigen. *The Journal of clinical investigation*, 91(1), 133-140.

Sanchez-Burgos G, Mezquite-Vega RG, EscobedoOrtegon J et al (2007) Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50:333–341

Secretaria de Salud. (2014). Manual de diagnostico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. [Archivo PDF]. México. Recuperado en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/39222/ManualEnfermedadChagas2014.compressed.pdf>

Secretaria de Salud. (2018). Prevención y control de la Enfermedad de Chagas 2013-2018. [Archivo PDF]. México. Recuperado en: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE\\_PrevencionControlEnfermedadChagas2013\\_2018.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevencionControlEnfermedadChagas2013_2018.pdf) Consultado en: 07/10/2019

Secretaria de Salud (2019). Manual de procedimientos para la enfermedad de Chagas. [Archivo PDF]. México. Recuperado en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual\\_de\\_Procedimientos\\_para\\_la\\_Enfermedad\\_de\\_Chagas\\_en\\_Mexico.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf)

Shimizu, S. (2004). Routes of administration. *The laboratory mouse*, 527-541.

Simmons, M.L. and Brick, J.O. (1970). In *The Laboratory Mouse* (ed. A. Hollaender), pp. 127–129. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.

Soriano Fernández, H., Rodenas García, L., Moreno Escribano, D., Roldán Castillo, B., Castaño Moreno, E., & Palazón García, E. (2009). Utilización de la vía subcutánea en Atención Primaria. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 2(8), 426-433.

Souza, W. D. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*, 8(4), 269-285.

Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasites & vectors*, 7(1), 317.

Suckow, M.A., Danneman, P. and Brayton, C. (2000). In *The Laboratory Mouse* (ed. Suckow), pp. 120–125. CRC Press, Boca Raton.

Tay, J., Bucio, M. I., Zarate, R., & Zarate, L. (1981). Estado actual de nuestros conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 14(1), 29-67.

Telleria, J., & Tibayrenc, M. (Eds.). (2017). *American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research*. Elsevier.

Uriarte, A. M. C. (2012). Historia de la enfermedad de Chagas-Mazza. *Revista de la Facultad de Medicina. Universidad Católica de Córdoba*, 1(1), 32-34.

Vianna, G. (1911). Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas":(Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 3(2), 276-294.

Vassena, C.V., Picollo, M.I., Zerba, E.N., (2000). Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. Med. Vet. Entomol. 14, 51–55.

Villalobos, G., Martínez-Hernández, F., de la Torre, P., Laclette, J.P., Espinoza, B., (2011). Entomological indices, feeding sources, and molecular identification of *Triatoma phyllosoma* (Hemiptera: Reduviidae) one of the main vectors of Chagas disease in the Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85, 490–497.

Wang, X., Chen, W., Tian, Y., Mao, Q., Lv, X., Shang, M., ... & Huang, Y. (2014). Surface display of *Clonorchis sinensis* enolase on *Bacillus subtilis* spores potentializes an oral vaccine candidate. Vaccine, 32(12), 1338-1345.

Wolfensohn, S. and Lloyd, M. (1994). In Handbook of Laboratory Animals Management and Welfare, pp. 143–173. Oxford University Press, Oxford.

World Health Organization (2017). La enfermedad de Chagas (triperanosomiasis americana). Recuperado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> Última fecha de consulta: 12 de febrero del 2018.

Zapata-Estrella H., Hummel-Newell C., Sanchez Burgos G., Escobedo-Ortegon J., Ramirez-Sierra M. J., Arjona-Torres A., Dumonteil E. (2006) Control of 1 Innovation for the 'Bottom 100 Million': Eliminating Neglected Tropical Diseases in the Americas *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. Immunol Lett 103:186–191

Zárate, L., Zárate, R.J., (1985). A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. Int. J. Entomol. 27, 102–127.

Zerba, E.N., (1999). Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina (B Aires)* 59 (2), 41–46.

## **ANEXOS**

Proyecto ganador del programa **BECAS – TESIS CONCYTEP 2019** por parte del Gobierno del Estado de Puebla, a través de la Secretaría de Educación Pública y el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla. 25 de octubre de 2019.

**Día del biotecnólogo**, organizado por la facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, el día 18 de junio del 2018 en modalidad cartel. “Inducción y purificación de la enolasa de *Trypanosoma cruzi* para la inmunización en el modelo murino por diferentes vías de administración”.

**CVII Reunión Anual de Profesores de Microbiología y Parasitología A.C. y el VXIII Congreso Nacional de Estudiantes de Microbiología y Parasitología**, organizado por la Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Parasitología A.C., el día 11 de abril del 2019 en la modalidad cartel “Respuesta Inmune Humoral en el modelo murino inmunizado con la enolasa recombinante de *Trypanosoma cruzi* por vía subcutánea” En la categoría Parasitología Investigación básica y clínica.

**1er Lugar Estatal en el 6to. Encuentro de Jóvenes Investigadores 2018** en la categoría Biología, Biotecnología y Ciencias Agropecuarias. Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla/CONACYT. Octubre 2018, Puebla, Pue.

**4to Lugar en el VII Foro Académico del Instituto de Ciencias 2019; “Desarrollando ciencia para un mejor futuro”** en conmemoración del 45 aniversario del Instituto de Ciencias, BUAP. Puebla, Pue. 16, 17 y 18 de octubre de 2019.