



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**EVALUACIÓN DE LA VACUNA MULTICOMPONENTE
TCVAC1 CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
UTILIZANDO UN PROTOCOLO DE
ELECTROPORACIÓN INTRADÉRMICA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A

W A E L H E G A Z Y H A S S A N M O U S T A F A

EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, MÉXICO, JULIO 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**EVALUACIÓN DE LA VACUNA MULTICOMPONENTE
TCVAC1 CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
UTILIZANDO UN PROTOCOLO DE
ELECTROPORACIÓN INTRADÉRMICA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A

W A E L H E G A Z Y H A S S A N M O U S T A F A

COMITÉ DE TUTORES:

DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN

DR. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

DRA. ESVIETA TENORIO-BORROTO

EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, MÉXICO, JULIO 2019

RESUMEN

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), un protozooario hemoflagelado, es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Ésta es la causa más común de muertes relacionadas insuficiencia cardiaca congestiva entre los adultos jóvenes en las áreas endémicas de Sudamérica, Centroamérica y México. También se ha convertido en un problema de salud importante en los Estados Unidos y Europa debido a la migración a gran escala de latinoamericanos en las últimas décadas. Los esfuerzos para el desarrollo de vacunas contra la infección por *T. cruzi* han aumentado en los últimos años. Nuestro grupo de trabajo ha diseñado una serie de vacunas (TcVac) compuestas por antígenos de membrana anclados a la GPI derivados de *T. cruzi*. Se ha demostrado que las vacunas TcVac aumentan las respuestas inmunitarias humorales y celulares y proporcionan un control significativo (pero no completo) de la infección experimental en ratones y perros. En el presente documento, nos propusimos probar dos protocolos de inmunización para la entrega de la vacuna de ADN (TcVac1) compuesta de antígenos TcG2 y TcG4 en un modelo de ratón BALB/c. En un primer ensayo se comparó la protección conferida por la vacuna TcVac1 administrada vía intramuscular (IM) contra el protocolo de vacunación electroporación/intradérmica (IDE). Se vacunaron cuatro veces, con quince días de diferencia a doce ratones BALB/c por grupo. Dos semanas después de la última inmunización, se sacrificó a la mitad de los animales (n=6) de cada tratamiento, para la evaluación de la eficacia de la vacuna en la pre-infección y la segunda mitad (n=6) se sacrificaron 60 días después de la infección con trypanomastigotes cepa *Sylvio* X10/4 de *T. cruzi*, para ser evaluados durante la fase aguda de la infección. La respuesta inmune humoral se evaluó mediante la evaluación de los subtipos de IgG anti-TcG2 y anti-TcG4 utilizando un ensayo de ELISA. La respuesta inmunitaria celular se evaluó mediante un ensayo de proliferación de linfocitos. Por último, se evaluaron los aspectos clínicos y morfológicos para todos los animales experimentales. Nuestros resultados demostraron que al comparar la entrega IDE TcVac1 frente a la entrega IM, el primero indujo un nivel significativamente mayor de respuesta de anticuerpos específicos por antígeno (IgG2a+IgG2b>IgG1) y proliferación de linfocitos, que se expandió en respuesta al desafío de infección. La evaluación histológica después de la infección por desafío mostró infiltración de células

inflamatorias (macrófagos y linfocitos) en el corazón y el tejido esquelético de todos los ratones infectados. Sin embargo, el mayor aumento de infiltrados inflamatorios se observó en ratones TcVac1_IDE/Tc en comparación con TcVac1_IM/Tc o ratones no vacunados/infectados. La extensión del infiltrado inflamatorio tisular se asoció directamente con el control de los nidos de amastigotes intracelulares en ratones vacunados/infectados (contra a los no vacunados/infectados). Nuestros resultados sugieren que la administración de IDE mejora la eficacia protectora de la vacuna TcVac1 contra la infección por *T. cruzi* en ratones en comparación con la administración IM de la vacuna.

Posteriormente en un segundo experimento, se probó la eficacia de diferentes dosis vacunales utilizando la modificación a la vacuna eliminando los plásmidos que codifican para la interleucina-12 y factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En este ensayo, se probaron cinco dosis diferentes (1, 5, 10, 15 y 20ug) de la vacuna para determinar la dosis óptima recomendada para prevenir la infección por *T. cruzi* con aplicación intradérmica/electroporación de la vacuna. En este experimento se utilizaron cuarenta y dos ratones hembra, cepa CD1, subdivididos en 7 tratamientos diferentes (n=6/grupo). Después de la vacunación, los ratones fueron desafiados con cepa Ninoa/MHOM/MX/1994 de *T. cruzi* (500 trypomastigotes/ratón, intraperitonealmente). Se analizaron parámetros tales como parasitemia, prueba de supervivencia, prueba serológica (ELISA) y análisis histopatológicos para evaluar la eficacia de la protección de la vacuna y determinar la dosis óptima. Los resultados demostraron que el grupo vacunado con 10 µg de dosis de ADN plasmídico indujeron los mejores niveles de inmunoglobulinas específicos, la parasitemia más baja y el mayor control del nidos de parásitos en cardiomiocitos y tejido muscular esquelético. Se confirmó que la aplicación intradérmica en conjunto con la electroporación es un método eficaz para la administración de vacunas con ADN, ya que mejora la inmunogenicidad del plásmido entregado, y reduce el tiempo y el costo de preparación de la vacuna, se minimiza la dosis de la vacuna, el número de refuerzos de la vacuna se reduce a una sola aplicación y la vacuna no requiere el uso de adyuvantes.

La patología es una disciplina que depende crucialmente de la interpretación de imágenes para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Tradicionalmente las técnicas de interpretación se basaron en gran medida en el análisis subjetivo de los especímenes, con un

acuerdo variable entre los observadores. La interpretación moderna hace uso tanto del análisis molecular, como de la cuantificación objetiva de a través de microscopía auxiliada por sistemas de digitalización óptica. La dificultad para que el sistema ocular/cerebro humano analice objetivamente un objeto dentro de una escena, independientemente de su información contextual (por ejemplo, la percepción de un objeto dado puede ser muy diferente según su contexto), lo que promueve la necesidad de un ayuda microscopía computarizada para su uso en la patología molecular. De ahí que nuestro tercer experimento se enfocó en el desarrollo de un sistema digital de análisis de imágenes histopatológicas.

En este tercer ensayo se utilizaron técnicas computarizadas de análisis digital de imágenes histopatológicas (técnicas de interpretación histológica basadas en el análisis de imágenes, cuantificación molecular de marcadores mixtos en estudios colorimétricos) enfocado en la detección y conteo de los infiltrados linfocitarios, conteo de cardiomiocitos y la determinación de hipertrofia cardiaca en ratones infectados con cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* y la comparación de los resultados obtenidos con los resultados histológicos basados en observación y análisis visual realizado con tres patólogos en un ensayo doble ciego. Se usaron ratones BALB/c (n=48), los cuales fueron vacunados con TcVac1 vía intradérmica con electroporación, los ratones fueron sacrificados al día 60 post-infección y el análisis histopatológico se llevó a cabo como sigue; A) Se examinaron al menos cinco secciones por tejido (ventrículo derecho, ventrículo izquierdo y septum) para cada ratón para detectar la presencia de inflamación aguda y nidos de parásitos (magnificación: 400X y 100X), el parasitismo tisular se evaluó contando los nidos de amastigotes presentes en 100 campos microscópicos en cada uno de los corazones analizados. Del mismo modo, el infiltrado inflamatorio se visualizó en >200 campos microscópicos de las secciones de tejido del corazón, tres patólogos analizaron en un estudio doble ciego las muestras, y se registraron los resultados finales del consenso. B) los tejidos fueron procesados en cortes 4 μ m, teñidos con HE y analizados en las mismas secciones mencionados anteriormente. Los tejidos fueron observados bajo microscopio óptico y se llevó a cabo el análisis colorimétrico a través del software Image-Pro Plus 5.1. para todas las muestras. Finalmente, la comparación de los datos obtenidos de ambas técnicas fueron comparados. Los resultados mostraron la eficacia del análisis computarizado y la precisión de los datos obtenidos, donde había una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los grupos vacunados y no vacunados. la

conclusión del presente experimento fue la obtención de datos cuantitativos para los estudios histopatológicos sin la necesidad de usar otras técnicas más costosas como inmunohistoquímica, FISH, ISH (silver-based), inmunocitoquímica, expresión de proteínas marcadas, etc. y evadir el margen de error humano en la recopilación y procesamiento de datos.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, a protozoon, is the etiological agent of Chagas disease. Chagas disease is the most common cause of congestive heart failure related deaths among young adults in endemic areas of South America, Central America, and Mexico. It has also become a major health problem in the United States and Europe due to the large-scale migration of Latin Americans in recent decades. Efforts to develop and test vaccines against *Trypanosoma cruzi* infection have increased in recent years. We have designed a TcVac series of vaccines composed of GPI-derived membrane antigens derived from *T. cruzi*. TcVac vaccines have been shown to increase humoral and cellular immune responses and provide significantly (but not complete) control of experimental infection in mice and dogs. In this experiment, we set out to test two immunization protocols for the delivery of the DNA vaccine (TcVac1) composed of TcG2 and TcG4 antigens, in a BALB/c mouse model. The mice were immunized with TcVac1 through intradermal/electroporation (IDE) or intramuscular (IM) routes, the protection conferred by the comparative TcVac1 administered via intramuscular (IM) against an intradermal/electroporation (IDE) vaccination protocol, was evaluated. Twelve BALB/c mice were vaccinated per group, four times, a fortnight apart. Half of the animals (n=6) of each treatment were sacrificed two weeks after the last immunization, for the vaccine effectiveness evaluation in pre-infection phase, and the second half (n=6) were sacrificed 60 days after infection (dpi) with *T. cruzi* trypomastigotes strain Sylvio X10/4, and evaluated during the acute phase of infection. The humoral immune response was evaluated by evaluating the subtypes of IgG anti-TcG2 and anti-TcG4 using an ELISA. The cellular immune response was evaluated by a lymphocyte proliferation test. Finally, the clinical and morphological aspects for all experimental animals were evaluated. Our results showed that by comparing the delivery of IDE TcVac1 versus IM delivery, the former induced a significantly higher level of antigen-specific antibody response (IgG2a+IgG2b>IgG1) and lymphocyte proliferation, which is expanded in response to the challenge Infection phase. Histological evaluation after challenge infection showed infiltration of inflammatory cells (macrophages and lymphocytes) into the heart and skeletal tissue of all infected mice. However, the greatest increase in inflammatory infiltrates was observed in TcVac1_IDE/Tc mice compared to TcVac1_IM/Tc or unvaccinated/infected mice. The extent of the tissue inflammatory infiltrate was directly associated with the control of intracellular amastigote

nests in vaccinated/infected mice (against the unvaccinated/infected). Our results suggest that the Administration of IDE improves the protective efficacy of the TcVac1 vaccine against *T. cruzi* infection in mice compared to IM administration of the vaccine.

Subsequently, in the second experiment of this doctoral paper, the efficacy of different vaccine doses has been tested using the modification of the vaccine by eliminating the plasmids encoding for interleukin-12 and granulocytes-macrophages colony stimulating factor (GM-CSF). In this work, we tested five different doses (1, 5, 10, 15 and 20 μ g) of the vaccine to determine the optimal dose to be used to prevent *T. cruzi* infection using electroporation intradermal injection. Forty-two female mice, CD1 strain, have been used subdivided into 7 different treatments (n=6/group). After vaccination, the mice were challenged with Ninoa/MHOM/MX/1994 strain of *T. cruzi* (500 trypomastigotes/mouse, intraperitoneally). Parameters such as parasitemia, survival test, serology test (ELISA) and histopathological analysis were used to evaluate the effectiveness of vaccine protection and determine the optimal dose. The results showed that the vaccinated group with 10 μ g of plasmid DNA dose induced the best levels of specific immunoglobulins, lower parasitemia and increased control of the parasite nest in cardiomyocytes and skeletal muscle tissue. The use of electroporation was confirmed to be an effective method for administering DNA vaccines, as it improves the immunogenicity of the delivered plasmid, and reduces the time and cost of preparing the vaccine, minimizes the dose of the vaccine, the number of vaccine increases is reduced to a single application and the vaccine does not require the use of adjuvants.

Pathology is a discipline that depends crucially on the interpretation of images for the diagnosis and prognosis of diseases. When the techniques of historical interpretation were largely based on the subjective analysis of specimens, with variable agreement among observers, modern interpretation makes use of both molecular input and machine objective quantification. The difficulty for the human eye system/brain to objectively analyze an object within a scene, regardless of its contextual information (e.g., the perception of a given object may be very different depending on its context), making the need for computerized microscopy aid for use in molecular pathology.

Regarding the third experiment, the involvement of computerized techniques in the digital analysis of histopathological images (histological interpretation techniques based on image analysis, molecular quantification of mixed markers in colorimetric studies) was focused on the detection and counting of lymphocyte infiltrates, cardiomyocyte count and cardiac hypertrophy determination in mice infected with *Sylvio* X10/4 strain of *T. cruzi* and comparing the results obtained with the results obtained with the histological results based on observation and visual analysis performed with three random pathologists. BALB/c mice (n=48) were used, which were vaccinated with TcVac1 via intradermal with electroporation, the mice were sacrificed on day 60 post-infection and histopathological analysis was carried out as follows; A- At least nine sections per tissue (right ventricle, left ventricle and septum) were examined for each mouse for acute inflammation and parasite nests (magnificent: 400X and 100X), tissue parasitism was evaluated by counting the amastigote nests present in 100 microscopic fields in each of the heart analyzed. Similarly, the inflammatory infiltrate was visualized in >200 microscopic fields of the tissue sections of the heart, three pathologists blindly analyzed the samples, and the final results of the consensus were recorded. B- The tissues were processed in 4 μ m sections, stained with HE and analyzed as mentioned above, the tissues were observed under an optical microscope and computerized colorimetric analysis was carried out through “Image-Pro Plus 5.1” software for all samples. Finally, the comparison of the data obtained from both techniques was performed. The results showed the effectiveness of computerized analysis and the accuracy of the data obtained, where there was a statistically significant difference (P. 0.05) between vaccinated and unvaccinated groups. the conclusion of this experiment was the collection of quantitative data for histopathological studies without the need to use other more expensive techniques such as immunohistochemistry, FISH, ISH (silver-based), immunocytochemical, protein expression marked, etc. and evading the human error margin in data collection and processing

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se desarrolló bajo el proyecto de Investigación UAEM con número de registro 3326/2012C, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 156701), bajo la responsabilidad del Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán

Gracias a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México a quien le debo mi formación académica.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) y al personal que labora dentro por todo el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología CONACYT por la de cursar un posgrado y otorgarme la beca con número de 518232/291117.

Gracias a mi tutor académico: el **Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán** por todas sus enseñanzas académicas y de vida. Gracias por haber confiado en su servidor y por compartir sus conocimientos y la paciencia brindada durante los estudios de maestría y doctorado.

Al **Dr. Alberto Barbabosa Pliego** y la **Dra. Esvieta Tenorio-Borroto** y por el tiempo dedicado a mi trabajo y sus valiosas aportaciones.

CONTENIDO

DEDICATORIAS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	VI
AGRADICIMIENTOS	IX
CONTENIDO	X
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
1. Enfermedad de Chagas	4
1.2. Primera evidencia de la tripanosomiasis americana en América Latina	5
1.3. Ciclo de vida de la enfermedad de Chagas y mecanismo de invasión	5
1.4. Transmisión	6
1.5. Globalización de la transmisión	9
1.6. Epidemiología y distribución de vectores	9
1.7. Fases de la enfermedad de Chagas	10
1.8. Vacunas	12
1.9. Sistema de electroporación	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19

OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
1. Capítulo uno	21
2. Capítulo dos	27
3. Capítulo Tres	31
RESULTADOS	
1. Capítulo uno	35
2. Capítulo dos	45
3. Capítulo Tres	69
DISCUSIÓN GENERAL	73
CONCLUSIÓN GENERAL	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayo del índice de estimulación de la proliferación de linfocitos para ratones vacunados con IDE e IM TcVac1 antes y después de la infección. 38.

Tabla 2. Anormalidades histológicas durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* y el desarrollo de la enfermedad (día 60 después de la infección) en ratones vacunados con TcVac1. 41

Tabla 3. Anormalidades histopatológicas para grupos de ratones vacunados con vacuna TcVac1 modificada 30 días después del desafío 59

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Respuesta de anticuerpos específicos de antígenos en ratones vacunados con TcVac1 a través del IDE o ruta IM. 39
- Figura 2. Respuesta de anticuerpos específicos de antígenos para desafiar la infección en ratones vacunados con TcVac1 a través de la ruta IDE o IM. 39
- Figura 3. Visualización histológica de infiltración de linfocitos de fase aguda en ratones vacunados/infectados con TcVac1. 40
- Figura 4. Evaluación macroscópica del corazón para ratones de control (no vacunados). 41
- Figura 5. Porcentaje de supervivencia de los grupos de ratones después de la infección por *T. cruzi*. 41
- Figura 6. Tasa de supervivencia de todos los grupos de ratones durante el período experimental posterior a la infección. 54
- Figura 7. La parasitemia cuenta para los grupos de ratones infectados por *T. cruzi* experimentalmente. 55
- Figura 8. Respuesta de anticuerpos específicos de TcG2 y TcG4 en ratones vacunados con vacuna TcVac1 modificada. 56
- Figura 9. Respuesta de anticuerpos específicos de TcG2 y TcG4 en ratones vacunados con la vacuna TcVac1 modificada y desafiados con *T. cruzi*. 57
- Figura 10. Conteo histopatológico colorimétrico de linfocitos de ratones vacunados con TcVac1 y desafiados con *T. cruzi* 69

Figura 11. Hipertrofia de cardiomiocitos medida a través de software colorimétrico de cortes histopatológicos de ratones BALB/c vacunados con TcVac1 y desafiados con *T. cruzi*. 71

Figura 12. Conteo histopatológico de cardiomiocitos de ratones vacunados por vía intramuscular o por electroporación intradérmica y desafiados con *T. cruzi*, a través de software colorimétrico. 72

INTRODUCCIÓN GENERAL

Trypanosoma cruzi es el agente causante de la devastadora enfermedad de Chagas en América Latina. La ruta más común de transmisión de parásitos a los seres humanos es a través de triatominos hematófagos. La enfermedad de Chagas se caracteriza por una fase aguda y otra crónica. Una vez que la parasitemia aguda disminuye, la mayoría de las personas infectadas alcanzan una infección crónica menos fulminante. Varios años después de la infección, 20-35% de los individuos infectados desarrollan lesiones irreversibles del sistema nervioso autónomo del corazón, y/o esófago, colon, y sistema nervioso periférico. La enfermedad de Chagas representa la principal causa de lesiones cardíacas en adultos jóvenes y económicamente productivos en los países endémicos (Chagas 1909; Schmunis and Yadon 2010). Los programas de control de vectores no han podido prevenir completamente la transmisión de parásitos (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases 1993), los medicamentos antiparasitarios disponibles no son lo suficientemente seguros o eficaces, y actualmente no hay vacunas disponibles (Hotez and Ferris 2006).

Los estudios de las respuestas inmunitarias en modelos resistentes y susceptibles de la enfermedad de Chagas han sido valiosos para mejorar nuestro conocimiento de la inmunidad protectora y diseñar los enfoques de vacunación contra la infección por *T. cruzi*. La secuenciación del genoma de *T. cruzi* y el desarrollo de enfoques para producir proteínas recombinantes han hecho factible producir, entregar y probar la eficacia de una variedad de antígenos *T. cruzi* recombinantes como posibles candidatos a vacunas en modelos experimentales de infección y enfermedad (Bhatia et al. 2004; Garg and Bhatia 2005; Cazorla et al. 2009).

De hecho, muchos de los antígenos recombinantes se han probado como vacunas profilácticas. Sin embargo, las vacunas a base de proteínas recombinantes no proporcionaron una alta eficacia en el control de la infección por *T. cruzi* (Lúcia Pereira-Chioccola et al. 1999; Ribeiro et al. 2000). Esto es, al menos, en parte debido al hecho de que las proteínas recombinantes a pesar de haber provocado potentes respuestas de anticuerpos anti-*T. cruzi*, pero no pudieron estimular la inmunidad celular que se requiere para controlar la forma

replicativa intracelular del parásito. Por lo tanto, se requieren nuevos antígenos candidatos, así como nuevos enfoques para diseñar una vacuna eficaz contra la infección por *T. cruzi*.

Nuestro grupo ha realizado pruebas computacionales de bases de datos de secuencias de *T. cruzi*, reportadas en GenBank, e identificado genes que codifican proteínas ancladas a la glicosilfosfatidilinositol (GPI) como posibles candidatos a vacunas (Bhatia et al. 2004). Mediante un análisis riguroso durante un período de varios años, determinamos que dos de los antígenos candidatos seleccionados, denominados TcG2 y TcG4, eran máximamente relevantes para el desarrollo de la vacuna. Estos dos antígenos se conservan filogenéticamente en una variedad de linajes de *T. cruzi*, expresados en etapas infecciosas e intracelulares del ciclo de vida del parásito, y son reconocidos por las inmunoglobulinas (IgG) y las células T CD8+ en múltiples huéspedes infectados por *T. cruzi* (Bhatia and Garg 2008).

La coadministración intramuscular de estos antígenos como vacuna de ADN (TcVac1) indujo un mayor grado de protección contra la infección por *T. cruzi* que el observado por la administración de antígenos únicos en ratones (Garg and Bhatia 2005). En perros, la vacuna candidata TcVac1 provocó un incremento significativo de anticuerpos trypanolíticos y una respuesta Th1 de citoquinas (IFN- γ), propiedades que se han asociado con el control inmune de *T. cruzi* (Aparicio-Burgos et al. 2011).

Los métodos de administración de antígenos pueden dar lugar a una calidad y cantidad variables de respuestas inmunitarias. Los sistemas de administración física, como la electroporación, la microinyección, la pistola de genes, el tatuaje, el láser y el ultrasonido, se han probado para la administración de vacunas basadas en el ADN contra agentes infecciosos (Bolhassani and Rafati 2011). La electroporación (EP) induce la formación de poros acuosos en bicapas lipídicas mediante la aplicación de un pulso breve (microsegundos a milisegundos), de alto voltaje para superar la barrera de la membrana celular. Este estado permeabilizado transitorio se utiliza para cargar células con una variedad de moléculas diferentes, incluyendo iones, fármacos, colorantes, trazadores, anticuerpos, ARN y ADN (Faurie et al. 2005).

La electroporación del ADN in vivo ha demostrado ser un método eficaz, que produce un mayor nivel de la incorporación celular del ADN, el aumento en el número de células transfectadas por el ADN y la reducción de la variabilidad entre sujetos. La electroporación de la vacuna de ADN también ha proporcionado una mayor magnitud de la expresión génica, que requiere menos tiempo para alcanzar una respuesta inmunitaria máxima en comparación con el enfoque intramuscular convencional de la administración de la vacuna de ADN (Monie et al. 2009). Se ha demostrado una mayor eficacia de las vacunas de ADN suministradas por método de electroporación frente a otros métodos en comparación con una amplia gama de enfermedades infecciosas, como la gripe, el VIH, la hepatitis C, el paludismo y el ántrax (Kutzler and Weiner 2008). También se ha probado la electroporación para la administración de medicamentos y vacunas contra una variedad de cánceres (Best et al. 2009; Daemi et al. 2012).

En este documento, describimos la eficacia protectora de la vacuna TcVac1 aplicada a través de un enfoque de electroporación intradérmica (IDE). La vacuna TcVac1 se inyectó en ratones a través del IDE y los ratones fueron desafiados con *T. cruzi*. Hemos analizado la función de las respuestas de anticuerpos y linfocitos inducidas por la vacuna al proporcionar protección contra la parasitemia aguda en ratones. También realizamos un examen histopatológico del corazón y el músculo esquelético, centrándonos en la eficacia del protocolo de vacunación en la reducción de la lesión tisular durante la infección aguda por *T. cruzi*.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas lleva el nombre de Carlos Chagas, el investigador pionero que la describió por primera vez en 1909 (Chagas 1909). La enfermedad, que sólo existe en el continente americano, es causada por un parásito flagelado, *Trypanosoma cruzi*, y se transmite principalmente a los seres humanos por insectos de triatomino hematófagos.

La enfermedad de Chagas tiene dos fases sucesivas, aguda y crónica. La fase aguda dura 6-8 semanas. Una vez que la fase aguda disminuye, la mayoría de los pacientes infectados recuperan un estado aparente y saludable, donde no se puede demostrar ningún daño a los órganos mediante métodos de diagnóstico clínico. La infección sólo puede ser verificada mediante pruebas serológicas o parasitológicas. Esta forma de la fase crónica de la enfermedad de Chagas se denomina forma indeterminada. La mayoría de los pacientes permanecen en esta forma de la enfermedad. Sin embargo, después de varios años de esta fase, 20-35% de los individuos infectados desarrollarán lesiones irreversibles del sistema nervioso autónomo en el corazón, esófago, colon y/o sistema nervioso periférico, y perdura por el resto de la vida del individuo infectado. La enfermedad de Chagas representa la primera causa de lesiones cardíacas en adultos jóvenes y económicamente productivos en los países endémicos de América Latina (Coura and Borges-Pereira 2012).

1.1. Manifestaciones clínicas de la enfermedad:

Un punto importante en la identificación de la enfermedad de Chagas fue la observación de un edema ocular conocido como signo de Romaña. El signo de Romaña es un signo temprano patognomónico de la enfermedad de Chagas, una conjuntivitis grave de unilateral con hinchazón del párpado, inflamación de la glándula lagrimal e hinchazón de las glándulas linfáticas regionales causada por la entrada del parásito *T. cruzi*. El signo ha demostrado ser de gran valor en la identificación de la infección en su fase aguda (WHO 2017).

1.2. Primera evidencia de la tripanosomiasis americana en América Latina:

Los primeros estudios epidemiológicos de la tripanosomiasis humana en estadounidenses fueron reportados por Segovia en El Salvador en 1913. En Panamá en 1931, la presencia de la enfermedad fue confirmada con el reporte de 19 casos humanos en el área del Canal de Panamá. De León en 1935 observó la importancia de la enfermedad en ese país (León Gómez et al. 1960). En 1949, el primer caso nativo de la enfermedad fue descrito en Nicaragua, y más recientemente, en 1969, Fray Bernadini de Schagen informó que las viviendas estaban infestadas por vectores descritos como "venenosos insectos chupasangre" conocidos como cucarachas. En México en 1928, Hoffman describió la gran abundancia y domiciliación de *Triatoma dimidiata* en Chiapas y Veracruz. En 1938 Bernal Flandes publicó sobre insectos transmisores en Veracruz, y en 1940, Palomo Eroso describió otros dos nuevos casos en Yucatán. No fue hasta 1972 cuando se llevó a cabo la primera identificación formal de la enfermedad con informes de Eugenio Palomo y Luis Mazzotti (Velasco-castrejón and Rivas-sánchez 2008; Simposio: Academia Nacional de Medicina, 1975).

1.3. Ciclo de vida de la enfermedad de Chagas y mecanismo de invasión:

Trypanosoma cruzi, el parásito protozoario, tiene un ciclo de vida que involucra tanto a los huéspedes vertebrados como a los invertebrados dentro del cual surgen las etapas de desarrollo del parásito. Como parásito intracelular obligado en el huésped vertebrado, la localización intracelular es fundamental para el establecimiento y mantenimiento de la infección por *T. cruzi*. La invasión de células anfitrionas se logra mediante trypomastigotes metacíclicos, que son formas altamente especializadas y no divisoras de *T. cruzi* que pueden penetrar una amplia variedad de tipos de células de mamíferos. Una vez dentro de la célula huésped, los trypomastigotes se someten a un proceso de desarrollo que culmina en la formación de amastigotes replicativos que proliferan en el citoplasma de la célula huésped durante 5-6 días hasta que ocupan la mayor parte del volumen celular. En esta etapa, la división de amastigotes cesa y la diferenciación a los trypomastigotes se produce seguida de la ruptura de la membrana plasmática de la célula huésped (Costales and Rowland 2007) liberando trypomastigotes que diseminan la infección.

1.4.1. Transmisión a través de vectores:

Sobre la base de encuestas transversales de 18 países, se estimó que la prevalencia global de la infección humana por *T. cruzi* dichos países endémicos alcanzó los 17 millones de casos. En la República Mexicana se han identificado 32 especies de triatomíneos transmisores, 23 son exclusivos del país; también se han identificado 13 especies de importancia epidemiológica por su capacidad vectorial y su distribución, entre las cuales destacan *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata* y *Meccus pallidipennis* (Salazar Schettino et al. 2005).

1.4.2. Transmisión mediante transfusión sanguínea:

La transmisión de la enfermedad de Chagas a través de la transfusión de sangre es una amenaza real incluso para los países donde la enfermedad no se transmite por vectores, como los Estados Unidos y Canadá, donde se han documentado casos de enfermedad aguda de Chagas (Grant 1989). En 1986, en Puebla, México, se encontró un 17.5% de prevalencia de personas positivas a *T. cruzi* de 200 muestras analizadas (Velasco-Castrejón and Guzmán-Bracho). Las tasas de prevalencia de la infección por *T. cruzi* en sangre variaron entre el 1,3% y el 51,0%, estas tasas fueron mucho más altas que las de la infección por hepatitis o VIH. Se considera la segunda forma más importante de propagar la infección en zonas endémicas y no endémicas, esta vía de transmisión depende principalmente de la presencia del parásito en la sangre y del estado inmunológico del receptor, y se detectó que el parásito es viable durante un período de tiempo de 18 a 250 días (Schmunis 2007; Schmunis and Yadon 2010).

1.4.3. Transmisión oral:

Ha ocurrido que por transmisión oral varias personas se ven afectadas simultáneamente señalando la aparición de un brote de origen común a través de alimentos contaminados. La

prevención de esta transmisión se basa en la vigilancia, prevención y manejo de alimentos contaminados según lo recomendado por un grupo de expertos convocados por la OPS en Brasili (OPS/DPC/CD/CHA, 2006). Esta ruta de transmisión fue establecida y documentada (Rodríguez-Morales 2008). Uno de los casos más documentados se debe a la ingestión de jugo de aai y se concentra en los estados de Pará y Amapá, donde la producción de esta fruta es intensiva.

1.4.4. Otras formas de transmisión:

1.4.4.1. Transmisión congénita:

El número de casos de enfermedad congénita de Chagas se ha estimado alrededor de 14.385 por año en América Latina, alrededor de 66 a 638 por año en los Estados Unidos, y alrededor de 20 a 183 por año en Europa. La transmisión congénita de la enfermedad Chagas puede ocurrir durante cualquier fase de la enfermedad materna. Durante el primer trimestre del embarazo (semanas 1–12), la transmisión es probablemente rara. El suministro de sangre materna se vuelve continuo y difuso en toda la placenta sólo después de la semana 12 de gestación. Por lo tanto, la transmisión de parásitos sanguíneos probablemente ocurre con mayor frecuencia durante el segundo y tercer trimestre del embarazo (transmisión prenatal) y tal vez también más cerca del parto y durante el parto (transmisión perinatal) a través de brechas placentarias (Gebrekristos and Buekens 2014).

1.4.4.2. Transmisión de trasplante de órganos:

Las personas que reciben un trasplante de órganos de un donante infectado también están en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas, debido al tratamiento inmunosupresor en el receptor de órganos, un pequeño número de parásitos presentes en el injerto han sido capaces de desarrollarse rápidamente. Además, un paciente infectado que está recibiendo un trasplante de órganos puede desarrollar signos clínicos de la enfermedad de Chagas cuando se implementa tratamiento inmunosupresor antes del injerto (Forés et al. 2007; Souza et al. 2008). El problema también se ha descrito en países no endémicos y los impactos diferían

según el órgano trasplantado. De hecho, las consecuencias del trasplante de corazón parecen mucho más graves que el trasplante de riñón o hígado del mismo donante.

1.4.4.3. Transmisión accidental de laboratorio:

El personal que trabaja en laboratorios de investigación o clínicos corren el riesgo de infectarse con *Trypanosoma cruzi* a través de la manipulación de materiales que contengan parásitos viables (por ejemplo, trypomastigotes infecciosos). Las contaminaciones accidentales adquiridas en laboratorio más frecuentes resultaron de lesiones por pinchazos de aguja durante la infección experimental de ratones o de la transmisión por aerosol o gotas de materiales infectados (sobrenadantes de cultivo de *T. cruzi*, heces de triatoma y la sangre infectada) por contacto de la piel o de la mucosa (Brener 1986). Otras fuentes de contaminación de laboratorio fueron la pulverización de parásitos por gotas o la rotura de un tubo que contiene parásitos vivos. En particular, los tubos especiales para la preservación criogénica con frecuencia se rompen cuando se descongelan. La contaminación también puede ocurrir debido a una cantidad muy baja de parásitos y el parásito también puede estar presente en gotas secas de cultivo infeccioso o sangre contaminada presente en una superficie del laboratorio. El cultivo de los epimastigotes se considera a menudo no infecciosa; sin embargo, los cultivos viejos que se enriquecen en trypomastigotes metacíclicos son infecciosas. La contaminación adquirida en laboratorio se puede prevenir usando guantes, una máscara, haciendo cultivos en un laboratorio bioseguridad nivel 3 (tipo L3) y utilizando instalaciones adecuadas para animales.

1.5. Globalización de la transmisión:

La creciente movilidad de las poblaciones y la migración hacia países no endémicos han extendido la infección a estos países a través de transfusiones de sangre, trasplantes de órganos y la forma congénita entre los migrantes. El riesgo está relacionado con el país de origen de los migrantes y la tasa de prevalencia en ese país dado. Sin embargo, los avances

observados en el control de la transmisión indican que esta posible extensión a Europa, los Estados Unidos y el Canadá podría ser transitoria o decreciente. La OMS ha lanzado recientemente la Red Mundial para la Eliminación de la Enfermedad de Chagas (GNChE) para controlar esta situación. También se informó de la dispersión global de la enfermedad de Chagas debido a las poblaciones migrantes de América del Sur y Central a Europa, América del Norte, Japón y Australia. Por último, es necesaria que los países no endémicos mantengan y desarrollen una conciencia de la enfermedad de Chagas como consecuencia de la globalización (Schmunis and Yadon 2010).

1.6. Epidemiología y distribución de vectores:

Se demostró que una comprensión completa de la epidemiología de la enfermedad de Chagas a través de su distribución era esquivada y compleja, y sigue siendo intensa la investigación hasta la actualidad. La dificultad para definir la epidemiología de la enfermedad de Chagas es atribuible a varios factores. En primer lugar, la enfermedad de Chagas es una zoonosis y una variedad de mamíferos ampliamente distribuidos sirven como reservorios para *T. cruzi*. Además, todos los mamíferos son susceptibles a la infección. Otro factor que contribuye a la complejidad de la enfermedad de Chagas como zoonosis es la variedad de vectores involucrados, no siendo representado simplemente por una gama de especies o géneros relacionados, como es el caso de todos los demás vectores de insectos, asociados con cualquier enfermedad dada. Los insectos triatomíneos son una subfamilia de insectos y en esta gama taxonómica relativamente amplia hay miembros de todos los grupos que pueden albergar a *T. cruzi*. La mayor parte de la transmisión, sin embargo, es atribuible a tres géneros principales: *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma*, pero esta diversidad todavía representa a dos tribus diferentes de la subfamilia (*Rhodniniand* y *Triatomini*). Además, los insectos varían en más que ascendencia, teniendo una amplia gama de huéspedes vertebrados y asociaciones ecológicas (Salazar Schettino et al. 2005).

1.7. Fases de la enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas se caracteriza por tener una fase aguda y una crónica. En la fase aguda la mayoría de los pacientes tienen la forma no aparente (asintomática) de la infección, mientras que en la fase crónica se distinguen dos formas bien definidas de la enfermedad: indeterminada (latente, preclínica) y determinada (clínica), que se subdivide en cardiaca, digestiva (generalmente expresada como megaesófago y/o megacolon), y formas cardiodigestionales. La enfermedad de Chagas es clínicamente silenciosa en la mayoría de los pacientes (principalmente en la fase aguda, pero también durante la fase crónica), y el diagnóstico debe confirmarse mediante los resultados de las pruebas de laboratorio. Muy a menudo el diagnóstico se hace fortuitamente; por ejemplo, cuando las personas donan sangre, durante el examen de detección de salud, durante las pruebas de autorreferencia, y en pacientes con antecedentes familiares positivos o antecedentes epidemiológicos.

1.7.1. Fase aguda:

La fase aguda de la enfermedad de Chagas se observa principalmente en la primera o segunda décadas de vida. Las manifestaciones clínicas aparecen alrededor (8-10) días después de la penetración del parásito. En la transmisión por transfusión este período puede ser más largo (20-40 días). La fase aguda no se reconoce clínicamente en la mayoría de los casos. La experiencia de quienes trabajan en áreas endémicas es que hay un caso agudo diagnosticado por cada 100 pacientes crónicos. El signo de Romaña es el signo más típico de portal de entrada del parásito. Se caracteriza por una hinchazón indolora de uno o ambos párpados de un ojo, los párpados se tornan de color azulado, y la congestión conjuntival y la hipertrofia de los ganglios linfáticos satélite (generalmente preauriculares) ocurren con frecuencia. El edema puede propagarse a la mitad de la cara; a veces se observa dacrioadenitis y disminución de la secreción conjuntival. El chagoma es otro signo de portal de entrada parasitario a través de la piel, caracterizado por una lesión eritematosa maculonodular, consistente, indolora, rodeada de hinchazón y aumento del volumen de ganglios linfáticos satélite, más a menudo encontrada en áreas abiertas y a veces ulcerado (Rojo-Medina et al. 2018). La fiebre es un signo constante, con frecuencia acompañado de malestar, astenia, anorexia y dolor de cabeza. La fiebre suele ser más alta en los niños, puede ser continua o intermitente, y la temperatura puede ser más elevada durante la tarde. El agrandamiento de

los ganglios linfáticos, la hepatomegalia, la esplenomegalia y el edema subcutáneo son los principales signos sistémicos, junto con alteraciones cardíacas y neurológicas. El agrandamiento de los ganglios linfáticos es frecuente, de intensidad ligera o moderada, aislado o contiguo, con una superficie lisa, indoloro, duro y no adherente, y no fistulosa. La hepatomegalia y la esplenomegalia también son frecuentes, con características similares a las de los ganglios linfáticos. La leucocitosis leve a moderada puede ocurrir durante la fase aguda de la enfermedad, con linfocitosis (linfocitos atípicos), plasmocitosis y neutropenia relativa. Se puede observar eosinofilia durante la evolución de la enfermedad. La mortalidad en la fase aguda solía ser alrededor del 5% de todos los casos sintomáticos, a menudo como consecuencia de la meningoencefalitis o miocarditis. Sin embargo, hoy en día este porcentaje ha disminuido como resultado del uso de drogas específicas. La cura espontánea, aunque excepcional, puede ocurrir como ha sido descrita anteriormente (Zeledón et al. 2018)

1.7.2. Fase crónica:

La fase crónica comienza (2-3) meses después de la infección inicial cuando las manifestaciones clínicas de la fase aguda desaparecen (si están presentes), y la parasitemia cae a niveles indetectables. En la mayoría de los casos, la fase crónica se presenta como una forma indeterminada, que puede evolucionar a las formas cardíacas, digestivas o cardiodigestivas después de años o décadas. El diagnóstico se realiza mediante pruebas serológicas, como la hemaglutinación indirecta, la inmunofluorescencia indirecta y ELISA, todas las cuales tienen alta sensibilidad y especificidad. El concepto de la forma indeterminada no se basó en hallazgos histológicos, sino en el hecho de que las lesiones viscerales no podían detectarse mediante un examen clínico y exámenes rutinarios complementarios en una proporción significativa de pacientes en la fase crónica de Enfermedad de Chagas. Un individuo infectado crónicamente con *T. cruzi* permanece en la forma indeterminada, generalmente durante un período de (10-30) años. Ha habido pocos estudios patológicos centrados en individuos con la forma indeterminada. Los estudios de necropsia de pacientes que murieron por causas accidentales revelaron miocarditis leve con pequeños focos dispersos de infiltración intersticial por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, junto con una reducción limitada en el número de neuronas cardíacas y plefilosis

miofóricos que son insuficientes para producir manifestaciones clínicas (Lopes et al. 1981). La forma cardíaca es la manifestación más grave y frecuente de la enfermedad crónica de Chagas. Se desarrolla en 20-30% de individuos y se manifiesta como tres síndromes principales que pueden coexistir en el mismo paciente: arrítmico, insuficiencia cardíaca y tromboembolismo.

1.8. Vacunas:

Las vacunas tienen un impacto indiscutible en el control de muchas enfermedades humanas y veterinarias importantes y, sin duda, han dado forma al panorama de la salud de las últimas generaciones. Las ventajas de una vacuna contra la enfermedad de Chagas serían significativas no sólo en términos de salud pública, sino también de desarrollo económico y social (Hotez and Ferris 2006). Recientemente, el creciente conocimiento sobre la respuesta inmunitaria asociada a la enfermedad de Chagas ha sido valioso para el diseño y las pruebas de los enfoques de vacunación, el desarrollo de técnicas recombinantes permitió la producción de diferentes inmunógenos, desde proteínas recombinantes hasta vacunas génicas y el adenovirus para la infección experimental por *T. cruzi* (Garg and Bhatia 2005; Cazorla et al. 2009). Las proteínas recombinantes permitieron probar varios antígenos bien definidos, pero la principal característica inmune inducida por estos antígenos es la producción de anticuerpos específicos. Desafortunadamente, los anticuerpos no son tan eficaces en el control de la infección por *T. cruzi* como en otras infecciones. Los parásitos pueden persistir como amastigotes dentro de las células huésped, evitando el contacto directo con los anticuerpos. Incluso después de la liberación de las células infectadas, los parásitos pueden sobrevivir y ser fácilmente detectados en el torrente sanguíneo de animales y pacientes infectados crónicamente a pesar del alto nivel de anticuerpos específicos que circulan. Los protocolos de vacunación han tenido éxito en la disminución de la parasitemia, el daño tisular y la mortalidad en modelos de ratón inmunizados con diferentes genes *T. cruzi* (Rodrigues et al. 2009). La idea principal para la producción de vacunas se dividió en dos conceptos, el primer concepto es producir vacunas contra los trypomastigotes para bloquear su entrada después de una picadura de triatomino infectada, y esto evitará la iniciación o persistencia de la infección y limitará la parasitemia. El segundo concepto es producir vacunas contra los

amastigotes replicativos intracelulares para inhibir la propagación de parásitos en el huésped y evitar que el parásito entre en la sangre.

1.8.1. Formas de desarrollo de vacunas:

La generación de vacunas anteriores contra *T. cruzi* fue el uso de parásitos inactivados por calor o el uso de fracciones subcelulares del parásito. Principalmente se utilizaban se utilizaban antígenos subóptimos de proteínas de epimastigotes (la etapa divisible dentro del sistema digestivo del vector), y otras etapas infecciosas e intracelulares de *T. cruzi*. La vacuna se probó en diferentes modelos animales (es decir, ratones, perros, conejillos de indias y monos). Se cree que la pérdida de epítomos protectores durante la inactivación y el fraccionamiento fue la causa del éxito limitado alcanzado en esos intentos (Garg and Bhatia 2005; Bhatia and Garg 2008).

La siguiente generación de vacunas estaba probando vacunas vivas con componentes de cepas de *T. cruzi* acompañadas de tratamientos con agentes farmacológicos, pasajes en serie en cultivos in vitro o “knockout” genéticos con pérdida de genes potencialmente virulentos. Estas vacunas han encontrado ser eficaces para controlar la infección con una desventaja el peligro de reversión de las cepas atenuadas a una forma virulenta y la probabilidad de mayor virulencia

Los antígenos ofrecían una serie de propiedades atractivas como candidatos a vacunas, incluidas las abundantemente expresadas en las etapas infecciosas e intracelulares de *T. cruzi* y altamente inmunogénicas en la infección natural. Entre las proteínas recombinantes purificadas de *T. cruzi* que se utilizaron como candidatos vacunales se encuentran las proteínas GP90, GP82, GP56, Cruzipain (Cz), barra paraflagelar (paraflagellar rod, PFR), TC52 y la proteína reguladora de complemento (PRC) y la proteína ASP2 que mostraron capacidad para inducir respuestas de anticuerpos, pero no fueron eficientes en la eliminación parasitaria ni para estimular la inmunidad mediada por células, que es esencial para controlar la etapa intracelular del patógeno (Cazorla et al. 2009).

En las últimas dos décadas se utilizaron ampliamente vacunas de ADN desnudas para controlar la infección por *T. cruzi*. Varios plásmidos o vectores virales que contienen un gen de interés se inyectaron directamente en animales experimentales. El uso de plásmidos facilita la expresión del gen recombinante insertado directamente en las células huésped de los mamíferos, seguido de una rápida respuesta inmune del huésped. Se han utilizado varias proteínas *T. cruzi* como vacunas génicas: TSA1, ASP1, ASP2, LYT1, CRP y Cz (Garg and Tarleton 2002). Algunos de éstas tuvieron una mayor respuesta inmune protectora en modelos de ratones y otros fueron capaces de reducir el bloqueo o disminución de la reacción inflamatoria en el tejido cardíaco de ratones y músculo esqueléticos (Aparicio-Burgos et al. 2011).

El uso de adyuvantes contribuyen en la mejora de la eficacia de la vacuna. Inicialmente los adyuvantes en vacunas contra la enfermedad de Chagas fueron propuestos y aplicados por (Menezes 1965), y más recientemente el uso de citoquinas como Interleucina 12 (IL-12) y las moléculas co-estimulantes (por ejemplo, GM-CSF, CD40, HSP70) que se utilizaron para mejorar la respuesta inmunitaria tipo Th1 de vacunas de antígeno definido, generó una gran expectativa. El factor estimulante de crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) se eligió como adyuvante genético porque es una potente citoquina, capaz de mejorar la presentación de antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos profesionales, como las células dendríticas y facilita la inmunidad mediada por células B y T (Warren and Weiner 2000). La IL-12 es una citoquina clave implicada en la activación y proliferación de células T CD8+ y en la dirección de las respuestas inmunitarias al tipo 1 (Pan et al. 1999).

Las vacunas basadas en el estudio sistemático del genoma del parásito se consideraron el foco principal de nuestro estudio, utilizando la base de datos de secuencias de *T. cruzi* (El-Sayed 2005). Los sofisticados programas bioinformáticos están diseñados para evaluar las funciones genéticas sobre la base de homologías con genes caracterizados en otros organismos y la presencia de motivos predictivos de la orientación, la localización celular, la expresión superficial y funcional características del producto genético. Dichos programas, han permitido pasar directamente de la información de una secuencia a la identificación de

objetivos antigénicos y el diseño de vacunas (Bhatia et al. 2004). A partir de una base de datos de secuencias expresadas por *T. cruzi* y basados en herramientas bioinformáticas encontradas en la web, junto con una estrategia experimental para el desarrollo de vacunas contra *Trypanosoma cruzi*, se identificaron ocho genes putativos que codifican para proteínas ancladas a membrana por glicosilo-fosfatidilino (GPI) y con potencial antigénico. De las secuencias seleccionadas por este enfoque se identificaron tres proteínas (TcG1, TcG2 y TcG4) como candidatos vacunales, que están conservadas en el genoma de cepas *T. cruzi* de importancia clínica. Estos se expresaron en diferentes etapas de desarrollo del parásito e inmunogénicos en múltiples huéspedes. Los candidatos seleccionados fueron reconocidos por anticuerpos líticos y células T CD8⁺ en ratones infectados (Bhatia and Garg 2008). Ratones inmunizados con los antígenos seleccionados presentaron una respuesta de anticuerpos trypanolíticos que estaba de acuerdo con la intensidad de la expresión superficial de estas proteínas en etapas infecciosas e intracelulares del parásito (Bhatia et al. 2004) y citoquinas tipo 1 (IFN- γ > IL4). Desde entonces, se ha examinado la eficacia protectora de TcG1, TcG2 y TcG4 (individualmente o en combinación con y sin Adyuvante de citoquinas (IL-12 y GM-CSF) en ratones. Los datos establecieron claramente que la co-entrega de los antígenos provocaba inmunidad aditiva y protección contra la infección por *T. cruzi*, tras la infección. Los ratones vacunados con TcVac2 produjeron anticuerpos IgG2b/IgG1 específicos del antígeno (TcG4 > TcG2 > TcG1) y se provocó una respuesta de células T con dominancia CD8⁺, asociada a las citoquinas de tipo 1 (IFN- γ y TNF- α), en comparación con los controles que provocaban una respuesta de citoquinas de tipo 1/tipo 2 mixta contra la infección por *T. cruzi*. Es importante destacar que, con el control de la carga del parásito, la activación esplénica de células T CD8⁺ y las citoquinas IFN- γ /TNF- α que son de importancia patológica en la enfermedad crónica disminuyeron y las citoquinas IL-4/IL-10 se convirtieron en dominantes en ratones vacunados. En consecuencia, por primera vez, una vacuna mostró una eficacia exitosa en la reducción de la carga del parásito tisular cebando primero una respuesta de células T de tipo 1 polarizada y luego cambiando a una dominación tipo 2 suprimiendo la evolución de la inmunopatología y el daño tisular que son el resultado de la activación inmune constante en la enfermedad chagásica crónica.

1.9. Sistema de electroporación:

Se han propuesto diferentes enfoques no virales para la administración de medicamentos y genes, como los métodos físicos y químicos. Dentro de los sistemas de administración física más eficientes, se pueden incluir la electroporación, la microinyección, la pistola genética, los tatuajes, el láser y el ultrasonido (Bolhassani and Rafati 2011). La electroporación (EP) es la formación de poros acuosos en bicapas de lípidos mediante la aplicación de un pulso corto (microsegundos a milisegundos) de alto voltaje para superar la barrera de la membrana celular. Este estado transitorio y permeabilizado se puede utilizar para cargar células con una variedad de moléculas diferentes, incluyendo iones, fármacos, colorantes, trazadores, anticuerpos, oligonucleótidos, ARN y ADN (Faurie et al. 2005). La electroporación ha demostrado ser útil tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, los datos muestran que la electroporación de las vacunas de ADN *in vivo* es un método eficaz para aumentar la aceptación celular del ADN y la expresión génica en el tejido, lo que conduce a una notable mejora de las respuestas inmunitarias. La electroporación representa una forma de aumentar el número de células transfectadas por el ADN y mejorar la magnitud de la expresión génica, al tiempo que reduce la variabilidad entre sujetos y requiere menos tiempo para alcanzar una respuesta inmune máxima en comparación con la inyección intramuscular de la vacuna (Monie et al. 2009). La administración de vacunas de ADN mediante electroporación ya se ha probado con éxito en una amplia gama de modelos de enfermedades. La electroporación se ha utilizado para mejorar las respuestas inmunitarias utilizando vacunas de ADN dirigidas contra enfermedades infecciosas como la gripe, el VIH, la hepatitis C, el paludismo, el ántrax o para tratar o prevenir el desarrollo de tumores como el cáncer de mama, el cáncer de próstata y melanoma (Best et al. 2009; Daemi et al. 2012).

La aplicación de electroporación *in vivo* a los sitios que reciben ADN plásmido inyectado ha permitido aumentos dramáticos en las respuestas inmunitarias en comparación con la inyección de ADN plásmido solo (Widera et al. 2000). En cuanto al EP *in vivo* se lleva a cabo predominantemente por vía intramuscular, actualmente, la piel EP se utiliza como una opción atractiva y menos invasiva que es capaz de inducir respuestas inmunitarias adaptativas robustas. Hasta la fecha, los estudios de ADN EP en la piel se han centrado principalmente en la expresión de antígenos, inmunidad humoral específica del antígeno, la inducción de

células T de producción de IFN y eficacia protectora a la infección (Bråve et al. 2011; Daemi et al. 2012). La vacunación por el ADN plásmido mediante electroporación cutánea (EP) es un método prometedor capaz de provocar respuestas humorales robustas y de células inmunes T CD8+ (Bråve et al. 2011). Los investigadores han demostrado que la electroporación de bajo voltaje puede inducir inmunidad y proteger a los ratones de manera efectiva (Zhou et al. 2008). Además, la electroporación intradérmica del ADN es uno de los métodos no virales más eficientes para la administración de genes en la piel (Lin et al. 2012b).

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) más importantes de América Latina. Esta enfermedad también reconocida como una enfermedad desatendida, afecta a la población más vulnerable con una voz pública limitada. Las ETD tienen un enorme impacto en las personas y las familias de los países de bajos ingresos. La enfermedad de Chagas es endémica en América Latina, pero debido a la gran movilidad de la población, la enfermedad ha llegado a muchos países no endémicos (Japón, Canadá, Estados Unidos, varios países de Europa y Australia), y causa alrededor de 10.000 muertes cada año. El Banco Mundial ha considerado a la enfermedad de Chagas como un problema de salud global ya que se estima que 10 millones de personas están infectadas, y alrededor de 75-90 millones están en riesgo de ser infectados. La enfermedad de Chagas es más frecuente que el paludismo o el dengue y se ha reportado que cada año se pierden 725.000 días de trabajo debido a muertes prematuras, y se de 1.200 millones de dólares en los siete países del cono sur debido a la ausentismo de trabajadores.

La infección de *Trypanosoma cruzi* tiene sólo dos tratamientos de acceso limitado hasta ahora (Nifurtimox y Benznidadzol) además, no son ideales porque: No son eficaces en la fase crónica de la enfermedad, y finalmente pueden causar graves efectos secundarios adversos. Las instituciones de investigación de vacunas no han podido desarrollar una nueva vacuna con inmunidad absoluta. El presupuesto de la organización de ETD sólo da menos del 1% para la investigación, sólo 20 millones de los 3.063 millones de dólares se gastan en investigación de Chagas. Se necesita más investigación y desarrollo para asegurar a las familias que sufren la infección.

De ahí que es necesario generar más investigación enfocada a mejorar la respuesta inmunitaria de las vacunas, y producir una estrategia vacunal que produzca un efecto duradero, de bajo costo y eficaz para prevenir y/o tratar el mal de Chagas.

HIPÓTESIS

Capítulo uno:

La vacuna TcVac1, aplicada por electroporación intradérmica en ratones BALB/c, induce una mejor respuesta inmune protectora contra la infección por *T. cruzi* con trypomastigotes Sylvio10x/4 más que los ratones vacunados intramusculares.

Capítulo dos:

La dosis de inmunización con ADN plasmídico a través de la electroporación intradérmica, puede reducirse manteniendo su eficiencia en la inducción de una respuesta inmune protectora contra una infección experimental en modelo murino.

Capítulo tres:

El análisis histopatológico mediante software es más preciso y objetivo que el análisis visual comúnmente utilizado en el diagnóstico por microscopía simple de la enfermedad de Chagas en ratones infectados experimentalmente.

OBJETIVOS

Capítulo uno:

Evaluación de la eficiencia de la vacuna TcVac1 de ADN recombinante, aplicada por electroporación intradérmica, a través del análisis de la respuesta inmune en ratones vacunados e infectados con la cepa *Sylvio 10X/4 de T. cruzi*.

Capítulo dos:

Evaluar la eficacia protectora de diferentes dosis de la vacuna TcVac1, suministrada a través de electroporación intradérmica contra una infección de *T. cruzi* en modelo murino.

Capítulo tres:

Determinar la capacidad de mejorar el diagnóstico histopatológico asistido por computadora en cortes histopatológicos de tejidos cardíacos de ratones infectados con *T. cruzi*, mediante el uso del software Image-pro plus aplicando las técnicas colorimétricas en el conteo de los infiltrados linfocitarios, hipertrofia ventricular y los cardiomiocitos viables.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Capítulo uno:

1.1. Declaración ética

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo bajo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de las normas oficiales mexicanas (NOM-62-ZOO-1999) (Ochoa 1999). El Comité de Cuidado Animal de Laboratorio de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del estado de México (UAEM, Toluca, México) aprobó todos los protocolos.

1.2. Ratones y parásitos

Los ratones hembra de BALB/c (6 a 8 semanas de edad, n=48) fueron comprados a CINVESTAV, IPN, México y se mantuvieron en el bioterio del CIESA de la FMVZ de la UAEM. Los parásitos (*T. cruzi* trypomastigotes de cepa *Sylvio* 10X/4) se cultivaron en monocapa continua de la línea celular Vero propagadas en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con un 2% de suero bovino fetal (FBS), un 1% de penicilina-estreptomicina, y cultivados en condiciones controladas (37° C, 5% de CO₂ y humedad saturada) (Manning-Cela et al. 2001). Todos los componentes de medios fueron comprados a Gibco Laboratories, EE. UU.

1.3. Vacuna TcVac1

La codificación cDNAs para TcG2 y TcG4 (aislado *Sylvio* X10/4, GenBank: AY727915 y AY727917, respectivamente) clonados en plásmidos de expresión eucariota (pcDNA3.1.TcG2 y pCDNA3.1.TcG4) y los plásmidos que codifican para IL-12 (pcDNA3.1-msp35 y pcDNA3.1-msp40), y GM-CSF (pcMVI.GM-CSF) han sido descritos previamente (Bhatia et al. 2004; Garg and Bhatia 2005). Todos los plásmidos fueron

transformados en células competentes de *E. coli* DH5- α , cultivadas en caldo LB que contienen 100 mg/ml de ampicilina, y purificados utilizando el kit de Maxiprep para Plásmidos GeneJET (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham , Massachusetts, EE.UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La vacuna se constituyó de 25 μ g de cada plásmido y se entregó en un volumen final total de 50 μ l por ratón.

1.4. Inmunización y desafío a la infección

Los ratones se distribuyeron aleatoriamente a los grupos de tratamiento (n=12 por grupo) de la siguiente manera: grupo I, Sólo plásmido, pcDNA3.1 vacío (25 μ g/ratón) a través de electroporación intradérmica (IDE)-desafío infección; grupo II, vacuna TcVac1 ADN (25 μ g cada uno de los 5 plásmidos de ADN que componen la vacuna) a través de IDE - desafío infección; grupo III, Sólo pcDNA3.1 vacío plásmido (25 μ g/ratón) a través de la infección intramuscular (IM) – desafío infección; y la vacuna de ADN TcVac1 del grupo IV (25 μ g cada una de los 4 plásmidos de ADN que componen la vacuna/ratón) a través de desafío infección. Seis animales de cada grupo fueron sacrificados para evaluar la vacuna antes de la infección y los seis animales restantes de cada grupo fueron infectados y luego evaluados durante la fase aguda de la enfermedad

A los animales se les administró la vacuna de ADN (TcVac1) o placebo (pcDNA3) por inyección intramuscular (IM) en el músculo del cuádriceps o por electroporación intradérmica (IDE). La vacuna, o placebo, se entregó cuatro veces, a intervalos de 3 semanas. Para IDE, los ratones se sedaron (mezcla de ketamina/xilazina, contiene: 87,5 mg/kg de ketamina y 12,5 mg/kg de xilazina, 0,1 ml/20g de peso de ratón. inyección IP) y afeitados en la zona dorsal inferior, justo por encima de la base de la cola, y la vacuna TcVac1 de ADN se entregó mediante inyección intradérmica. Inmediatamente después, la electroporación se realizó en el lugar de la inyección con 5 pulsos a 450 voltios/cm², intervalo de pulso de 0,050 ms y ancho de banda de 0,125 ms utilizando un sistema de electroporación Cyto Pulse Sciences TM PA-4000 PulseAgile®. Este dispositivo consta de una matriz de electrodos de 4 x 4 con un espaciado de 1,5 mm para proporcionar una cobertura óptima en el lugar de inyección de ADN (Lin et al. 2012b).

Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron utilizados para evaluar las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna o desafiados con la cepa *Sylvio* 10X/4 de *T. cruzi* (10.000 trypomastigotes/ratón, intraperitonealmente). Sesenta días después, al final de la fase aguda de la infección, se sacrificaron ratones y se obtuvo sangre para la evaluación serológica, se recogió bazo para ensayos de activación de linfocitos, y el corazón y secciones de músculo esquelético fueron y preparados para análisis histológicos.

1.5. Muestras de sangre

La sangre de ratones se obtuvo directamente del corazón en el momento del sacrificio (Parasuraman et al. 2010). Se permitió que las muestras de sangre coagularan a 4°C y se separó suero y se almacenó a -20°C.

1.6. Proliferación de linfocitos

Los bazos se diseccionaron en condiciones estériles, se lavaron en PBS frío (4° C) y se pasaron a través de un colador de células de nylon de 40 mm (Corning, EE. UU.). Las células fueron lavadas y suspendidas en 1,5 ml de PBS, colocadas suavemente sobre Histopaque filtrado estéril®-1077 (1,5 ml, densidad: 1.077 g/mL, Sigma-Aldrich, EE.UU.), y centrifugadas a 2300 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. Los esplenocitos fueron cuidadosamente recogidos, lavados dos veces con PBS, y resuspendidos en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) complementados con 10% FBS (Sigma-Aldrich). Se añadieron esplenocitos (2×10^5 células por pozo) a las placas de cultivo de tejido de 96 pozos Nunc Maxisorp e incubaron durante 48 h en presencia o ausencia de lisados de trypomastigotes de *T. cruzi* (TcTL) (Gupta and Garg 2010) o antígenos TcG2 o TcG4 recombinantes (10 mg/ml). Los esplenocitos incubados con fitohemagglutinina (PHA, Thermo Scientific) se utilizaron como control positivo. El Ensayo de Proliferación celular de una solución (Promega) de CellTiter 96® se utilizó para medir el número de células viables. En resumen, las células fueron incubadas con sal de tetrazolium MTS (10 l MTS/100 l), y su reducción al producto de formazán de color se registró a 490 nm mediante el uso de un espectrofotómetro de

microplaca EPOCH (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). El índice de estimulación (StI) se definió como la relación de la señal de absorbancia observada en el control negativo (C) y en las células estimuladas (S) y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{StI} = (S - C)/C$$

Donde S y C representan los valores de absorbancia (OD) para células de control estimuladas (TcG2, TcG4, TcTL y PHA) y negativas (pozos que contienen sólo esplenocitos y medio RPMI-1640), respectivamente.

Se utilizó un grupo de ratones (n=6), tratado con solución salina, para calcular el valor límite y se representó de la siguiente manera: media de StI de todos los grupos de control negativos (solución salina, pcDNA3.1-IDE y pcDNA3.1-IM) - SD antes y después de la infección por desafío.

1.7. Serología

Las muestras de suero se obtuvieron dos semanas después de la última inmunización y 60 días después de la infección por desafío, según trabajos anteriores (Bhatia and Garg 2008) Brevemente: placas Nunc Maxisorp de Fondo plano, de 96 pozos, fueron recubiertas con lisado de *T. cruzi* o proteínas recombinantes TcG2 o TcG4 (500 ng/pozo/100 l) diluidas en tampón 0,05 M NaCO₃/NaHCO₃, pH 9,6. La concentración de proteínas se estandarizó en un ensayo independiente para elegir la concentración óptima para el experimento a partir de 1, 2,5 y 5 ng/pozo/100 µl. Las placas se lavaron dos veces con PBS-0.05% Tween 20 (PBST), y se bloquearon con (5% de leche seca sin grasa -PBST). Las placas se lavaron de nuevo, y se incubaron a 37°C durante 2 h cada una con muestras de sueros (1:50 dilución, 200 µl/pozo) y con anticuerpos de cabra anti-ratón IgG, IgG1, IgG2a, o anticuerpos IgG2b (1:5000 dilución en PBST-3% leche seca no grasa (NFDM) marcados con peroxidasa. Todos los pasos de lavado se llevaron a cabo mediante el uso de equipo de lavado ELx50Tm (BioTech), y todos los anticuerpos fueron comprados a Bethyl Laboratories, Inc. El color fue desarrollado por incubación con sustrato Sure Blue TMB de 100-µl/pozo (Kirkegaard & Perry Labs) a temperatura ambiente durante 15 minutos, la reacción se detuvo con ácido

sulfúrico 2N y el cambio de color fue monitoreado a 450 nm usando un lector de microplacas Epoch. En el ensayo de ELISA para controles positivos y negativos, respectivamente, se utilizó suero de ratones positivos conocidos (n=6) y negativos conocidos (n=6). El valor de corte se estableció en el valor medio \pm 2 SD de los controles negativos. Los controles positivos siempre estaban por encima de ese valor.

1.8. Parasitemia y mortalidad

Se recogieron muestras de sangre a partir de los 7 días posteriores a la infección (pi), en días alternos, hasta 50 días pi. Los frotis de sangre fresca se analizaron mediante microscopía ligera a un aumento final de 400 veces, y los parásitos se contaron en todos los campos microscópicos por diapositiva (BRENER 1962). La mortalidad se registró diariamente y se realizó un análisis de la tasa de supervivencia, los resultados fueron analizados estadísticamente por la prueba Mantel-Cox.

1.9. Histología

Seis ratones por grupo fueron sacrificados humanamente bajo anestesia el día 15 después de la última inmunización y los seis ratones restantes fueron sacrificados a los 60 días posteriores a la infección por desafío. Las muestras del músculo esquelético y el corazón se fijaron en 10% de formaldehído e incrustaron en parafina. Se prepararon secciones en serie de 5 μ m de espesor a partir de áreas no consecutivas, teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), y se examinaron al menos cinco secciones por tejido para cada ratón para detectar la presencia de inflamación aguda y nidos de parásitos (magnificación: 400X y 100X).

1.10. Puntuación de parasitismo e inflamación de los tejidos

El parasitismo tisular se evaluó contando los nidos de amastigotes presentes en 100 campos microscópicos en cada uno de los órganos analizados. Del mismo modo, el infiltrado inflamatorio se visualizó en >200 campos microscópicos de las secciones de tejido del

corazón y el músculo esquelético, utilizando el siguiente sistema de puntuación (método ordinal):

Clave del sistema de puntuación histopatológica

Parámetro/Puntuación	0	1	2	3	4
Linfoplasmocitosis Focal	Ninguna (0%)	Rara (1- 10%)	Leve (11- 25%)	Moderada (26-50%)	Severa (≥51%)
Linfoplasmocitosis difusa	Ninguna (0%)	Leve (1- 10%)	Moderada (11-40%)	Unidos (41-80%)	Difusa (≥80%)
Infiltración Polimorfonuclear/Leucocitos/linfocitos	Ninguna (0%)	Rara (1- 10%)	Ligera (11- 20%)	Moderada (21-30%)	Severa (≥31%)
Necrosis	Ninguna (0%)	Rara (1- 5%)	Ligera (6- 10%)	Moderada (11-30%)	Severa (≥31-70%)
Nidos de amastigotes	Ninguna (0%)	Pocos (1-2)	Ligera (3-5)	Moderada (6-10)	Severa (≥11)

Los criterios de puntuación se basaron en estudios anteriores (Bhatia et al. 2011; Gibson-Corley et al. 2013). Tres patólogos analizaron ciegamente las muestras, y se registraron los resultados finales del consenso.

1.11. Análisis estadístico

Los ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad se distribuyeron aleatoriamente y se dividieron en seis grupos (n=12) para la homogeneidad de las varianzas entre sí (Steel et al. 1997). Los tratamientos se asignaron aleatoriamente a las unidades experimentales con seis animales por tratamiento antes del desafío y seis después de la infección por desafío.

Se utilizó un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey para evaluar las diferencias entre los grupos animales en los datos cuantitativos; mientras tanto, la prueba exacta de Fisher se utilizó para datos cualitativos y semicuantitativos. Todo el análisis estadístico se procesó utilizando SAS® University Edition Software y el software GraphPad Prism 6.

2. Capítulo dos:

2.1. Declaración ética

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo bajo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de las normas oficiales mexicanas (NOM-62-ZOO-1999) (Ochoa 1999). Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Cuidado Animal de Laboratorio (CICUAL-DISP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM, Toluca, México).

2.2. Ratones y parásitos

Los ratones hembra CD1 (6 a 8 semanas de edad, n=42) fueron comprados a CINVESTAV, IPN, México y mantenidos en las instalaciones de "Centro de investigación y estudios avanzados en salud animal" (CIESA-FMVZ-UAEM, Toluca, México). Los animales tenían una dieta equilibrada y acceso ad-libitum al agua y se observaban diariamente durante todo el período experimental en busca de anomalías clínicas. Los trypomastigotes de *T. cruzi* (cepa MHOM/MX/1994/Ninoa) se propagaron en cultivo monocapa de células Vero, mantenidas en medio DMEM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 2%, complementados con 1% de penicilina-estreptomicina y cultivados en condiciones controladas (37°C, 5% CO₂, con humedad saturada) (Manning-Cela et al. 2001). Todos los componentes de medios fueron comprados a Gibco Laboratories, EE. UU.

2.3. Vacuna TcVac1 modificada

La codificación cDNAs para TcG2 y TcG4 (aislado de *Sylvio* X10/4, GenBank: AY727915 y AY727917, respectivamente) se han descrito previamente (Bhatia et al. 2004; Garg y Bhatia 2005). Todos los plásmidos fueron transformados en células competentes de *E. coli* DH5- α , cultivados en caldo LB que contiene 100 mg/ml de ampicilina, y purificados

utilizando el kit de Maxiprep de Plásmido GeneJET (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EE. UU.) según especificaciones del fabricante. Cada ratón recibió una dosis única de vacuna de una de las cuatro dosis diferentes (1, 5, 10 o 20 μg de cada plásmido) en una sola aplicación sin adyuvantes (IL-12 o GMCSF), en 50 μl de volumen final por ratón, a través de la entrega por electroporación intradérmica.

2.4. Inmunización y desafío a la infección

Los ratones (N=60) se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos de tratamiento (n=12 por grupo) de la siguiente manera: I, PCDNA3.1 vacío (control); II, 1 μg^* ; III, 5 μg^* IV, 10 μg^* ; y V, 20 μg^* (* vacuna TcVac1 modificada y desafío con *T. cruzi*). Todos los animales fueron vacunados por electroporación intradérmica (IE) como se describió anteriormente (Hegazy-Hassan et al. 2019), brevemente: los ratones fueron sedados (ketamina/xilacina, 0,1 ml/20 g de ratón wt. inyectado por IP), el pelo de la región dorsal inferior rasurado, justo por encima de la base de la cola, y se inyectó el ratón de 0,1 ml/20 g con vacuna M-TcVac1 administrada por inyección intradérmica. Inmediatamente después, la electroporación se llevó a cabo en el lugar de la inyección de la vacuna con cinco pulsos a 450V/cm², intervalo de pulso de 0.050 msec y ancho de banda de 0.125 msec utilizando un Cyto Pulse Science™ (PA-4000 PulseAgile® sistema de electroporación), equipado con 4 x 4 matriz de electrodos con 1,5 mm de separación entre ellos.

Los ratones fueron utilizados para evaluar las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna (15 y 30 días después de la vacunación) (n=6/grupo), o se les desafió con la cepa MHOM/MX/1994/Ninoa de *T. cruzi* (500 trypomastigotes/ratón, intraperitonealmente) (n=6/grupo). Treinta días después, cuando se produce el pico de la fase aguda de la infección, los ratones fueron sacrificados, y se recogió sangre para la evaluación serológica, el corazón y el músculo esquelético fueron diseccionados y preparados para análisis histológicos.

2.5. Recogida de muestras de sangre

La sangre de ratones se obtuvo mediante la técnica de sangrado retro-orbital durante el experimento o directamente del corazón en el momento del sacrificio (Van Herck et al. 2001). Se permitió que las muestras de sangre coagularan a 4°C, se separó el suero y todas las muestras de suero se almacenaron a -20°C.

2.6. Parasitemia

La parasitemia se evaluó para cada ratón a través de un frotis de sangre fresco los días 5, 10, 15, 20 y 30 después de la infección. La evaluación se realizó de acuerdo con Brener (1962), brevemente: se recogió sangre (5 µl), se colocó en un portaobjetos de vidrio, se cubrió con un cubreobjetos (18 x 18 mm) y se observó bajo microscopía ligera en aumento 400X. Se contaron parásitos en 100 campos, y se estimó el número de parásitos/µl con protocolos estándar (Kuhn et al. 1975; Rowland and Sibley-Phillips 1984).

2.7. Tasa de supervivencia

Los animales fueron monitoreados diariamente durante el período experimental posterior a la infección (30 días) y los signos clínicos y las muertes registradas para cada grupo.

2.8. Serología

Las muestras de suero se obtuvieron dos y cuatro semanas después de la inmunización y 30 días después de la infección por desafío. Placas Nunc Maxisorp de fondo plano de 96 pozos, fueron recubiertas con lisado de *T. cruzi* (equivalente a 5×10^5 parásito / pozo) o proteínas TcG2 o TcG4 recombinantes (500 ng/pozo/100 µl) diluidas en tampón 0.05 M NaCO₃/NaHCO₃, pH 9.6. Las placas se lavaron dos veces con PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST), y se bloquearon con PBST con leche en polvo descremada al 5%. Las placas se lavaron de nuevo, y se incubaron a 37°C durante 2 h, con muestras de sueros (1:100 dilución, 200 µl/pozo) y el anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano, dilución 1:5000 en PBST-3% leche polvo descremada (NFDM). Todos los pasos de lavado

se llevaron a cabo mediante el uso del equipo ELx50Tm (BioTech), y todos los anticuerpos fueron comprados a Bethyl Laboratories, Inc. El color fue desarrollado por incubación con sustrato Sure Blue TMB, 100- μ l/pozo (Kirkegaard & Perry Labs) a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2N (100- μ l/pozo), y el cambio de color fue monitoreado a 450 nm usando un lector de microplacas Epoch.

2.9. Histología

Seis ratones por grupo fueron sacrificados humanamente bajo anestesia el día 30 después de la infección. Las muestras del músculo esquelético y el corazón se fijaron en un 10% de formaldehído e incluyeron en parafina (Barbabosa-Pliego et al. 2009). Se prepararon secciones en serie de espesores de 3 μ m a partir de áreas no consecutivas, teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), y se examinaron al menos cinco secciones por tejido de cada ratón para detectar la presencia de inflamación aguda y nidos de parásitos (magnificación: 400X y 100X).

2.10. Puntuación de parasitismo e inflamación de los tejidos

El parasitismo tisular se evaluó contando los nidos de amastigotes presentes en 100 campos microscópicos en cada uno de los órganos analizados. Del mismo modo, el infiltrado inflamatorio se visualizó en >200 campos microscópicos de las secciones de tejido del corazón y el músculo esquelético, y se calificó utilizando el sistema de puntuación (método ordinal) mencionada en el capítulo anterior

Los criterios de puntuación se basaron en estudios anteriores (Hegazy-Hassan et al. 2019). Tres patólogos analizaron ciegamente las muestras, y se registraron los resultados finales del consenso.

2.11. Análisis estadístico

Los ratones CD1 hembra de 6-8 semanas de edad fueron alojados en las instalaciones animales de CIESA-FMVZ-UAEM y fueron distribuidos aleatoriamente y divididos en seis grupos para la homogeneidad de las varianzas entre sí (Steel et al. 1997). Los tratamientos se asignaron aleatoriamente a las unidades experimentales con seis repeticiones por tratamiento. Los resultados se analizaron en busca de diferencias significativas utilizando el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) y las pruebas de comparación múltiple de Tukey (SAS® University Edition Software) y se consideraron significativas en $p < 0.05$.

3. Capítulo tres:

3.1. Declaración ética

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo bajo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de las normas oficiales mexicanas (NOM-62-ZOO-1999) (Ochoa 1999). El Comité de Cuidado Animal de Laboratorio de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del estado de México (UAEM, Toluca, México) aprobó todos los protocolos.

3.2. Ratones y parásitos

Los ratones hembra de BALB/c (6 a 8 semanas de edad, $n=48$) fueron comprados a CINVESTAV, IPN, México. *T. cruzi* trypomastigotes (cepa *Sylvio* 10X/4) se cultivaron en monocapa continua de la línea celular Vero. Las células Vero se propagaron en el medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con un 2% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de penicilina-estreptomicina, y cultivados en condiciones controladas (37°C, 5% de CO₂ y humedad saturada) (Manning-Cela et al. 2001). Todos los componentes de medios fueron comprados a Gibco Laboratories, EE. UU.

3.3. Vacuna TcVac1

La codificación cDNAs para TcG2 y TcG4 (aislado *Sylvio* X10/4, GenBank: AY727915 y AY727917, respectivamente) clonados en plásmidos de expresión eucariota (pcDNA3.1.TcG2 y pCDNA3.1.TcG4). Todos los plásmidos fueron transformados en células competentes de *E. coli* DH5- α , cultivadas en caldo LB que contienen 100 mg/ml de ampicilina, y purificados utilizando el kit de Maxiprep de Plásmido GeneJET (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EE.UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La vacuna se constituyó de 25 μ g de cada plásmido y se entregó en un volumen final de 50 μ l por ratón.

3.4. Inmunización y desafío a la infección

Los ratones se distribuyeron aleatoriamente a los grupos de tratamiento (n=12 por grupo) de la siguiente manera: grupo I, solo plásmido vacío pcDNA3.1 (25 μ g/ratón) a través de electroporación intradérmica (IDE)- infección de desafío; grupo II, vacuna TcVac1 (25 μ g cada uno de los 5 plásmidos de ADN que componen la vacuna) a través de IDE – infección de desafío; grupo III, solo plásmido vacío pcDNA3.1 (25 μ g/ratón) a través de la inyección intramuscular (IM) – infección de desafío; y la vacuna de ADN TcVac1 del grupo IV (25 μ g cada una de los 4 plásmidos de ADN que componen la vacuna/ratón) e infección de desafío. Seis animales de cada grupo fueron sacrificados para evaluar la vacuna antes de la infección y los seis animales restantes de cada grupo fueron infectados y luego evaluados durante la fase aguda de la enfermedad

A los animales se les administró la vacuna de ADN (TcVac1) o placebo (pcDNA3) por inyección intramuscular (IM) en el músculo del cuádriceps o por electroporación intradérmica (IDE). La vacuna, o placebo, se entregó cuatro veces, a intervalos de 3 semanas. Para IDE, los ratones se sedaron con una mezcla de ketamina/xilazina (87,5 mg/kg de ketamina y 12,5 mg/kg de xilazina, 0,1 ml/20g de peso de ratón) por inyección IP y afeitados en la zona dorsal inferior, justo por encima de la base de la cola, y la vacuna TcVac1 de ADN se entregó mediante inyección intradérmica. Inmediatamente después, la electroporación se realizó en el lugar de la inyección con 5 pulsos a 450 voltios/cm², con un intervalo entre pulsos de 0,050 ms y con ancho de banda de 0,125 ms utilizando un sistema de

electroporación Cyto Pulse Sciences TM PA-4000 PulseAgile®. Este dispositivo consta de una matriz de electrodos de 4 x 4 con un espaciado de 1,5 mm para proporcionar una cobertura óptima en el lugar de inyección de ADN (Lin et al. 2012b).

Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron utilizados para evaluar las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna y/o desafiados con la cepa *Sylvio 10X/4* de *T. cruzi* (10.000 trypomastigotes/ratón, intraperitonealmente). Sesenta días después, al final de la fase aguda de la infección, se sacrificaron los ratones y se recogió sangre para la evaluación serológica, se recogió bazo para ensayos de activación de linfocitos, y el corazón y el músculo esquelético fueron diseccionados y preparados para análisis histológicos.

3.5. Histología

En animales eutanasiados por cámara de CO₂; se realizó disección de corazón, se fijaron en 10% de formaldehído amortiguado e incrustados en parafina. Se obtuvieron 3 secciones y se realizó un tención con hematoxilina e eosina, en breve: Las muestras se han cortado en secciones de unas 3 µm de grosor y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina-alumbre, después se utilizó el siguiente protocolo; 1) 2x10 min en xileno para desparafinar; 2) 2x10 min en etanol 100%; 3) 10 min en etanol 96%; 4) 10 min en etanol 80%; 5) 10 min en etanol 50%; 6) 5 min en H₂O destilada; 7) 5-10 min en Hematoxilina de Mayer (Mayer's Hematoxylin Solution, Wako, # 131-09665); 8) 15 min en agua corriente. Diferenciación; 9) 2x1 min en H₂O destilada; 10) 0.5 a 2 min en Eosina amarillenta (CI 45380) al 0.2 % en H₂O; y finalmente, 11) se incubó unos segundos a 70°C para diferenciación; 12) 20s en etanol 96%; 13) 2x3min n etanol 100%; 14) 2x10 min en xileno; y montar con medio de montaje (Eduardo Montalvo 2010).

Los cortes se evaluaron en el microscopio Axiostar Carl-Zeiss, con fuente halógena de 50W. Las fotos digitales (Tiff) fueron tomadas con el mismo balance de blancos por el software IScapture®; las imágenes fueron capturadas con aumento 400X con la cámara Cooled-CCD Tucsen (5MP). En un área o región de interés predefinida (ROI 25x10⁴ µm²), las reacciones colorimétricas se seleccionaron manualmente, utilizando Software Image-Pro Plus 5.1.

Posteriormente delimitamos un rango de luminancia (85-255 unidades) en el histograma rojo (formato RGB), se grabó como plantilla y se aplicó en imágenes posteriores.

3.6. Análisis estadístico

El infiltrado linfocitario se analizó en un área predefinida de $250 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ en 3 regiones aleatorias del corazón (superior, intermedia e inferior). Para la cuantificación linfocitaria y núcleos de cardiomiocitos se empleó la herramienta (Select Measurements/Area) asignando un rango de 20-12000 μm^2 . La separación de las dos variables se realizó mediante una variable de clasificación simple (asignando dos rangos de área específicas para cada componente).

Las reacciones colorimétricas se compararon con la prueba. Se utilizó un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey para evaluar las diferencias entre los grupos animales en los datos cuantitativos. Todo el análisis estadístico se procesó utilizando SAS® (University Edition Software) y el software GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

Capítulo uno:

Vaccine 37 (2019) 248–257



TcVac1 vaccine delivery by intradermal electroporation enhances vaccine induced immune protection against *Trypanosoma cruzi* infection in mice



Wael Hegazy-Hassan^a, José Antonio Zepeda-Escobar^a, Laucel Ochoa-García^{a,b}, J.M. Eloy Contreras-Ortiz^a, Esvieta Tenorio-Borroto^a, Alberto Barbabosa-Pliego^a, José Esteban Aparicio-Burgos^c, Rigoberto Oros-Pantoja^d, Bruno Rivas-Santiago^e, Héctor Díaz-Albiter^{f,g}, Nisha Jain Garg^{h,i}, Juan Carlos Vázquez-Chagoyán^{a,*}

^a Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlatomulco, Toluca, Estado de México C.P. 50200, Mexico

^b Laboratorio Estatal de Salud Pública del Instituto de Salud del Estado de México, Independencia Oriente #1310 Colonia: Reforma y FFCC, CP: 50070 Toluca, Estado de México, Mexico

^c Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Escuela Superior de Apan, Carretera Apan-Cajulalpan, Km. 8, Chimalpa Tlaloyote S/N, Colonia Chimalpa, Apan, C.P. 43920 Hidalgo, Mexico

^d Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Departamento de Neurociencias, Tolloacan esq. Jesús Carranza S/N, Colonia Moderna de la Cruz, C.P. 50180 Estado de México, Toluca, Mexico

^e Unidad de Investigación Médica Zacatecas-IMSS, Interior de la Alameda, 45, Centro, C.P. 98000 Zacatecas, Mexico

^f Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, University of Glasgow, University Place, Glasgow G12 8TA, United Kingdom

^g El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Villahermosa-Reforma Km 15.5, Ranchería Guineo, sección II, CP 86280 Villahermosa, Tabasco, Mexico

^h Departments of Microbiology & Immunology, University of Texas Medical Branch, 301 University Boulevard, Galveston, TX 77555-1070, United States

ⁱ Departments of Pathology, University of Texas Medical Branch, 301 University Boulevard, Galveston, TX 77555-1070, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2018

Received in revised form 13 November 2018

Accepted 14 November 2018

Available online 27 November 2018

Keywords:

Trypanosoma cruzi

TcVac1

Intradermal electroporation

Intramuscular

Chagas disease

Mice model

ABSTRACT

The efforts for the development and testing of vaccines against *Trypanosoma cruzi* infection have increased during the past years. We have designed a TcVac series of vaccines composed of *T. cruzi* derived, GPI-anchored membrane antigens. The TcVac vaccines have been shown to elicit humoral and cellular mediated immune responses and provide significant (but not complete) control of experimental infection in mice and dogs. Herein, we aimed to test two immunization protocols for the delivery of DNA-prime/DNA-boost vaccine (TcVac1) composed of TcG2 and TcG4 antigens in a BALB/c mouse model. Mice were immunized with TcVac1 through intradermal/electroporation (IDE) or intramuscular (IM) routes, challenged with *T. cruzi*, and evaluated during acute phase of infection. The humoral immune response was evaluated through the assessment of anti-TcG2 and anti-TcG4 IgG subtypes by using an ELISA. Cellular immune response was assessed through a lymphocyte proliferation assay. Finally, clinical and morphopathological aspects were evaluated for all experimental animals. Our results demonstrated that when comparing TcVac1 IDE delivery vs IM delivery, the former induced significantly higher level of antigen-specific antibody response (IgG2a + IgG2b > IgG1) and lymphocyte proliferation, which expanded in response to challenge infection. Histological evaluation after challenge infection showed infiltration of inflammatory cells (macrophages and lymphocytes) in the heart and skeletal tissue of all infected mice. However, the largest increase in inflammatory infiltrate was observed in TcVac1_IDE/Tc mice when compared with TcVac1_IM/Tc or non-vaccinated/infected mice. The extent of tissue inflammatory infiltrate was directly associated with the control of tissue amastigote nests in vaccinated/infected (vs. non-vaccinated/infected) mice. Our results suggest that IDE delivery improves the protective efficacy of TcVac1 vaccine against *T. cruzi* infection in mice when compared with IM delivery of the vaccine.

© 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail address: jcvch@yahoo.com (J.C. Vázquez-Chagoyán).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.041>

0264-410X/© 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is the causative agent of devastating Chagas disease in Latin America. Most common route of parasite transmission to humans is through blood-sucking triatomines. Chagas disease is characterized by an acute and a chronic phase. Once the acute parasitemia abates, most of the infected individuals attain a less fulminant chronic infection. Several years after the infection, 20–35% of the infected individuals develop irreversible lesions of the autonomous nervous system of the heart, and/or esophagus, colon, and peripheral nervous system. Chagas disease represents the major cause of cardiac lesions in young, economically productive adults in the endemic countries [1,2]. Vector control programs have not been able to completely prevent parasite transmission [3], the available anti-parasitic drugs are not sufficiently safe or effective, and no vaccines are currently available [4].

The studies of immune responses in resistant and susceptible models of Chagas disease have been valuable in enhancing our knowledge of the protective immunity and designing of the vaccination approaches against *T. cruzi* infection. The sequencing of *T. cruzi* genome and the development of approaches to produce recombinant proteins have made it feasible to produce, deliver, and test the efficacy of a variety of recombinant *T. cruzi* antigens as potential vaccine candidates in experimental models of infection and disease [5–7]. Indeed, many of the recombinant antigens have been tested as prophylactic vaccines. However, recombinant protein based vaccines failed to provide high efficacy in controlling *T. cruzi* infection [8,9]. This is, at least, partially due to the fact that recombinant proteins elicited potent anti-*T. cruzi* antibody response, but failed to stimulate cellular immunity that is required to control the intracellular replicative form of the parasite. Thus, new candidate antigens as well as new delivery approaches are required to design an efficacious vaccine against *T. cruzi* infection.

Our group has performed computational screening of *T. cruzi* sequence databases reported in GenBank and identified genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins as potential vaccine candidates [5]. Through rigorous analysis over a period of several years, we determined that two of the selected candidate antigens, named TcG2 and TcG4, were maximally relevant for the vaccine development. These two antigens are phylogenetically conserved in a variety of *T. cruzi* lineages, expressed in infective and intracellular stages of the parasite's life cycle, and are recognized by immunoglobulins (IgGs) and CD8⁺ T cells in multiple *T. cruzi*-infected hosts [10]. Intramuscular co-delivery of these antigens as DNA vaccine (TcVac1) induced higher degree of protection from *T. cruzi* infection than was observed by delivery of single antigens in mice [7]. In dogs, TcVac1 candidate vaccine elicited a significant trypanolytic antibody and Th1 cytokine (IFN- γ) response, a property that has been associated with immune control of *T. cruzi* [11].

Antigen delivery methods can result in varying quality and quantity of immune responses. Physical delivery systems, such as electroporation, micro-injection, gene gun, tattooing, laser and ultrasound have been tested for the delivery of DNA-based vaccines against infectious agents [12]. Electroporation (EP) induces the formation of aqueous pores in lipid bilayers by the application of a brief (microseconds to milliseconds), high-voltage pulse to overcome the barrier of the cell membrane. This transient permeabilized state is used to load cells with a variety of different molecules including ions, drugs, dyes, tracers, antibodies, RNA and DNA [13]. Electroporation of DNA *in vivo* has proved to be an effective method, yielding higher level of the cellular uptake of DNA, increase in the number of DNA-transfected cells, and reduced inter-subject variability. Electroporation of DNA vaccine also pro-

vided increased magnitude of gene expression while requiring less time to reach a maximal immune response when compared to the conventional intramuscular approach of DNA vaccine delivery [14]. Increased efficacy of DNA vaccines delivered by electroporation method vs. other methods, has been shown against a wide range of infectious diseases, such as influenza, HIV, hepatitis C, malaria, and anthrax [15]. Electroporation has also been tested for the delivery of drugs and vaccines against a variety of cancers [16,17].

Herein, we describe the protective efficacy of TcVac1 vaccine applied through an intradermal electroporation (IDE) approach. The TcVac1 vaccine was injected in mice via IDE or intramuscular (IM) approach, and mice were then challenged with *T. cruzi*. We have analyzed the function of vaccine-induced antibody and lymphocyte responses in providing protection from acute parasitemia in mice. We also performed histopathological examination of the heart and skeletal muscle, focusing on the efficacy of vaccination protocol in reducing the tissue injury during the acute *T. cruzi* infection.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

All experimental protocols were conducted under the technical specifications for the production, care and use of laboratory animals of the official Mexican standards (NOM-62-ZOO-1999) [18]. The Laboratory Animal Care Committee at the School of Veterinary Medicine and Zootechnics of the Autonomous Mexico State University (UAEM, Toluca, Mexico) approved all protocols.

2.2. Mice and parasites

BALB/c female mice (6–8 weeks old, n = 48) were purchased from CINVESTAV, IPN, Mexico. *T. cruzi* trypomastigotes (Sylvio 10X/4 strain) were cultivated in continuous monolayer of Vero cell line. Vero cells were propagated in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin, and cultured under controlled conditions (37 °C, 5% CO₂, and saturated humidity) [19]. All media components were purchased from Gibco Laboratories, USA.

2.3. TcVac1 vaccine

The cDNAs encoding for TcG2 and TcG4 (Sylvio X10/4 isolate, GenBank: AY727915 and AY727917, respectively) cloned in eukaryotic expression plasmids (pcDNA3.1.TcG2 and pcDNA3.1.TcG4), plasmids encoding IL-12 (pcDNA3.1-msp35 and pcDNA3.1-msp40), and GM-CSF (pcMVL.GM-CSF) have been previously described [5,7]. All plasmids were transformed into *E. coli* DH5- α competent cells, grown in LB-broth containing 100-mg/ml ampicillin, and purified using the GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) according to manufacturer's specifications. The vaccine was constituted of 25- μ g of each plasmid and delivered in 50 μ l final volume per mouse.

2.4. Immunization and challenge infection

Mice were randomly distributed to treatment groups (n = 12 per group) as follows: group I, Only empty pcDNA3.1 plasmid (25 μ g/mouse) via intradermal electroporation (IDE) \pm challenge infection; group II, TcVac1 DNA vaccine (25 μ g each from the 5

DNA plasmids composing the vaccine) via IDE \pm challenge infection; group III, Only empty pcDNA3.1 plasmid (25 μ g/mouse) via intramuscular (IM) \pm challenge infection; and group IV, TcVac1 DNA vaccine (25 μ g each from the 4 DNA plasmids composing the vaccine/mouse) via IM \pm challenge infection. Six animals from each group were sacrificed to evaluate the vaccine previous to the infection and the remaining six animals from each group were infected and then evaluated during the acute phase of the disease.

Animals were given DNA vaccine (TcVac1) or placebo (pcDNA3) by intramuscular (IM) injection in the quadriceps muscle or by intradermal electroporation (IDE). The vaccine, or placebo, was delivered four times, at 3 weeks intervals. For IDE, mice were sedated (ketamine/xylazine mix, contains: 87.5 mg/kg Ketamine and 12.5 mg/kg Xylazine, 0.1 ml/20 g mouse wt. IP injected) and shaved at the lower dorsal area, just above the tail base, and TcVac1 DNA vaccine was delivered by intradermal injection. Immediately afterwards, electroporation was performed at the site of injection with 5 pulses at 450 V/cm², 0.050-msec pulse interval and 0.125-msec band width by using a Cyto Pulse Sciences™ PA-4000 PulseAgile® electroporation system. This device consists of 4 \times 4 electrode array with 1.5-mm spacing to provide optimal coverage on the DNA injection site [20].

Two weeks after the last immunization, mice were either utilized for assessing the vaccine induced immune responses or challenged with *Sylvio* 10X/4 strain of *T. cruzi* (10,000 trypomastigotes/mouse, intraperitoneally). Sixty days' later, by the end of the acute phase of infection, mice were sacrificed, and blood was collected for serological evaluation, spleen was collected for lymphocyte activation assays, and heart and skeletal muscle were dissected and prepared for histological analyses.

2.5. Blood sample collection

Mice blood was obtained directly from heart at the time of sacrifice [21]. Blood samples were allowed to clot at 4 °C and serum was collected and stored at –20 °C.

2.6. Lymphocyte proliferation

Spleens were dissected out in sterile conditions, washed in ice-cold 1X PBS, and meshed using a 40 μ m Nylon Cell Strainer (Corning, USA). The cells were washed and suspended in 1.5 ml of PBS, gently laid over sterile-filtered Histopaque®-1077 (1.5 ml, density: 1.077 g/ml, Sigma-Aldrich, USA), and centrifuged at 2300 rpm for 30 min at room temperature. Splenocytes were carefully collected, washed twice with PBS, and resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich). Splenocytes (2×10^5 cells per well) were added to Nunc Maxisorp 96 well tissue culture plates (#M9410) and incubated for 48 h in presence or absence of *T. cruzi* trypomastigotes lysate (TcTL) [22] or recombinant TcG2 or TcG4 antigens (10 μ g/ml). Splenocytes incubated with phytohemagglutinin (PHA, Thermo Scientific) were used as positive control. The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) was used to measure the number of viable cells. Briefly, cells were incubated with MTS tetrazolium salt (10 μ l MTS/100 μ l), and its reduction to colored formazan product was recorded at 490 nm by using an EPOCH microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Stimulation index (StI) was defined as the ratio of the absorbance signal observed in the negative control (C) and in the stimulated cells (S) and calculated as follows:

$$\text{StI} = (S - C)/C$$

where S and C represents the absorbance values (OD) for stimulated (TcG2, TcG4, TcTL and PHA) and negative control cells (wells containing only splenocytes and RPMI-1640 medium), respectively.

A mice group (n = 6), treated with saline solution, was used to calculate the cutoff value and was represented as follow: mean StI of all negative control groups (saline, pcDNA3.1-IDE and pcDNA3.1-IM) \pm SD before and after challenge infection.

2.7. Serology

Sera samples were obtained two-weeks after the last immunization and 60 days post challenge infection, according to previous reports [10]. Briefly: Flat bottom, 96 well, Nunc Maxisorp plates were coated with either *T. cruzi* lysate or recombinant TcG2 or TcG4 proteins (500 ng/well/100 μ l) diluted in 0.05 M NaCO₃/NaHCO₃, pH 9.6 buffer. Protein concentration was standardized in an independent assay to choose the optimal concentration for the assay from 1, 2.5 and 5 ng/well/100 μ l. Plates were washed twice with PBS-0.05% Tween 20 (PBST), and blocked with (5% non-fat dry milk -PBST). Plates were washed again, and incubated at 37 °C for 2 h each with sera samples (1:50 dilution, 200 μ l/well) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a, or IgG2b antibodies (1:5000 dilution in PBST-3% non-fat dry milk (NFDMM)). All washing steps were carried out by using an ELx50™ strip washer (BioTech), and all antibodies were purchased from Bethyl Laboratories, Inc. Color was developed by incubation with 100- μ l/well Sure Blue TMB substrate (Kirkegaard & Perry Labs) at room temperature for 15 min, reaction was stopped with 2 N sulfuric acid, and change in color was monitored at 450 nm using an Epoch microplate reader. Serum from known positive (n = 6) and known negative (n = 6) mice, were used in the ELISA assay for positive and negative controls, respectively. The cut off value was established at the mean value + 2 SD of the negative controls. Positive controls were always above that value.

2.8. Parasitemia and mortality

Blood samples were collected beginning 7 days post-infection (pi), on alternated days, up to 50 days pi. Fresh blood smears were analyzed by light microscopy at 400 \times final magnification, and parasites were counted in all microscopic fields per slide [23]. Mortality was recorded daily and a survival rate analysis was conducted, results were analyzed statistically by Mantel-Cox test.

2.9. Histology

Six mice per group were sacrificed humanly under anesthesia on day 15 after last immunization and the remaining six mice were sacrificed at 60 days post challenge infection. Samples from skeletal muscle and heart were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin [24]. Serial sections of five μ m thicknesses were prepared from non-consecutive areas, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and at least five sections per tissue for each mouse were examined for the presence of acute inflammation and parasite nests (magnification: 400 \times and 100 \times).

2.10. Tissue parasitism and inflammation score

Tissue parasitism was evaluated by counting the amastigotes nests present in 100 microscopic fields in each of the analyzed organs. Likewise, inflammatory infiltrate was visualized in >200 microscopic fields of the tissue sections from heart and skeletal muscle, and scored using the following score system (ordinal method):

Histopathological scoring system key					
Parameters/Score	0	1	2	3	4
Focal lympho-plasmocytes	None (0%)	Rare (1–10%)	Slight (11–25%)	Moderate (26–50%)	Severe (≥ 51%)
Diffused lymphoplasmocytes	None (0%)	Slight (1–10%)	Moderate (11–40%)	Coalescing (41–80%)	Diffuse (≥ 80%)
Polymorphnuclear Leukocyte/lymphocyte	None (0%)	Rare (1–10%)	Slight (11–20%)	Moderate (21–30%)	Severe (≥ 31%)
Necrosis	None (0%)	Rare (1–5%)	Slight (6–10%)	Moderate (11–30%)	Severe (≥ 31–70%)
Amastigotes nests	None (0%)	Few (1–2)	Slight (3–5)	Moderate (6–10)	Severe (≥ 11)

Score criteria was based on previous studies [24,25]. Three pathologists blindly analyzed the samples, and final consensus results were recorded.

2.11. Statistical analysis

Female BALB/c mice of 6–8 weeks age were randomly distributed and divided into six groups (n = 12) for homogeneity of variances among each other [26]. Treatments were randomly assigned to the experimental units with six animals per treatment before challenge and six after challenge infection.

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparison test were used to assess differences between animal groups in quantitative data; meanwhile, Fisher's Exact test was used for qualitative and semi-quantitative data. All statistical analysis was processed using (SAS® University Edition Software) and GraphPad Prism 6 software.

3. Results

3.1. Effect of route of vaccine delivery on antigen-specific lymphocyte proliferation before and after challenge infection

We monitored the splenic cell response to TcG2, TcG4 and TcTL at two weeks after vaccination and 60 days after challenge infection. The TcVac1_IDE mice exhibited a significant increase in TcG2- and TcG4- specific splenic lymphocytes' proliferation that was not noted in mice given TcVac1 via IM route. This was

evidenced by TcG2-, TcG4- and TcTL-specific T cell proliferation in TcVac1_IDE vs. TcVac1_IM mice (1.32, 1.63, and 1.80 vs. 1.04, 1.13, and 1.47, respectively; $p < 0.0001$) (Table 1-A). All splenocytes, irrespective of the vaccination status, responded to PHA stimulation with a potent increase in T cell proliferation. Splenic cells harvested from control mice (n = 6) injected with empty vector exhibited no stimulation in response to *T. cruzi* antigens; thus, confirming the observed splenic response in vaccinated mice was antigen-specific.

After challenge infection, mice in all groups exhibited a significant level of *T. cruzi*-specific lymphocytes proliferation. Non-Statistically significant effects of TcVac1 (IDE vs. IM) on TcTL-specific lymphocytes' proliferation were observed in challenged mice (Table 1-B). The vaccine-induced TcG2- and TcG4-specific T cell proliferation increased by 3-fold post challenge infection, and was strongest in TcVac1_IDE mice ($p < 0.0001$). In comparison, TcVac1_IM mice exhibited similar level of antigen-specific lymphocyte response as was noted in challenged mice injected with pcDNA3 only. Together, these results suggest that IDE (vs. IM) delivery of TcVac1 elicits a stronger, antigen-specific lymphocytes' response in vaccinated and vaccinated/challenged mice.

3.2. Effect of route of vaccine delivery on antigen-specific antibody response ($\pm T. cruzi$)

Immunoglobulin G (IgG) and IgG subtypes (IgG1, IgG2a, IgG2b) titers were evaluated two-weeks after the last vaccine dose and

Table 1
Lymphocyte proliferation stimulation index assay for TcVac1 IDE- and IM-vaccinated mice before and after challenge infection.

A						
Stimulation antigens	Mice treated with (before <i>T. cruzi</i> challenge)				SE	P-value
	pcDNA3.1_IDE	TcVac1_IDE	pcDNA3.1_IM	TcVac1_IM		
TCG2	1.09	1.32 ^{***}	1.05	1.04	0.027	< 0.0001
TCG4	1.13	1.63 ^{***}	1.06	1.13	0.031	< 0.0001
TcTL	1.06	1.80 ^{***}	1.12	1.47	0.038	< 0.0001
PHA	4.77	4.77 ^{**}	3.48	3.54	0.162	< 0.0001
B						
Stimulation antigens	Mice treated with (after <i>T. cruzi</i> challenge)				SE	P-value
	pcDNA3.1_IDE	TcVac1_IDE	pcDNA3.1_IM	TcVac1_IM		
TCG2	1.69	3.21 ^{***}	1.85	2.09	0.139	< 0.0001
TCG4	1.53	3.70 ^{***}	1.97	2.39	0.199	< 0.0001
TcTL	1.57	2.01	1.84	1.85	0.175	< 0.0001
PHA	4.86 [*]	4.29 ^{**}	3.80	3.33	0.178	< 0.0001

Mice were given empty pcDNA3.1 plasmid, or TcVac1 vaccine by intradermal electroporation (IDE) or intramuscular (IM) injection (1-A). Two weeks after last vaccine dose, half number of mice in each group was challenged with *T. cruzi* (1-B). Splenocytes were incubated with recombinant TcG2 and TcG4 proteins, *T. cruzi* trypomastigotes lysate (TcTL), or phytohemagglutinin (PHA, T cell mitogen, assay positive control) for 72 h. The lymphocytes' proliferation was recorded and data are presented as mean stimulation index value and derived from at least triplicate observations per sample (n = 6 mice per group), fully described in Materials and Methods. Results were analyzed for significant differences by using one-way analysis of variance ANOVA and Tukey's multiple comparison test, and statistical differences are shown at a $p < 0.0001$. Data was tested for normal distribution using Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) and indicated that data was drawn from a population with a normal distribution ($P > 0.200$). ^{*}: Shows statistical differences between TcVac1-IDE or -IM vs pcDNA3.1-IDE or IM, respectively. ^{**}: Shows statistical differences between TcVac1-IDE vs TcVac1-IM. Samples were considered positive for values $\geq 1.14 \pm 0.10$, SE: Mean standard error.

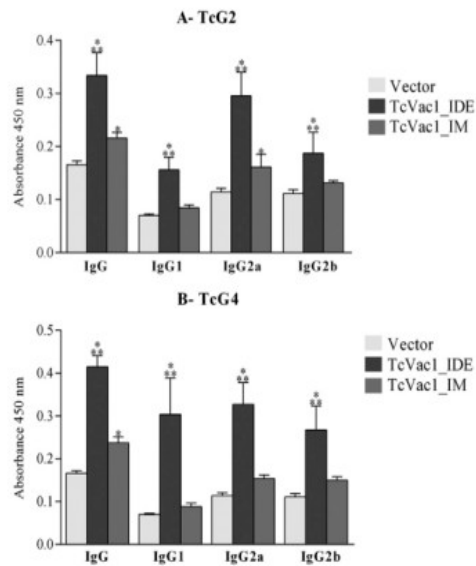


Fig. 1. Antigen-specific antibody response in mice vaccinated with TcVac1 via IDE or IM route. Mice were immunized as detailed in Material and Methods. *T. cruzi* specific IgG and subtypes (IgG1, IgG2a, IgG2b) were assessed by ELISA assay by using sera samples at 1:50 dilution. Data are presented as mean value \pm SD, and derived from triplicate observations by sample per mouse ($n = 6$ mice per group). Vector was expressed as mean value of pcDNA3.1-IDE and -IM data. Results were analyzed for significant differences by using one-way analysis of variance ANOVA and Tukey's multiple comparison test. * show statistical differences between TcVac1-IDE or -IM vs Vector for each IgG or IgG subtype at a $p < 0.05$. ** show statistical differences between TcVac1-IDE vs TcVac1-IM for each IgG or IgG subtype at a $p < 0.05$.

60 days post-challenge with *T. cruzi*. Vaccination with TcVac1, irrespective of delivery route, elicited an antigen-specific antibody response in mice (Fig. 1). A higher level of IgG as well as IgG subtype response to TcG2 (Fig. 1A) and TcG4 (Fig. 1B) antigens was observed in TcVac1_IDE (vs. TcVac1_IM) group ($p < 0.0001$). Mice vaccinated with TcVac1 by IDE route exhibited 35.3%, 45.8%, 45.6% and 29.7% increase in TcG2-specific and 42.9%, 71.0%, 53.0% and 43.9% increase in TcG4-specific IgG, IgG1, IgG2a and IgG2b response, respectively, when compared to that noted in mice vaccinated through IM route (Fig. 1A&B, all, $p < 0.05$). The TcG2-specific IgG2a/b response was dominant in TcVac1_IDE group. In comparison, IM delivery of TcVac1 elicited low levels of TcG2- and TcG4-specific IgG and IgG2a, and non-significant changes in the IgG2b and IgG1 levels when compared with vector controls (Fig. 1A&B). These results suggest that IDE delivery of TcVac1 elicits stronger, antigen-specific antibody response than was observed with IM delivery of the vaccine.

The antibody response monitored at 60 days post-challenge infection in vaccinated and control mice is presented in Fig. 2. All mice responded to challenge infection with a significant increment in anti-parasite antibody response. The levels of TcG2- and TcG4-specific total IgG and IgG subtypes (IgG1, IgG2a, IgG2b) were significantly higher in vaccinated/infected, vs. non-vaccinated/infected, mice (Fig. 2A&B; $p < 0.05$). The TcVac1_IDE/Tc mice exhibited 28.5%, 19.3%, 25.7% and 42.9% increase in TcG2-specific and 28.4%, 18.3%, 24.8% and 37.0% increase in TcG4-specific IgG, IgG1, IgG2a and IgG2b responses, respectively, when compared to that observed in TcVac1_IM/Tc mice (Fig. 2A&B). Likewise, *T. cruzi*-specific antibody response was detected in all mice post-

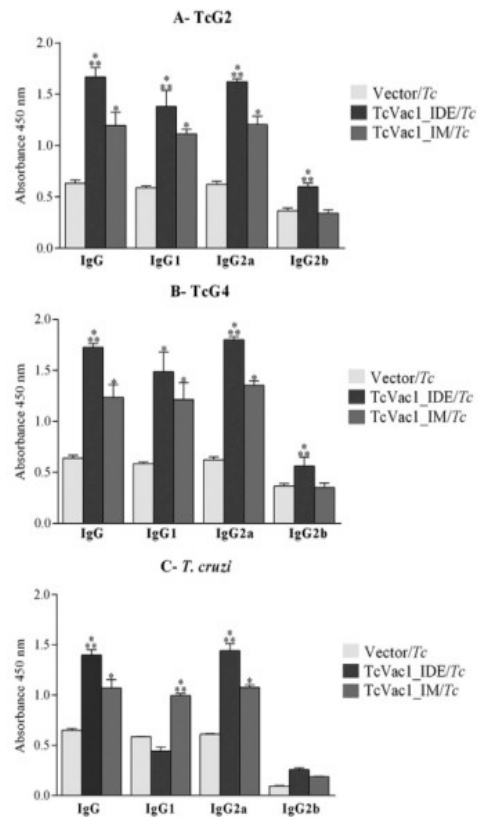


Fig. 2. Antigen-specific antibody response to challenge infection in mice vaccinated with TcVac1 via IDE or IM route. Mice were immunized and infected as detailed in Material and Methods. *T. cruzi* specific IgG and subtypes (IgG1, IgG2a, IgG2b) were assessed by an ELISA assay, using the sera samples at 1:50 dilution. Data were expressed as mean value \pm SD, and derived from triplicate observations by sample per mouse ($n = 6$ mice per group). Vector was expressed as mean value of pcDNA3.1-IDE and -IM data. Results were analyzed for significant differences by using one-way analysis of variance ANOVA and Tukey's multiple comparison test. * show statistical differences between TcVac1-IDE or -IM vs Vector for each IgG or IgG subtype at a $p < 0.05$. ** show statistical differences between TcVac1-IDE vs TcVac1-IM for each IgG or IgG subtype at a $p < 0.05$.

challenge infection. The maximal levels of parasite-specific IgGs and IgG subtypes were noted in TcVac1_IDE/Tc group, while mice in TcVac1_IM/Tc and pcDNA3/Tc groups exhibited significantly higher levels of IgG1 than was noted in TcVac1_IDE/Tc mice (Fig. 2C). Together, the results presented in Fig. 2, along with those presented in Fig. 1 suggest that TcVac1 delivery by IDE (vs. IM) route elicits a strong, antigen-specific and parasite-specific antibody response that significantly expanded upon challenge infection. In comparison, non-vaccinated mice responded to challenge infection with low antigen-specific antibody levels.

3.3. Parasitemia and mortality in vaccinated/infected mice

Challenge infection with SylvioX10 isolate of *T. cruzi* did not produce detectable blood parasitemia in any of the mice in vaccinated and non-vaccinated groups. Up to 33.3% (2 of 6) of mice injected with vector only (IM) succumbed to challenge infection during the 60 days of monitoring period. No mortality statistical difference ($P = 0.0870$) was observed among groups (Fig. 5).

3.4. Clinical and pathological (macroscopic and microscopic) abnormalities in vaccinated and non-vaccinated mice post-challenge infection

Immunization with TcVac1 produced no apparent presentation of physical, or clinical macroscopic abnormalities. All mice injected with pcDNA3.1 vector or TcVac1 by IDE or IM route exhibited no inflammatory, degenerative, necrotic or proliferative injuries, thus, suggesting that vaccine alone is non-toxic and safe to deliver. In response to challenge infection with *T. cruzi*, 60–70% of mice that were injected with empty vector only by IM or IDE route displayed low levels of physical activity and nest building behavior, decreased interaction with cage mates, hirsute bristling hair, and poor general appearance. In comparison, mice vaccinated with TcVac1 (IDE or IM route) had a healthy appearance with no observable abnormalities in socialization, physical activity, or food and water uptake. Macroscopic evaluation of the heart showed that control mice injected with vector only (IDE or IM route) developed bi-ventricular dilation (7 out of 10 mice) and epicardial hemorrhage (1 out of 10 mice) post challenge infection (Fig. 4). In comparison, mice immunized with TcVac1 (IDE or IM route) exhibited no morphological changes of the heart post-challenge infection.

Histological analysis of tissue sections was performed at sixty days post-challenge infection when mice exhibited the end of the acute infection phase. The histological evaluation of heart tissue from representative mice in each group is shown in Fig. 3. We noted mild, diffused inflammatory infiltrate, primarily constituted by mononuclear lymphocytes, in the atria and ventricles of mice that were injected with empty vector via IDE or IM route after challenge infection. In comparison, vaccinated/infected mice (TcVac1_IDE/Tc and TcVac1_IM/Tc) exhibited a potent increase in inflammatory infiltrate constituted of lymphocytes and polymorphonuclear leucocytes in the myocardium. The myocardial infiltration of inflammatory infiltrate was maximally noted in TcVac1_IDE/Tc mice. Likewise, cardiomyocytes necrosis was observed more frequently in TcVac1_IDE/Tc and TcVac1_IM/Tc mice, while mice from the control groups presented infrequent and moderate number of necrotic cells. The increase in myocardial inflammatory infiltrate was associated with a decline in tissue parasite burden in vaccinated mice. We observed the largest number of amastigotes nests in the atria and ventricles of mice in control groups. The amastigotes nests' counts were also significantly higher in the left and right ventricle walls of acutely infected mice in control groups than was observed in vaccinated mice. Overall, we observed 5–8 foci of pseudocysts/microscopic field (mf) in the cardiac tissue of mice in control groups and 0–2 foci of pseudocysts/mf in the heart tissue of vaccinated mice. Minimal tissue parasite burden was observed in TcVac1_IDE/Tc group.

Similar to the heart tissue, skeletal muscle of mice in control groups exhibited mild inflammation characterized by mononuclear inflammatory infiltrate (macrophages and lymphocytes) and moderate level of myocytes' necrosis. In comparison, vaccinated mice (TcVac1_IDE/Tc and TcVac1_IM/Tc) showed stark increase in skeletal muscle infiltration of inflammatory cells (polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes, and macrophages) and moderate level of muscle fibers' necrosis post challenge infection. Generally, skeletal muscle amastigotes nests were larger when compared to those detected in the myocardial tissue. The abundance of amastigotes nests in skeletal tissue of control groups was observed as follows: pcDNA3.1_IDE/Tc (4 foci of pseudocysts/mf); pcDNA3.1_IM/Tc (3 foci of pseudocysts/mf). In comparison, vaccinated mice showed a significantly lower number of parasitic pseudocysts ($p < 0.01$), and fewer amastigotes nests were observed in skeletal tissue of TcVac1_IDE/Tc mice (0–1 foci of pseudocysts/mf) than in the TcVac1_IM/Tc mice (2 foci of pseudocysts/mf). Further, parasitic nests

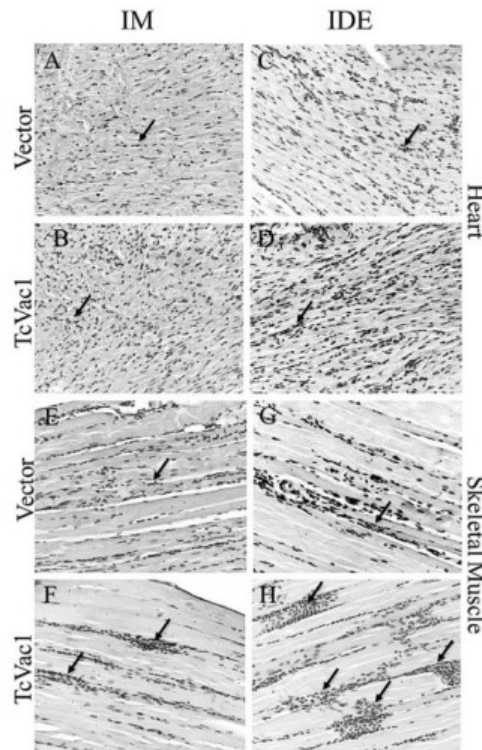


Fig. 3. Histological visualization of acute phase lymphocyte infiltration in TcVac1 vaccinated/infected mice. Mice were given empty pcDNA3.1 vector or TcVac1 via intramuscular (IM) injection or intradermal electroporation (IDE), challenged with *T. cruzi*, and harvested at 60 days post-infection. Shown are representative images of the heart and skeletal muscle sections stained with H&E (magnification 400 \times). Arrows show lymphocyte infiltration.

were frequently presented adjacent to the inflammatory infiltrate in the myocardial and skeletal tissue of the vaccinated/infected mice (Fig. 3 and Table 2). Together, these results suggest that the TcVac1 induced innate and adaptive immune cells responded to challenge infection with vigorous proliferation and tissue migration, and provided a significant control of tissue parasite burden. A higher degree of destruction of infected myocardial and skeletal myocyte cells was also noted in vaccinated, vs. non-vaccinated, mice post challenge infection.

4. Discussion

In this study, we compared intradermal electroporation approach and the conventional intramuscular administration technique to determine the differential efficiency of these two protocols for the administration of TcVac1 vaccine in a murine model. Candidate vaccines against Chagas disease have mainly been tested by intramuscular immunization route. Several investigators have reported that permeabilizing the target cells through electroporation (EP) led to enhanced uptake of naked recombinant plasmid and a superior expression of the gene of interest, and thereby an improved immunization efficacy [12–14,16,17,20,27–29]. Other

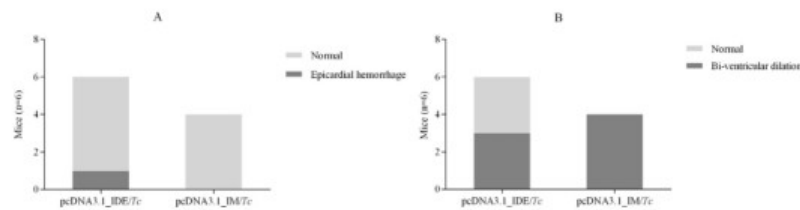


Fig. 4. Macroscopic evaluation of the heart for control mice (non-vaccinated) groups. Mice were vaccinated via IDE (n = 6) or IM (n = 4) with pcDNA3.1 empty plasmid and evaluated after challenge infection, and postmortem macroscopic examination was established for the identification of heart abnormalities (epicardial hemorrhage and bi-ventricular dilation). Data were recorded as case incidence of the heart abnormality for each mouse and recorded in a contingency table. Data were analyzed for statistical differences using Chi-square test. (A) Shows the incidence of mice with epicardial hemorrhage for each control mice groups (P = 0.389). (B) shows the incidence of mice with bi-ventricular dilation for each control mice groups (P = 0.091). pcDNA3.1_IDE/Tc: Control mice group vaccinated with empty plasmid via intradermal electroporation. pcDNA3.1_IM/Tc: Control mice group vaccinated with empty plasmid via intramuscular injection.

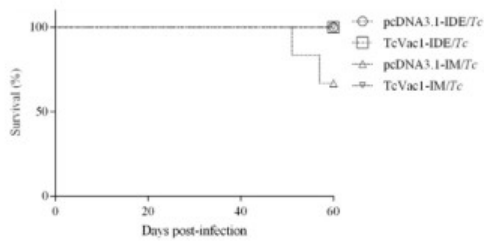


Fig. 5. Survival percentage of mice groups after *T. cruzi* infection. Mice were monitored for 60 days for any sign of disease and survival. Survival data were analyzed statistically through Mantel-Cox test, survival curves did not show any significant differences (P = 0.0870).

authors have shown that electroporation, after intradermal or intramuscular injection of DNA vaccines provide an efficient system to activate antigen presenting cells (APCs), mainly dendritic cells, since they are directly transfected at the site of DNA administration. The expressed antigen is presented in association of the major histocompatibility complex (MHC) class I molecules [20]. This can subsequently stimulate the synthesis of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in conjunction with T-helper cells. Skin tissues, especially epidermis and dermis, are crowded with various types of APCs including dendritic cells, in contrast with the muscle tissue. Moreover, intradermal vaccine route specifically targets

dermal DCs and macrophages that, when activated, will carry vaccine components to draining lymph by passive diffusion or cell transport of antigens. Afterwards, presentation of the antigens to immature CD4⁺ and CD8⁺ T cells, leads to their activation, as well as, the activation of specific B cells within the germinal center. Finally, the generation of a pool of specific memory T and B cells in the secondary lymphoid organs (draining lymph nodes and bone marrow) and in the periphery (skin and mucosa) is also noted by IDE delivery of candidate antigens [30]. Other studies compared the effect of plasmid vaccination via intradermal (ID) only vs intradermal followed by electroporation (EP), they proved that EP + ID showed better and higher antibody responses than ID only [31]. Therefore, we hypothesized that intradermal electroporation would enhance the effectiveness of the DNA based vaccine against Chagas disease.

It is important to note that both types of immune responses, humoral and cellular, are necessary to control the infection. This is evidenced by the findings that mice deficient in CD8⁺ T cell and/or B cell function were susceptible to *T. cruzi* infection and exhibited high parasitemia and mortality [32]. Thus, a candidate vaccine capable of eliciting both B and T cell responses and Th1 cytokines is considered to offer the best protection from *T. cruzi* infection. Our group has identified two vaccine candidates, named TcG2 and TcG4, that when co-delivered as DNA-prime/DNA-boost vaccine (TcVac1), elicited protective immunity and resistance against *T. cruzi* infection in mice and dogs [5,10,11]. Along the use of parasite antigens, plasmid DNA GM-CSF adjuvant use

Table 2
Histo-pathological abnormalities during the acute phase of *T. cruzi* infection and disease development (day 60 post-infection) in mice vaccinated with TcVac1.

Parameters	IDE/Tc		IM/Tc	
	pcDNA3.1	TcVac1	pcDNA3.1	TcVac1
Myocardial Tissue				
Focal lympho-plasmocytes	1.8	3.2 [*]	1.5	2.2
Diffused lympho-plasmocytes	2.5	2.3	2.2	2
Polymorphnuclear Leukocyte/lymphocyte	1	2.8 [*]	0.8	1.8 [*]
Necrosis	1.2	2.5 [*]	1	2.2 [*]
Amastigotes nests	2.5 [*]	1	2.3 [*]	1.2
Skeletal Muscle				
Focal lympho-plasmocytes	1	2.2 [*]	0.8	1.8 [*]
Diffused lympho-plasmocytes	1.3	2.8 [*]	1.2	1.8
Polymorphnuclear Leukocyte/lymphocyte	0.8	2.8 [*]	0.7	2 [*]
Necrosis	1.5	2.5 [*]	1.7	2.2
Amastigotes nests	2 [*]	0.8	2.3 [*]	1.3

Mice were injected with empty pcDNA3.1 plasmid, or TcVac1 via intradermal electroporation (IDE) or intramuscular (IM) route and challenged with *T. cruzi* (Tc) as described in Materials and Methods. Tissue sections were examined for inflammatory infiltrate, necrosis, and parasite nests as described by Barbabosa-Pliego and Slauson [24,45]. Semi-quantitative scoring of histopathological lesions is presented and explained in material and methods section. Data represents the average score of the evaluation of 100 microscopic fields/treatment/tissue and were analyzed for statistical differences using as mean score of mice per group (n = 6). ^{*} indicates statistical differences of vaccinated groups (TcVac1-IDE or -IM) vs control groups (pcDNA3.1-IDE or IM) respectively.

enhances the antigen-presenting capability of dendritic cells and facilitates B- and T-cell-mediated immunity and plasmid DNA IL-12 is a key cytokine involved in CD8⁺-T-cell activation and proliferation reported to enhance antiparasitic effects of vaccines [33]. However, when these adjuvant plasmids were tested without parasite specific antigens to prevent *T. cruzi* infection in mice they did not show any specific-antibody responses [10,34,35]. Therefore, the anti-*T. cruzi* specific immune response observed in the present report can be assumed to rely on the TcG2 and TcG4 parasite antigens used in the candidate vaccine. The immune activation provided by the GM-CSF and IL-12 plasmids were not analyzed in the present report.

In order to determine if vaccination via IDE or IM route elicited similar (or different) levels of cellular immune responses, we evaluated the lymphocyte proliferation reaction post immunization and challenge infection. While both IDE and IM modes of vaccine delivery elicited antigen-specific lymphocytes' proliferation (TcG4 > TcG2), the extent of antigen-specific lymphocytes' proliferation was higher in the TcVac1_IDE than in TcVac1_IM group ($p < 0.0001$). Importantly, the vaccine induced T cells exhibited a better expansion and rapid effector function in controlling the tissue parasite burden in mice immunized via the IDE route. A better protection from challenge infection was associated with increased frequency of TcG2- and TcG4-specific lymphocytes' proliferation in TcVac1_IDE vs. TcVac1_IM group. Our data allow us to surmise that IDE delivery of TcVac1 enhances the generation of antigen-specific memory T cells that are capable of responding to pathogen exposure, and thus provided a better vaccine efficiency.

Our finding of higher levels of humoral response post-immunization and post-challenge infection also favored IDE over IM vaccination system (Fig. 1). The TcVac1_IDE mice exhibited higher levels of the TcG2- and TcG4-specific IgG2a/b response post-vaccination a significant increase in antigen- and parasite-specific IgG2a/b and IgG1 levels post-challenge infection. Both IgG1 and IgG2 antibody subtypes are proposed to be involved in the elimination of blood forms of parasites and in a reduction of animal mortality rate during the acute phase of infection [36]. The IgG2a/b generally constitute prevalent immune response against carbohydrate/polysaccharide antigens, and IgG1s are predominantly considered to recognize proteins and polypeptide antigens bound to the Fc receptor of phagocytic cells and participate in activation of the complement cascade via binding to C1 complex. Whether the TcG2 and TcG4 antigens are post-transnationally modified, or whether the IDE delivery of TcVac1 enhances the post-translational modification of TcG2 and TcG4 leading to increase in IgG2a/b response is not known. However, our data suggest that IDE route of TcVac1 delivery is more effective in eliciting a predominant IgG2a/b response over IgG1 for both pre- and post-infection phases, suggesting a skewed Th1 immune profile in experimental mice.

Studies conducted in canine, bovine, primates and humans, indicated that IM vaccination with naked DNA yields low expression level of the recombinant antigen, which in turn induces a sub-optimal immune response. This is explained by the fact that muscle tissue is not an efficient site for antigen presentation, because of a lack of appropriate quantities of DCs, macrophages and lymphocytes. Therefore, larger amounts of DNA vaccine dose delivery by IM route was required to establish a strong immune response in mice and larger species (e.g. dogs, pigs, humans). Comparatively, IDE delivery of the DNA vaccine requires smaller amounts of the plasmid DNA to achieve strong immune responses, and thus offers significant savings in time, cost and effort for vaccine production and delivery [11,37–39]. Thus, IDE delivery of naked plasmids could favorably compete with other vaccine protocols that include efficient antigen expression vectors, such as *Adenovirus* or *Salmonella* [40,41].

Blood parasitemia was not detected during the acute experimental phase in any mice from any group, which indicates that the strain *Sylvio* X10/4 of *T. cruzi* has a strong tissue tropism. This strain behavior was previously reported by Marinho et al., 2004, who described the absence of a patent acute phase as well as parasitemia in the weeks following the infection, when using *Sylvio* X10/4 *T. cruzi* parasite stain, with various mouse strains [42]. Additionally, they reported the presence of parasite nests, which were totally ignored by the immune system in mice myocardial tissue. In the present study also, we observed mild, diffused tissue infiltration of inflammatory infiltrate that was not localized close to parasites nests in non-vaccinated/infected animals. In contrast, tissue inflammatory infiltrate was strongly associated with the parasite nests, and contributed to control of size and number of tissue parasite nests in the vaccinated (TcVac1_IM/Tc and TcVac1_IDE/Tc) mice. Thus, vaccinated/challenged mice exhibited an ability to control the parasite-mediated tissue destruction that was apparent by the macroscopic and microscopic observation of apparently healthier tissue.

The major pathological manifestations for chagasic cardiomyopathy in mice are cardiomegaly with hypertrophy of cardiac tissue, dilation of the heart chambers and aneurism mostly in the left ventricle associated with strong inflammation, necrotic cardiomyocytes and fibrosis [7]. The IDE vaccination protocol altered the histopathological developments in the myocardium of acutely infected mice through induction of focal, parasite-specific inflammation; moreover, vaccinated mice produced more antibodies and displayed a stronger cellular immune response, which were capable of reducing the number of amastigotes nests in mice heart tissue (Table 2). However, our observations of cardiomyocytes necrosis in TcVac1_IDE/Tc mice (Fig. 3) suggest that inflammatory responses, if persistent, can also be injurious to the host. This interpretation is consistent with studies in IL-4 deficient mice, which were able to develop a strong Th1 type immune response and control acute parasitic burden but also developed exacerbated inflammation in the myocardial tissue [43]. Future studies will be required to determine if TcVac1_IDE induced inflammatory responses subside with control of parasite and do not constitute a risk factor in causing consistent, long-term tissue damage in the host. Indeed, mice vaccinated with TcG2 and TcG4 antigens by DNA-prime/protein boost approach exhibited a predominance of type 1 inflammatory response capable of controlling circulating and tissue parasites in acute phase, and then switched to immunomodulatory, tissue-healing type 2 response thus providing protection to the heart [44]. Thus, we believe that IDE would offer an enhanced protective efficacy of TcVac1 against acute infection and chronic Chagas disease.

5. Conclusion

Both protocols of TcVac1 vaccination (IDE and IM), protected against an acute *T. cruzi* infection, enhanced survival rate, milder macroscopic heart pathologies and decreased tissue (heart and skeletal muscle) parasite burden than was noted in non-vaccinated/infected mice. The IDE delivery offered a more efficient vaccination system than the IM route. This was evidenced by induction of higher levels of antigen-specific, Th1 type cellular and humoral immune responses that expanded in response to challenge infection and provided a stronger infiltration of inflammatory cells capable of controlling the parasite nests in the heart and skeletal tissues in mice vaccinated with TcVac1 by IDE route than that observed in mice vaccinated via IM route. We conclude that IDE delivery enhances protective efficacy of TcVac1 vaccine in mice.

Acknowledgements

The authors thank the Universidad Autónoma de Estado de México (Grant No. 3326/2012C) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 156701) for the financial support awarded to this project. M.Sc. Wael Hegazy Hassan Moustafa would like to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Scholarship No. 518232/291117) for the scholarship awarded for postgraduate studies at the Universidad Autónoma del Estado de México.

Author contributions

JVCV and WHHM conceived and designed the experiments; WHHM performed the experiments; JAZE, LOG, ETB, JEAB, BRS and NJG substantially contributed to conception and design and acquisition of data; NJG contributed to vaccine design and production. JVCV, ETB, HAD, BRS, JMECO and ROP contributed reagents/materials/analysis tools; ROP, JEAB, ABP and WHHM performed anatomopathological and histopathological analysis; WHHM, JVCV, and NJG prepared the paper; All authors read and approved the manuscript to be published.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909;1:159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02751909000200008>.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop 2010;115:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>.
- Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Tropical disease research: progress 1991–92: eleventh programme report of the UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: World Health Organization; 1993.
- Hotez PJ, Ferris MT. The antipoverty vaccines. Vaccine 2006;24:5787–99. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.008>.
- Bhatia V, Sinha M, Luxon B, Garg N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. Infect Immun 2004;72:6245–54. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6245-6254.2004>.
- Cazorla SI, Frank FM, Malchiodi EL. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. Expert Rev Vaccines 2009;8:921–35. <https://doi.org/10.1586/erv.09.45>.
- Garg N, Bhatia V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. Expert Rev Vaccines 2005;4:867–80. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.6.867>.
- Lúcia Pereira-Chioccolá V, Costa F, Ribeiro M, Soares IS, Arena F, Schenkman S, et al. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. Parasite Immunol 1999;21:103–10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00201.x>.
- Ribeiro M, Lúcia V, Ferguson P-C, Rênia L, Fragata Filho AA, Schenkman S, et al. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. Parasite Immunol 2000;22:49–53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00260.x>.
- Bhatia V, Garg NJ. Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. Clin Vaccine Immunol 2008;15:1158–64. <https://doi.org/10.1128/CVI.00144-08>.
- Aparicio-Burgos JE, Ochoa-García L, Zepeda-Escobar JA, Gupta S, Dhiman M, Martínez JS, et al. Testing the efficacy of a multi-component DNA-prime/DNA-boost vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. PLoS Negl Trop Dis 2011;5:e1050. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001050>.
- Bolhassani A, Rafati S. Non-viral delivery systems in gene therapy and vaccine development. Non-Viral Gene Ther Intech 2011. <https://doi.org/10.5772/18021>.
- Faurie C, Golzio M, Phez E, Teissié J, Rols M-P. Electric field-induced cell membrane permeabilization and gene transfer: theory and experiments. Eng Life Sci 2005;5:179–86. <https://doi.org/10.1002/elsc.200420098>.
- Monie A, Tsen S-WD, Hung C-F, Wu T-C. Therapeutic HPV DNA vaccines. Expert Rev Vaccines 2009;8:1221–35. <https://doi.org/10.1586/erv.09.76>.
- Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? Nat Rev Genet 2008;9:776–88. <https://doi.org/10.1038/nrg2432>.
- Best SR, Peng S, Juang C-M, Hung C-F, Hannaman D, Saunders JR, et al. Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8+ T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery. Vaccine 2009;27:5450–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.005>.
- Daemi A, Bolhassani A, Rafati S, Zahedifard F, Hosseinzadeh S, Doustdari F. Different domains of glycoprotein 96 influence HPV16 E7 DNA vaccine potency via electroporation mediated delivery in tumor mice model. Immunol Lett 2012;148:117–25. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.10.003>.
- Norma Ochoa L. Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norm-062-Zoo 1999:1–58.
- Manning-Cela R, Cortés A, González-Rey E, Van Voorhis WC, Swindle J, González A. LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun 2001;69:3916–23. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3916-3923.2001>.
- Lin F, Shen X, Kichaev G, Mendoza JM, Yang M, Armendi P, et al. Optimization of electroporation-enhanced intradermal delivery of DNA vaccine using a minimally invasive surface device. Hum Gene Ther Methods 2012;23:157–68. <https://doi.org/10.1089/hgrb.2011.209>.
- Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. J Pharmacol Pharmacother 2010;1:87. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.72350>.
- Gupta S, Garg NJ. Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in mice. PLoS Negl Trop Dis 2010;4:9–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000797>.
- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1962;4:389–96.
- Barbadosa-Pliego Alberto, Díaz-Albiter Hector M, Ochoa-García Laucel, Aparicio-Burgos Esteban, López-Heydeck Sandra M, Velásquez-Ordoñez Valente, et al. *Trypanosoma cruzi* circulating in the southern region of the state of Mexico (Zumpahuacán) are pathogenic: a dog model. Am J Trop Med Hyg 2009;81:390–5.
- Gilson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for valid histopathologic scoring in research. Vet Pathol 2013;50:1007–15. <https://doi.org/10.1177/0300985813485069>.
- Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. McGraw-Hill; 1997.
- Bråve A, Nyström S, Roos A-K, Applequist SE. Plasmid DNA vaccination using skin electroporation promotes poly-functional CD4 T-cell responses. Immunol Cell Biol 2011;89:492–6. <https://doi.org/10.1038/icc.2010.109>.
- Zhou Y, Fang F, Chen J, Wang H, Chang H, Yang Z, et al. Electroporation at low voltages enables DNA vaccine to provide protection against a lethal H5N1 avian influenza virus challenge in mice. Intervirology 2008;51:241–6. <https://doi.org/10.1159/000156483>.
- Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, et al. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. J Immunol 2000;164:4635–40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4635>.
- Combadiere B, Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. Hum Vaccin 2011;7:811–27. <https://doi.org/10.4161/hv.7.8.16274>.
- Hirao LA, Wu L, Khan AS, Satischchandan A, Draghia-Akli R, Weiner DB. Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. Vaccine 2008;26:440–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.041>.
- Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol 1998;20:207–16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00154.x>.
- Garg N, Tarleton RL. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun 2002;70:5547–55. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5547-5555.2002>.
- Gupta S, Garg NJ. TcVac3 induced control of *Trypanosoma cruzi* infection and chronic myocarditis in mice. PLoS One 2013;8:e59434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059434>.
- Gupta S, Garg NJ. A two-component DNA-prime/protein-boost vaccination strategy for eliciting long-term, protective T cell immunity against *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog 2015;11:e1004828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004828>.
- Brodskyn C, Silva A, Takehara H, Mota I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Immunol Cell Biol 1989;67:343–8. <https://doi.org/10.1038/icc.1989.50>.
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, et al. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. Proc Natl Acad Sci 1994;91:9519–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9519>.
- Mumper RJ, Ledebur HC. Dendritic cell delivery of plasmid DNA: applications for controlled genetic immunization. Mol Biotechnol 2001;19:079–96. <https://doi.org/10.1385/MB:19-1-079>.
- Liu MA, Ulmer JB. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. Adv Genet 2005;55:25–40. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)5002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)5002-8).
- Cazorla SI, Becker PD, Frank FM, Ebensen T, Sartori MJ, Corral RS, et al. Oral vaccination with salmonella enterica as a cruzipain-DNA delivery system confers protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun 2008;76:324–33. <https://doi.org/10.1128/IAI.01163-07>.

- [41] Miyahira Y, Takashima Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Takeuchi T, Ohyanagi-Hara M, et al. Immune responses against a single CD8⁺-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2005;73:7356–65. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7356-7365.2005>.
- [42] Marinho CRF, Bucci DZ, Dagli MLZ, Bastos KRB, Grisotto MG, Sardinha LR, et al. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of chagas' disease. *Infect Immun* 2004;72:2350–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2350-2357.2004>.
- [43] Soares MBP, Pontes-De-carvalho L, Ribeiro-Dos-santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Da Acad Bras Ciências* 2001;73:547–59. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652001000400008>.
- [44] Aparicio-Burgos JE, Zepeda-Escobar JA, de Oca-Jimenez RM, Estrada-Franco JC, Barbabosa-Pliego A, Ochoa-García L, et al. Immune protection against *Trypanosoma cruzi* induced by TcVac4 in a canine model. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003625. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003625>.
- [45] Slauson DO, Cooper BJ. Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology. 3rd ed. St. Louis, Mo. [u.A.]: Mosby; 2002.

Capítulo dos:

• [Veterinary Sciences] Manuscript ID: vetsci-555206 - Submission Received

Yahoo/Inbox ★



• **Editorial Office** <vetsci@mdpi.com>



Jul 4 at 8:24 PM ★

To: Juan Carlos Vázquez Chagoyán

Cc: Wael Hegazy-Hassan, Esvieta Tenorio-borroto, Alberto Barbabosa-Pliego, Juan Carlos Vázquez-Chagoyán

Dear Dr. Vázquez Chagoyán,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Veterinary Sciences

Manuscript ID: vetsci-555206

Type of manuscript: Article

Title: Anti-T. cruzi TcVac1 vaccine candidate: dose standardization for intradermal electroporation protocol

Authors: Wael Hegazy-Hassan, Esvieta Tenorio-borroto, Alberto Barbabosa-Pliego, Juan Carlos Vázquez-Chagoyán *

Received: 5 July 2019

E-mails: hegazi_wael@yahoo.com, esvieta@gmail.com, abarbabosa@yahoo.com.mx, jcvch@yahoo.com

Submitted to section: Microbiology and Immunology,

https://www.mdpi.com/journal/vetsci/sections/Microbiology_Immunology.

:om...

manuscript at the following link (login

MDPI Journals A-Z Information & Guidelines Initiatives About jcvch@yahoo.com My Profile Logout

~ User Menu

- Home
- Manage E-Mail Alerts
- Manage E-Mail Newsletters
- Manage Saved Searches
- Change Password
- Edit Profile
- Logout

~ Submissions Menu

- Submit Manuscript
- Display Submitted Manuscripts
- English Editing
- Discount Vouchers
- Invoices
- LaTeX Word Count
- Help

~ Reviewers Menu

- Volunteer Preferences

Manuscript ID: **vetsci-555206**

Status: Pending review

Article type: Article

Title: Anti-T. cruzi TcVac1 vaccine candidate: dose standardization for intradermal electroporation protocol

Journal: *Veterinary Sciences*

Section: *Microbiology and Immunology*

Abstract: Trypanosoma cruzi is the cause of a devastating parasitic infection in Latin America (Chagas disease). We previously tested the TcVac1 vaccine efficacy using an intradermal injection followed by electroporation, favorable and encouraging results were obtained. Herein, we tested four different doses (1, 5, 10, and 20 µg) of the vaccine to determine the optimum dose to be used to prevent T. cruzi infection with the intradermal injection and electroporation approach. Thirty female mice, CD1 strain, subdivided in 5 different treatments (n=6/group) were used for this purpose. After vaccination and challenge infection with MHOM/MX/1994/Ninoa strain of T. cruzi (500 trypomastigotes/mouse, intraperitoneally) parameters such as parasitemia, survival test, serology test (ELISA) and histopathological analyses were used to evaluate the vaccine protection efficacy. Results demonstrated that the group vaccinated with 10 µg of plasmid DNA dose induced the best immunoglobulin levels, the lowest parasitemia and the highest parasite nest control in cardiomyocytes and skeletal muscle tissues. It was confirmed that the use of electroporation is an effective method for DNA vaccine delivery, since it enhances the immunogenicity of the delivered plasmid, and reduces vaccine preparation time and cost, vaccine dose is minimized, the number of vaccine boosts reduced to a single application and vaccine does not require the use of adjuvants.

Keywords: Trypanosoma cruzi; TcVac1; Electroporation; Chagas Disease; Mice model, dose standardization

Manuscript File: [manuscript.docx](#)

You can put your paper online **immediately and before peer review** at [Preprints.org](https://preprints.org), with the following benefits:

1 **Anti-*T. cruzi* TeVac1 vaccine candidate: dose standardization for intradermal**
2 **electroporation protocol**

3

4 Wael Hegazy-Hassan¹, J. M. Eloy Contreras-Ortiz¹, S. Gabriel Martínez-Arzate¹, Esvieta
5 Tenorio-borroto¹, Alberto Barbabosa-Pliego¹, Nisha J. Garg^{2,3}, Juan Carlos Vázquez-
6 Chagoyán^{1*}

7

8 ¹ Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina
9 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 5.5 Carretera
10 Panamericana Toluca-Atlaquilco, Toluca, Estado de México, C.P. 50200, México.

11

12 ² Departments of Microbiology & Immunology, University of Texas Medical Branch,
13 301 University Boulevard, Galveston, TX 77555-1070, United States.

14

15 ³ Departments of Pathology, University of Texas Medical Branch, 301 University
16 Boulevard, Galveston, TX 77555-1070, United States.

17

18 hegazi_wael@yahoo.com, Cema_coco12@yahoo.com, gabosaeta@hotmail.com
19 esvieta@gmail.com, abarbabosa@yahoo.com.mx, nigarg@utmb.edu,
20 jcvch@yahoo.com*.

21

22 *Corresponding author:

23 PhD. Juan Carlos Vázquez Chagoyán.

24 Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina
25 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 5.5 Carretera
26 Panamericana Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México, C.P. 50200, México.
27 Email: jcvch@yahoo.com.

28

29 **Abstract**

30 *Trypanosoma cruzi* is the cause of a devastating parasitic infection in Latin America
31 (Chagas disease). We previously tested the TcVac1 vaccine efficacy using an intradermal
32 injection followed by electroporation, favorable results were obtained. Herein, we tested
33 five different doses (1, 5, 10, 15 and 20ug) of the vaccine to determine the optimum dose
34 to be used to prevent *T. cruzi* infection with the intra-dermal injection and electroporation
35 approach. Forty-two female mice, CD1 strain, subdivided in 7 different treatments
36 (n=6/group) were used for this purpose. After vaccination and challenge infection with
37 MHOM/MX/1994/Ninoa strain of *T. cruzi* (500 trypomastigotes/mouse,
38 intraperitoneally) parameters such as parasitemia, survival test, serology test (ELISA) and
39 histopathological analyses were used to evaluate the vaccine protection efficacy. Results
40 demonstrated that the group vaccinated with 10 µg of plasmid DNA dose induced the best
41 immunoglobulin levels, the lowest parasitemia and the highest parasite nest control in
42 cardiomyocytes and skeletal muscle tissues. It was confirmed that the use of
43 electroporation is an effective method for DNA vaccine delivery, since it enhances the
44 immunogenicity of the delivered plasmid, and reduces vaccine preparation time and cost,
45 vaccine dose is minimized, the number of vaccine boosts reduced to a single application
46 and vaccine does not require the use of adjuvants.

47

48 **Keywords**

49 *Trypanosoma cruzi*; TcVac1; Electroporation; Chagas Disease; Mice model.

50

51 **1. Introduction**

52 *Trypanosoma cruzi* is the causing agents for one of the most important neglected
53 tropical disease in 21 endemic Latin American countries [1]. Vaccination strategies
54 against *T. cruzi* have implemented the use of Protein or DNA based recombinant antigens
55 as cruzipain, trans-sialidase, amastigote surface protein, paraflagellar rod protein, among
56 others [2]. TcVac vaccine series was previously tested in mice and dogs [3–7] and elicited
57 protective specific-immunity and resistance against *T. cruzi* infection. In an earlier report
58 our group demonstrated that intradermal electroporation delivery enhanced TcVac1
59 vaccine efficiency, as compared with intramuscular immunization method, where the
60 electroporation system proved to be a simple, un-expensive and efficient method for
61 immunization with DNA based vaccines against *T. cruzi* infection [8], supporting reports
62 of vaccines against H1N1 virus [9], HPV [10] and H5N1 virus [11].

63 Herein, we report dose standardization for M-TcVac1 vaccine and evaluated dose-
64 dependent intradermal electroporation for immunization protection against an acute phase
65 experimental infection of *T. cruzi* in a murine model.

66

67 **2. Material and Methods**

68 *2.1. Ethical statement*

69 All experimental protocols were conducted under the technical specifications for the
70 production, care and use of laboratory animals of the official Mexican standards (NOM-
71 62-ZOO-1999) [12]. All protocols were approved by the Laboratory Animal Care

72 Committee (CICUAL-DISP) from the School of Veterinary Medicine and Zootechnics
73 of the Autonomous University of the State of Mexico (UAEM, Toluca, Mexico).

74

75 2.2. Mice and parasites

76 CD1 female mice (6 to 8 weeks old, n=42) were purchased from CINVESTAV, IPN,
77 Mexico and kept at the facility of “Centro de investigación y estudios avanzados en salud
78 animal” (CIESA-FMVZ-UAEM, Toluca, Mexico). Animals had a balanced diet and ad-
79 libitum access to water and were observed daily throughout the experimental period
80 looking for clinical abnormalities. *T. cruzi* (MHOM/MX/1994/Ninoa strain)
81 trypomastigotes were propagated in Vero monolayer cell culture, kept in DMEM medium
82 supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% penicillin-
83 streptomycin and cultured under controlled conditions (37°C, 5% CO₂, with saturated
84 humidity) [13]. All media components were purchased from Gibco Laboratories, USA.

85

86 2.3. Modified *TcVac1* vaccine

87 The cDNAs encoding for TcG2 and TcG4 (*Sylvio* X10/4 isolate, GenBank: AY727915
88 and AY727917, respectively) have been previously described [14,15]. All plasmids were
89 transformed into *E. coli* DH5- α competent cells, grown in LB-broth containing 100-
90 mg/ml ampicillin, and purified using the GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher
91 Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) according to manufacturer’s
92 specifications. Each mouse received a single immunization from one of four different
93 dosages (1-, 5-, 10-, and 20- μ g of each plasmid) in a single application without adjuvants
94 (IL-12, GM-CSF), in 50 μ l final volume per mouse, via intradermal-electroporation
95 delivery.

96

97 2.4. *Immunization and challenge infection*

98 Mice (N=60) were randomly distributed into five treatment groups (n=12 per group)
99 as follows: I, Empty pCDNA3.1 ± *T. cruzi* (control); II, 1µg* ± *T. cruzi*; III, 5µg* ± *T.*
100 *cruzi*; IV, 10µg* ± *T. cruzi* infection; and V, 20µg* ± *T. cruzi*. (* modified TcVac1
101 vaccine). All animals were intradermally electroporated (IE) as previously described [8],
102 briefly: mice were sedated (ketamine/xylazine, 0.1 ml/20g mouse wt. IP injected), hair
103 from the lower dorsal region, just above the tail base was shaved, and M-TcVac1 DNA
104 vaccine delivered by intradermal injection. Immediately after, electroporation was carried
105 out at the site of vaccine injection with five pulses at 450V/cm², 0.050-msec pulse interval
106 and 0.125-msec bandwidth by using a Cyto Pulse Science™ (PA-4000 PulseAgile®
107 electroporation system), equipped with 4 x 4 electrode array with 1.5-mm spacing among
108 them.

109 Mice were either utilized for assessing the vaccine-induced immune responses (15
110 and 30 days post vaccination) (n=6/group) or challenged with MHOM/MX/1994/Ninoa
111 strain of *T. cruzi* (500 trypomastigotes/mouse, intraperitoneally) (n=6/group). Thirty
112 days' later, when the peak of the acute phase of infection occurs, mice were sacrificed,
113 and blood was collected for serological evaluation, heart and skeletal muscle were
114 dissected and prepared for histological analyses.

115

116 2.5. *Blood sample collection*

117 Mice blood was obtained by retro-orbital bleeding technique during the experiment
118 or directly from the heart at the time of sacrifice [16]. Blood samples were allowed to clot
119 at 4°C, serum was separated, and all serum samples were stored at -20°C.

120

121 2.6. *Parasitemia*

122 Parasitemia was evaluated for each mouse through a fresh blood smear on days 5, 10,
123 15, 20 and 30 post-infection. The evaluation was performed according to Brener (1962),
124 briefly: blood (5 μ l) was collected, placed on a glass slide, covered with a coverslip (18
125 \times 18 mm) and observed under light microscopy at magnification 400X. Parasites in 100
126 fields were counted, and the number of parasites/ μ l was estimated with standard protocols
127 [18,19].

128

129 2.7. Survival rate

130 Animals were monitored daily for the post-infection experimental period (30 days)
131 and clinical signs and deaths recorded for each group.

132

133 2.8. Serology

134 Sera samples were obtained two- and four-weeks after immunization and 30 days
135 post challenge infection. Flat bottom, 96 well, Nunc Maxisorp plates were coated with
136 either *T. cruzi* lysate (5×10^5 parasite equivalent/well) or recombinant TcG2 or TcG4
137 proteins (500 ng/well/100 μ l) diluted in 0.05 M NaCO₃/NaHCO₃, pH 9.6 buffer. Plates
138 were washed twice with PBS-0.05% Tween 20 (PBST) and blocked with (5% non-fat dry
139 milk -PBST). Plates were washed again and incubated at 37°C for 2 h each with sera
140 samples (1:100 dilution, 200 μ l/well) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-
141 mouse IgG antibody (1:5000 dilution in PBST-3% non-fat dry milk (NFDm)). All
142 washing steps were carried out by using an ELx50™ strip washer (BioTech), and all
143 antibodies were purchased from Bethyl Laboratories, Inc. The color was developed by
144 incubation with 100- μ l/well Sure Blue TMB substrate (Kirkegaard & Perry Labs) at room
145 temperature for 15 min, the reaction was stopped with 2N sulfuric acid, and change in
146 color was monitored at 450 nm using an Epoch microplate reader.

147

148 *2.9. Histology*

149 Six mice per group were sacrificed humanly under anesthesia on day 30 post-
150 infection. Samples from skeletal muscle and heart were fixed in 10% formaldehyde and
151 embedded in paraffin [20]. Serial sections of 3 μm thicknesses were prepared from non-
152 consecutive areas, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and at least five sections
153 per tissue for each mouse were examined for the presence of acute inflammation and
154 parasite nests (magnification: 400X and 100X).

155

156 *2.10. Tissue parasitism and inflammation score*

157 Tissue parasitism was evaluated by counting the amastigotes nests present in 100
158 microscopic fields in each of the analyzed organs. Likewise, inflammatory infiltrate was
159 visualized in >200 microscopic fields of the tissue sections from the heart and skeletal
160 muscle, and scored using the following score system (ordinal method)

Histopathological scoring system key

Parameters/Score	0	1	2	3	4
Focal lympho-plasmocytes	None (0%)	Rare (1-10%)	Slight (11-25%)	Moderate (26-50%)	Severe (\geq 51%)
Diffused lymphoplasmocytes	None (0%)	Slight (1-10%)	Moderate (11-40%)	Coalescing (41-80%)	Diffuse (\geq 80%)
Polymorphnuclear Leukocyte/lymphocyte	None (0%)	Rare (1-10%)	Slight (11-20%)	Moderate (21-30%)	Severe (\geq 31%)
Necrosis	None (0%)	Rare (1-5%)	Slight (6- 10%)	Moderate (11-30%)	Severe (\geq 31)

Amastigotes nests	None (0%)	Few (1-2)	Slight (3-5)	Moderate (6-10)	Severe (≥11)
-------------------	--------------	--------------	-----------------	--------------------	-----------------

161 Score criteria were based on previous studies [20,21]. Three pathologists blindly analyzed
 162 the samples, and final consensus results were recorded.

163

164 *2.11. Statistical analysis*

165 Female CD1 mice of 6-8 weeks age were housed in CIESA-FMVZ-UAEM animal
 166 facility and were randomly distributed and divided into six groups for homogeneity of
 167 variances among each other [22]. Treatments were randomly assigned to the experimental
 168 units with six repetitions per treatment. Results were analyzed for significant differences
 169 using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison tests
 170 (SAS® University Edition Software) and considered significant at $p < 0.05$.

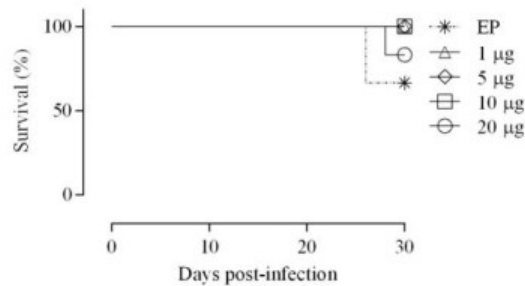
171

172 **3. Results**

173 *Mice survival throughout the experimental phase*

174 Mice were first vaccinated and then challenged with MHOM/MX/1994/Ninoa
 175 strain of *T. cruzi* (500 trypomastigotes/mouse, intraperitoneally) 30 days after the first
 176 vaccination dose. During the infection period, all mice survived, except for some
 177 animals from groups I (EP) and IV (20 µg), showing a survival rate of 83.3 % and
 178 66.6%, respectively. No significant differences between the analyzed groups were
 179 detected through Mantel-cox test ($P = 0.1868$).

180



181

182 **Figure 1. Survival rate of all mice groups during the post-infection experimental**
 183 **period.** Mice were monitored for 30 days for any sign of death. Mice group 20 µg and
 184 EP (control group) showed 83.3 % and 66.6% survival, respectively. Data were analyzed
 185 statistically through Mantel-Cox test, survival curves did not show any significant
 186 differences (P =0.1868).

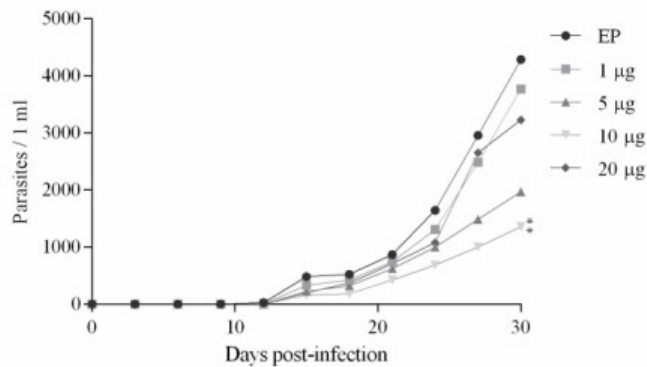
187

188

189 *Parasitemia*

190 Blood circulating *T. cruzi* trypomastigotes were counted during the acute phase
 191 infection for all mice groups (n=6/group), mice groups vaccinated with EP and 1 µg
 192 showed the highest *T. cruzi* counts (4287 and 3767 parasites/ml, respectively). While
 193 mice from groups III (5 µg) and VI (20 µg) showed reduced parasite counts (1967 and
 194 3225 parasites/ml, respectively). However, only the group IV (10 µg) demonstrated
 195 statistically different (P= 0.0064) parasite counts/ml (1356 trypomastigotes) when
 196 compared with group I (EP).

197



198

199 **Figure 2. Parasitemia counts for experimentally *T. cruzi* infected mice groups.**

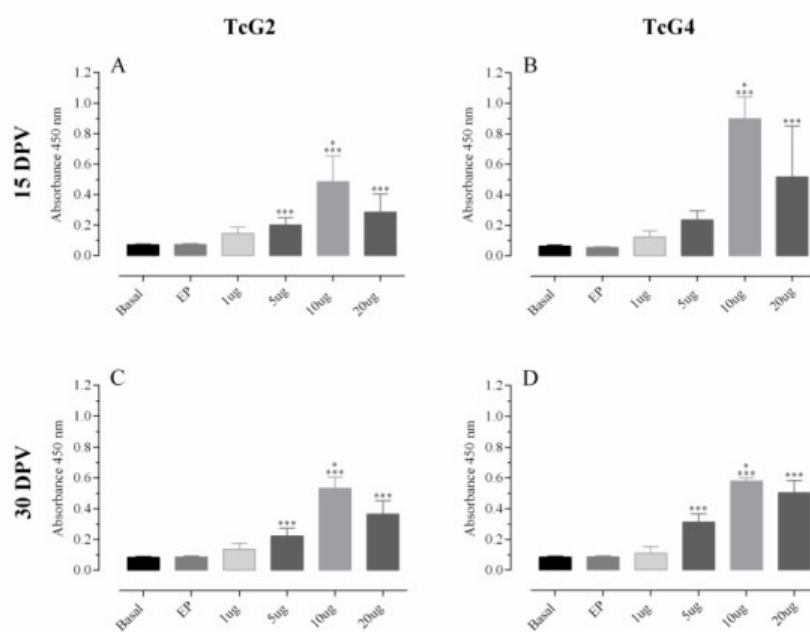
200 Parasites were counted for each mouse for all groups (n=6) twice a week, all experimental
 201 groups were detailed in material and methods section. Data were analyzed and compared
 202 using non-parametric Two-way ANOVA test and Tukey multiple comparison test
 203 respectively. ‡, indicates statistical difference (P= 0.0064) between groups IV (10 µg) and
 204 EP (control group).

205

206 *IgG-specific antibody response in mice vaccinated and challenged with *T. cruzi**

207 Mice were vaccinated with modified TcVac1 vaccine (TcG2 and TcG4, surface
 208 *T. cruzi* antigens) and challenged with MHOM/MX/1994/Ninoa strain. IgG-specific
 209 antibodies were measured 15- and 30-days post vaccination, showing a significant
 210 increase in the acquired immune response for mice groups (5 µg, 10 µg and 20 µg),
 211 with a maximum absorbance peak for animals from group IV (10 µg) for both TcG2
 212 and TcG4 antigens (Figures 3-A, -B, -C and -D). After challenge infection, mice from
 213 all groups exhibited strong increment level of anti-TcG2 and -TcG4 specific IgG
 214 antibodies, where animals from groups IV (10 µg) and V (20 µg) had a significant
 215 difference P<0.001 from mice group I (EP) (Figures 4A and 4B, respectively). On the

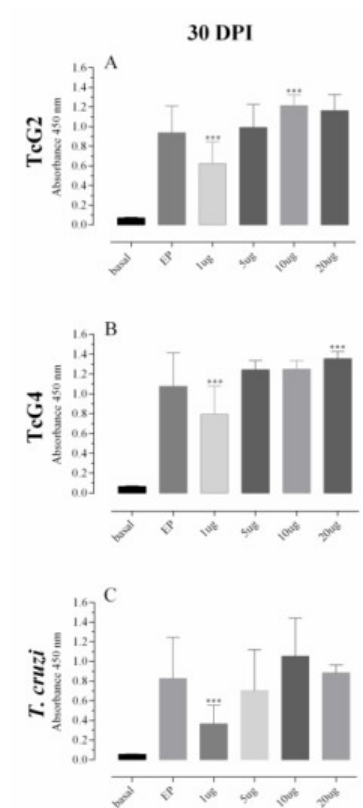
216 other hand, ELISA assay prepared with *T. cruzi* parasite lysates showed a high
 217 increment in anti-*T. cruzi* IgG levels, however, no statistical differences were observed
 218 when comparing M-TcVac1 vaccinated animals with the control group mice.
 219



220

221 **Figure 3. TcG2- and TcG4-specific antibody response in mice vaccinated with**
 222 **modified TcVac1 vaccine.** Mice were vaccinated as detailed in material and methods
 223 section. *T. cruzi* specific IgG was assessed by ELISA assay was carried out from sera
 224 samples (1:50 dilution) obtained at day 15 (A & B) and 30 (C & D) post vaccination,
 225 TcG2- (A & C), TcG4- (B & D) specific antigens were evaluated for all mice groups.
 226 Data were expressed as mean value \pm SD, and derived from triplicate observations by
 227 sample per mouse (n = 6 mice per group). ***: show statistical differences between
 228 vaccinated group vs control group (EP) at a P < 0.0001. *: show statistical differences

229 between 10 µg vs 5 µg and 20 µg groups ($P < 0.001$). Basal: non-protein coated plate
230 well. EP: Empty plasmid (as negative control).
231



232
233 **Figure 4. TcG2- and TcG4-specific antibody response in mice vaccinated with**
234 **modified TcVac1 vaccine and challenged with *T. cruzi*.** Mice were vaccinated as
235 detailed in material and methods section. *T. cruzi* specific IgG was assessed by ELISA
236 assay was carried out from sera samples (1:50 dilution) obtained at day 30 post-infection.
237 TcG2- (A), TcG4- (B) and *T. cruzi*- (5×10^5 parasite lysate equivalent/well, C) specific
238 antigens were evaluated for all mice groups. Data were expressed as mean value \pm SD,

239 and derived from triplicate observations by sample per mouse (n = 6 mice per group).
240 ***: show statistical differences between vaccinated group vs control group (EP) at a P
241 < 0.001.

242

243

244 *Histopathology*

245 All mice vaccinated with modified TcVac1 exhibited histopathological
246 differences with respect to those patterns found in infected control mice (EP). In
247 myocardial tissue, focal lymphocyte infiltrations were evident in vaccinated mice from
248 groups II, IV and V (5 µg, 10 µg, and 20 µg). However, mice from groups IV and V (10
249 µg and 20 µg) exhibited a higher infiltration of polymorphonuclear leucocytes and
250 necrosis in myocardial tissue, while both groups showed the lowest parasite nests counts.
251 Mice vaccinated with 1 µg did not show any significant difference when compared to
252 control groups, except for the stimulation of the diffused lymphocyte infiltration.

253 Ninoa strain of *T. cruzi* showed slightly lower affinity for skeletal muscle than to
254 myocardial tissue, which was evidenced during the histopathological analysis, where a
255 slight to moderate focal lymphocyte infiltration was observed in animals from treatments
256 III, IV and V (5 µg, 10 µg, and 20 µg). No apparent differences were observed regarding
257 diffused lymphocyte infiltration or necrosis in vaccinated/infected animals. In all
258 challenged animals amastigotes nests were detected, however for animals from the group
259 IV (10 µg) this number was significantly lower.

260

	EP	1 µg	5 µg	10 µg	20 µg
<hr/> Myocardial tissue <hr/>					

Focal lympho-plasmocytes	0.7	0.8	2.3*	3.5*	3.3*
Diffused lympho-plasmocytes	1.2	2.2*	2.5*	0.3	0.5
Polymorphonuclear Leukocyte/lymphocyte	0.5	0.7	1.3	3.3*	3.0*
Necrosis	1.3	1.5	2.2	2.5*	2.7*
Parasite nests' count	163.2	124.7*	73.8*	48.8*	71.7*
Skeletal muscle tissue					
Focal lympho-plasmocytes	1.2	1.8	2.3*	3.2*	2.8*
Diffused lympho-plasmocytes	2.2	2.3	2.2	2.7	2.5
Polymorphonuclear Leukocyte/lymphocyte	0.3	1.2	1.3*	3.2*	3.0*
Necrosis	0.8	0.7	1.0	1.5	1.7
Parasite nests' count	91.2	86.3	67.7	46.7*	56.3*

261

262 Table 1. Histopathological abnormalities for mice groups vaccinated with modified
263 TcVac1 vaccine 30 days post challenge. Mice were vaccinated and challenged as detailed
264 in material and methods section. Tissue sections were examined for inflammatory
265 infiltrate, necrosis, and parasite nests as described by Slauson and Barbabosa-Pliego
266 [20,26]. Data represents the average score of the evaluation of 100 microscopic
267 fields/treatment/tissue and were analyzed for statistical differences using as mean score
268 of mice per group (n = 6). *: indicates statistical differences (P<0.001) of vaccinated
269 groups vs control groups (PcDNA3.1, empty plasmid).

270

271 **4. Discussion**

272 In previous studies, our group had reported that TcVac1 provides partial protection to *T.*
273 *cruzi* infection and Chagas disease in mouse [4] and dog [6] models. TcVac1 is an anti-
274 *T. cruzi* multicomponent DNA vaccine that includes three membrane antigens of the
275 parasite (TcG1, TcG2, and TcG4) plus genetic adjuvants (GM-CSF and IL-12). Later we
276 demonstrated that different delivery protocols, such as DNA-prime/protein boost
277 (TcVac2; Gupta and Garg 2010) and DNA-prime/MVA-boost (TcVac3; Gupta and Garg
278 2013) improved immune response and protection of animals against an experimental
279 infection with *T. cruzi*. Further, from the use of DNA-prime/MVA-boost vaccination
280 protocol, we learned that the use of only two antigens (TcG2/TcG4) without the need of
281 DNA adjuvants, was sufficient to induce a strong immune protective response against *T.*
282 *cruzi* infection. However, cost and difficulty associated with the production of
283 recombinant proteins or MVA (Modified Vaccinia Ankara) led us to search for a simple
284 and effective delivery system of the TcVac1 vaccine. Therefore we used the intradermal
285 electroporation delivery system for TcVac1 vaccine and showed that this vaccination
286 system provides an adequate level of protection against an experimental infection with *T.*
287 *cruzi* in mice [8]. However, the questions that remained to be unanswered were if this
288 vaccination system would allow reducing the number of antigens from three to two, the
289 dose used (< 25 µg) and number of vaccination boosts (< 3) and still induce satisfactory
290 protective effects against a *T. cruzi* infection challenge. Therefore, in the present study
291 we used a two antigen (TcG2/TcG4) vaccine, without DNA adjuvants, and tested four
292 different (1, 5, 10 and 20 µg) reduced doses, using a single DNA delivery intradermal
293 electroporation protocol and challenged against a *T. cruzi* strain
294 (MHOM/MX/1994/Ninoa) that has proven to be very pathogenic of for mice.

295 After vaccination/infection protocol, animals from group 1 (EP), looked depressed and
296 showed weakness and had a reduced social interaction with other cage-mates by the end

297 of the experimental infection and therefore we expected dead animals among this group,
298 probably, if the experimental period had lasted for a few more days, no animals from this
299 group would have survived the infection. Except for animals from group I (EP), no
300 animals showed behavioral or visible clinically abnormalities during the experimental
301 period. Three animals died derived from the experimental infection with *T. cruzi* Ninoa
302 strain. Two of them belonged to the group I (EP) and one more to group V (20 µg). No
303 animals from vaccinated/infected groups showed any signs of weakness or behavior
304 problems and we did not expect any deaths. Since no other casualty was found (aside
305 from the one mouse death found in group V) in any of the vaccinated groups, it could be
306 assumed that the vaccine somehow had protective effects against a *T. cruzi* infection,
307 disregarding the vaccination dose.

308 It has been demonstrated that TcVac vaccine series, reduces parasitemia levels and
309 stimulates specific cellular and humoral immune responses [3,4,8,23,24]. M-TcVac1
310 vaccine delivered via electroporation in mice groups III (5 µg) and IV (10 µg) reduced
311 parasitemia counts in 50% and 80%, respectively, and induced a significantly higher
312 humoral immune response. For group II (1 µg), it was not possible to detect the immune
313 response, suggesting that this vaccination dose is not adequate to express antigens in
314 enough quantities to induce a detectable immune response, suggesting that repeated
315 vaccination boosts would be required for this specific DNA dose to induce an adequate
316 immune response. After vaccination, animals from groups III (5 µg), IV (10 µg) and V
317 (20µg) showed significantly higher anti-TcG2 and -TcG4 specific IgG antibody levels
318 than those found in animals from groups I (EP) and II (1 µg). For all infected animals
319 anti-TcG2, -TcG4 and *T. cruzi* antibody levels at day 30 post-infection were statistically
320 different from basal levels however, no differences were observed among groups, except
321 for animals from groups IV (10 µg) for TcG2 and V (20 µg) for TcG4, who were

322 statistically higher than all other groups. In previous reports, we had always used 25 µg
323 from each plasmid DNA with repeated boosts to induce a good humoral immune response
324 [3,4,7,8]. The present report shows that adequate levels of specific anti-TcG2 and -TcG4
325 antibodies can be achieved with 10 µg of plasmid DNA vaccine when delivered through
326 intradermal electroporation. A pcDNA3.1 vector (the one used for TcVac1 DNA vaccine)
327 includes a CMV promoter, which enhances and assures a high expression rate and
328 therefore, it would be expected that the higher the DNA vaccine dose, the higher immune
329 response would be observed. A possible explanation for finding an equivalent humoral
330 immune response when comparing 10 and 20 µg plasmid DNA vaccination doses, could
331 be a saturation in accepting high concentrations of plasmid DNA by keratinocytes and
332 antigen presenting cells (the cell types mainly transfected during the intradermal
333 electroporation process) present near the plasmid injection site, leading to a limited
334 expression of the desired protein [25].

335 Histologically, the myocardial tissue sections demonstrated aggregations of focal
336 lymphocytes around parasite nests forming a barrier between the infected myocytes and
337 the healthy ones. The cellular immune response seemed unable to prevent parasites
338 infecting the cells, but was able to prevent further pathological complications as
339 cardiomegaly, biventricular hypertrophy, thinning of the ventricular walls, vascular or
340 valvular necrosis and intra-myocardial thrombosis. In general, vaccinated/infected
341 animals showed a more intense inflammatory reaction in heart and skeletal muscle tissues
342 than non-vaccinated/infected animals. More polymorphonuclear, plasma-lymphocyte and
343 lymphocyte infiltration, as well as, more necrotic tissue was observed in vaccinated than
344 in non-vaccinated/infected animals. However, for animals vaccinated with higher doses
345 of plasmids, the number of amastigotes nests observed was significantly lower than from
346 animals from the control group (EP). Parasite burden observed in vaccinated animals

347 represented 45.2 % (group III), 29.9 % (group IV) and 43,9 % (group V) for heart tissue
348 and 51.2 % (group IV) and 61.73% (group V) for skeletal muscle tissue when compared
349 to non-vaccinated/infected animals. These results suggest that the drop in parasite burden
350 observed in animals vaccinated with higher doses of M-TcVac1 and then infected, could
351 be due to the anti-TcG2 and -TcG4 IgG specific antibodies observed in the present study.
352 Which could also be associated with lower mortalities in vaccinated-infected animals (4.1
353 %) as compared to only infected animals (33.3%).

354 In previous studies (Gupta and Garg, 2013 and 2015), C57BL/6 mice were immunized
355 with TcG2/TcG4 *T. cruzi* subunit proteins, delivered by DNA-prime/Protein-boost or
356 DNA-prime/MVA-boost approaches, found that these vaccines were able to protect
357 animals against a *T. cruzi* infection. Those vaccination protocols included a series of one
358 or two booster immunizations with recombinant proteins or MVA vector. In
359 vaccinated/infected animals, a reduction by 2 to 3 fold the parasite burden was observed,
360 as compared to the only infected animals. Those results were similar to those observed in
361 the present study, however, it is worth noting that in the present study, just a single DNA
362 dose, without the need of protein or MVA booster immunization protocols was used,
363 reducing the amount of plasmid DNA immunization dose and disregarding more complex
364 and expensive vaccination protocols. Intradermal electroporation protocol thus far proved
365 to be an effective method for M-TcVac1 DNA vaccine delivery, promoting adequate
366 protection against *T. cruzi* infection, also reducing time and cost associated to the
367 preparation of plasmid DNA, recombinant proteins or MVA particles, by reducing
368 vaccination doses, immunization boosts and the need of using adjuvants.

369

370 **5. Conclusion**

371

372 Intradermal electroporation of M-TcVac1 vaccine candidate, without the need of
373 adjuvants, using a single application dose, shows a protective control against *T. cruzi*.
374 That should be confirmed by in-depth immunological studies.

375

376 **Acknowledgements**

377 The authors thank the Universidad Autónoma de Estado de México (Grant No. UAEM
378 3326/2012C) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT
379 No.156701) for the financial support awarded to this project. M.Sc. Wael Hegazy Hassan
380 Moustafa would like to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Scholarship
381 No. 518232/291117) for the scholarship awarded for postgraduate studies at the
382 Universidad Autónoma del Estado de México.

383

384 **Author contributions**

385 JCVC and WHHM conceived and designed the experiments; WHHM performed the
386 experiments; JMECO, SGMA and NJG substantially contributed to conception, design
387 and acquisition of data; NJG contributed to vaccine design and production, JMECO,
388 ABP, ETB contributed reagents/materials/analysis tools; WHHM performed
389 anatomopathological and histopathological analysis; WHHM, JCVC, and NJG prepared
390 the paper; All authors read and approved the manuscript to be published.

391

392 **Conflicts of Interest**

393 The authors declare no conflict of interest.

394

395 **6. References**

- 396 1. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). In: world health organization
397 [Internet]. 2017 [cited 7 Mar 2018]. Available:
398 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- 399 2. Cazorla SI, Frank FM, Malchiodi EL. Vaccination approaches against
400 *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8: 921–35.
401 doi:10.1586/erv.09.45
- 402 3. Gupta S, Garg NJ. TcVac3 Induced Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and
403 Chronic Myocarditis in Mice. Rodrigues MM, editor. *PLoS One*. 2013;8: e59434.
404 doi:10.1371/journal.pone.0059434
- 405 4. Bhatia V, Garg NJ. Previously unrecognized vaccine candidates control
406 *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clin Vaccine*
407 *Immunol*. 2008;15: 1158–1164. doi:10.1128/CVI.00144-08
- 408 5. Gupta S, Wan X, Zago MP, Martinez Sellers VC, Silva TS, Assiah D, et al.
409 Antigenicity and Diagnostic Potential of Vaccine Candidates in Human Chagas
410 Disease. Rodrigues MM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7: e2018.
411 doi:10.1371/journal.pntd.0002018
- 412 6. Aparicio-Burgos JE, Ochoa-García L, Zepeda-Escobar JA, Gupta S, Dhiman M,
413 Martínez JS, et al. Testing the Efficacy of a Multi-Component DNA-
414 Prime/DNA-Boost Vaccine against *Trypanosoma cruzi* Infection in Dogs.
415 Correa-Oliveira R, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5: e1050.
416 doi:10.1371/journal.pntd.0001050
- 417 7. Gupta S, Garg NJ. Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in
418 mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4: 9–13. doi:10.1371/journal.pntd.0000797

- 419 8. Hegazy-Hassan W, Zepeda-Escobar JA, Ochoa-García L, Contreras-Ortiz JME,
420 Tenorio-Borroto E, Barbabosa-Pliego A, et al. TcVac1 vaccine delivery by
421 intradermal electroporation enhances vaccine induced immune protection against
422 *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*. The Authors; 2019;37: 248–257.
423 doi:10.1016/j.vaccine.2018.11.041
- 424 9. Lin F, Kichaev G, Mendoza JM, Yang M, Armendi P, Kobinger GP, et al.
425 Optimization of Electroporation-Enhanced Intradermal Delivery of DNA
426 Vaccine Using a Minimally Invasive Surface Device. 2012;168: 157–168.
427 doi:10.1089/hgtb.2011.209
- 428 10. Best SR, Peng S, Juang C-M, Hung C-F, Hannaman D, Saunders JR, et al.
429 Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest
430 CD8+ T cell immune responses compared to intramuscular injection and
431 intradermal gene gun delivery. *Vaccine*. 2009;27: 5450–5459.
432 doi:10.1016/j.vaccine.2009.07.005
- 433 11. Zhou Y, Fang F, Chen J, Wang H, Chang H, Yang Z, et al. Electroporation at
434 Low Voltages Enables DNA Vaccine to Provide Protection against a Lethal
435 H5N1 Avian Influenza Virus Challenge in Mice. *Intervirology*. 2008;51: 241–
436 246. doi:10.1159/000156483
- 437 12. Ochoa L. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción,
438 cuidado y uso de los animales de laboratorio. Nom-062-Zoo. 1999; 1–58.
439 Available: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- 440 13. Manning-Cela R, Cortés A, González-Rey E, Van Voorhis WC, Swindle J,
441 González A. LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by
442 *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2001;69: 3916–3923.

- 443 doi:10.1128/IAI.69.6.3916-3923.2001
- 444 14. Bhatia V, Sinha M, Luxon B, Garg N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* Sequence
445 Database for Identification of Potential Vaccine Candidates by In Silico and In
446 Vitro Screening. *Infect Immun.* 2004;72: 6245–6254.
447 doi:10.1128/IAI.72.11.6245-6254.2004
- 448 15. Garg N, Bhatia V. Current status and future prospects for a vaccine against
449 American trypanosomiasis. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4: 867–880.
450 doi:10.1586/14760584.4.6.867
- 451 16. Van Herck H, Baumans V, Brandt CJWM, Boere HAG, Hesp APM, van Lith H
452 a, et al. Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein and the
453 tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables.
454 *Lab Anim.* 2001;35: 131–139. doi:10.1258/0023677011911499
- 455 17. BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally
456 infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1962;4: 389–96.
457 doi:<http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/revista/vol04/389-396.pdf>
- 458 18. Rowland EC, Sibley-Phillips S. Bone Marrow Eosinophil Levels in *Trypanosoma*
459 *cruzi* Infected Mice. *J Parasitol.* 1984;70: 819. doi:10.2307/3281771
- 460 19. Kuhn RE, Vaughn RT, Herbst GA. The effect of BCG on the course of
461 experimental Chagas' disease in mice. *Int J Parasitol.* 1975;5: 557–560.
462 doi:10.1016/0020-7519(75)90049-1
- 463 20. Barbabosa-Pliego A, Díaz-Albiter HM, Ochoa-García L, Aparicio-Burgos E,
464 López-Heydeck SM, Velásquez-Ordoñez V, et al. *Trypanosoma cruzi* circulating
465 in the southern region of the State of Mexico (Zumpahuacan) are pathogenic: a

- 466 dog model. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81: 390–5. Available:
467 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784919/>
- 468 21. Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for Valid
469 Histopathologic Scoring in Research. *Vet Pathol.* 2013;50: 1007–1015.
470 doi:10.1177/0300985813485099
- 471 22. Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA. Principles and Procedures of Statistics: A
472 Biometrical Approach [Internet]. McGraw-Hill; 1997. Available:
473 <https://books.google.com.mx/books?id=XBbvAAAAMAAJ>
- 474 23. Aparicio-Burgos JE, Zepeda-Escobar JA, de Oca-Jimenez RM, Estrada-Franco
475 JG, Barbabosa-Pliego A, Ochoa-García L, et al. Immune Protection against
476 *Trypanosoma cruzi* Induced by TcVac4 in a Canine Model. Santiago H da C,
477 editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: e0003625.
478 doi:10.1371/journal.pntd.0003625
- 479 24. Gupta S, Garg NJ. A Two-Component DNA-Prime/Protein-Boost Vaccination
480 Strategy for Eliciting Long-Term, Protective T Cell Immunity against
481 *Trypanosoma cruzi*. Petersen CA, editor. *PLOS Pathog.* 2015;11: e1004828.
482 doi:10.1371/journal.ppat.1004828
- 483 25. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine
484 immunogenicity. *Expert Rev Vaccines.* 2016;15: 313–329.
485 doi:10.1586/14760584.2016.1124762
- 486 26. Slauson DO, Cooper BJ. Mechanisms of disease : a textbook of comparative
487 general pathology. 3rd ed. St. Louis, Mo. [u.a.]: Mosby; 2002.
488

Capítulo tres:

1. Conteo de infiltrado linfocitario en ventrículo derecho e izquierdo y septum del corazón de los ratones infectadas con *T. cruzi*, vacunado con TcVac1.

Los resultados mostraron conteo de infiltrado linfocitario para los ratones vacunados vía intramuscular y/o con inyección intradérmica con electroporación, los infiltrados linfocitarios fueron con más prevalencia en los ventrículos de los corazones estudiados con cifras que excedieron los 200 linfocitos (número promedio) en un área determinada de 250 mil μm^2 (Figura 1, A y B). En la fase aguda de la enfermedad los resultados mostraron una elevación considerable en el número de infiltrado especialmente en los grupos electroporados (D, 664 ± 59.4 , $P < 0.05$) cuando se compara con los ratones vacunados intramuscularmente (C, 496 ± 102.3), lo cual no mostro ninguna diferencia significativa contra el grupo control.

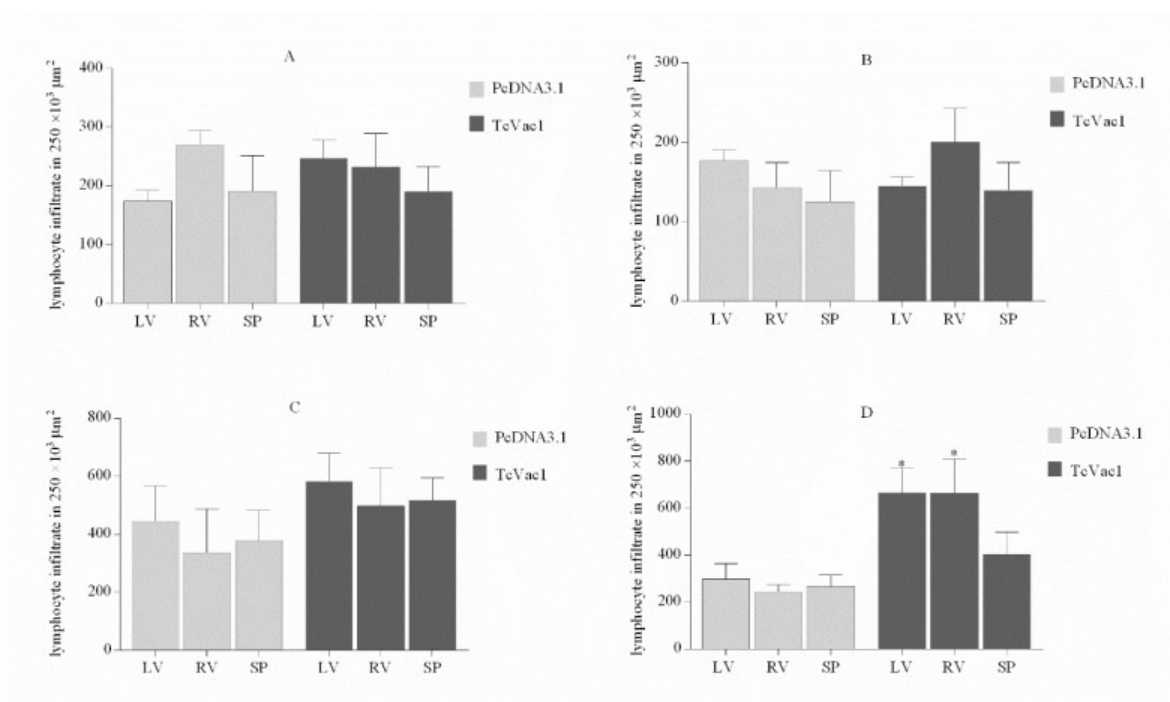


Figura 10. Conteo histopatológico colorimétrico de linfocitos de ratones vacunados con TcVac1 y desafiados con *T. cruzi*. Se utilizaron 4 grupos de ratones: A, vacunación intramuscular; B, vacunación por electroporación intradérmica; C, vacunación intramuscular y desafiados y D, vacunación por electroporación intradérmica y desafiados. Los animales fueron sacrificados 15 días después del último refuerzo vacunal o 60 días después de la infección de desafío, respectivamente. Los infiltrados linfocitarios fueron contados como se describe en la sección de material y métodos. *, muestra diferencia significativa entre grupos

vacunales (TcVac1) y el grupo control (Vacunados con pcDNA3 vacío). Los resultados de los grupos vacunados con TcVac1 y los grupos control (pcDNA3) fueron comparados por análisis de varianza de una sola variable y las diferencias entre grupos por la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró que existía diferencia significativa a un valor de $P < 0.05$. Se prepararon secciones seriales de 5 micras de espesor de las áreas: VI, ventrículo izquierdo; VR, ventrículo derecho; SP, septo; teñidas con hematoxilina eosina. Se buscó infiltración linfocitaria en por lo menos 9 secciones de cada área de corazón por animal con un microscopio Axiostar Carl-Zeiss, con fuente halógena de 50W. Las fotos digitales (Tiff) fueron tomadas con el mismo balance de blancos por el software IScapture®; las imágenes fueron capturadas con aumento 400X con la cámara Cooled-CCD Tucsen (5MP) y los linfocitos localizados contados con el programa Image-pro plus.

2. Hipertrofia del tejido cardiaco después de la vacunación e infección con cepa *sylvio* de *T. Cruzi*.

Los datos cuantitativos de la hipertrofia del tejido cardiaco de los ratones vacunados infectados mostraron la alta especificidad con la técnica usada a través del software Image-pro plus, lo cual arrojo datos que explican la patología ocurrida durante la infección. La administración de la vacuna vía intramuscular tuvo un efecto inferior en el control de la infección en comparación con los animales vacunados por electroporación intradérmica. Los animales del grupo de inyección intramuscular mostraron un ligero aumento en el tono muscular especialmente en el septum (Figura 2-A, $P < 0.05$), con relación a los ratones vacunados vía electroporación intradérmica mostraron nivel más bajo que los ratones control lo que indica que las células del sistema inmune fueron capaces a controlar la propagación del parásito en los cardiomiocitos.

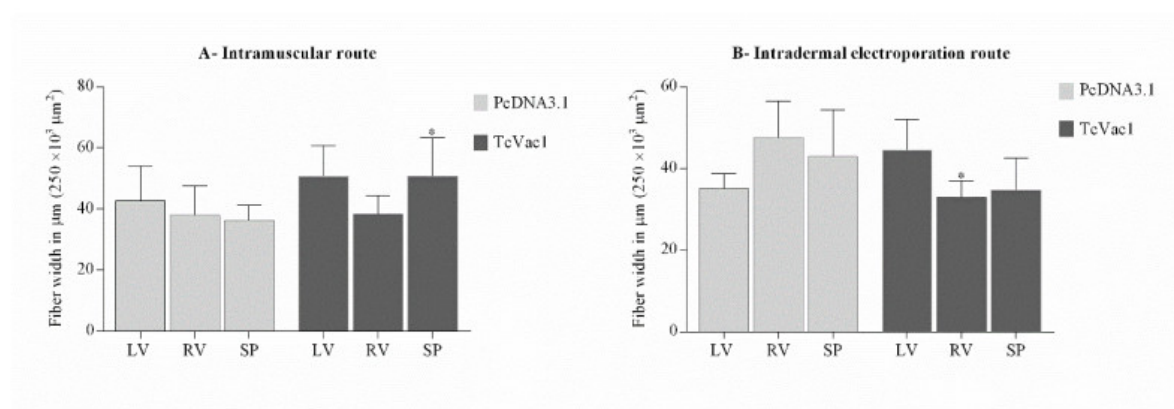


Figura 11. Hipertrofia de cardiomiocitos medida a través de software colorimétrico de cortes histopatológicos de ratones BALB/c vacunados con TcVac1 y desafiados con *T. cruzi*. Los ratones fueron vacunados y desafiados según lo descrito en la sección de material y métodos. Se prepararon secciones seriales de 5 micras de espesor de las áreas: VI, ventrículo izquierdo; VR, ventrículo derecho; SP, septo; teñidas con hematoxilina eosina. Se buscó hipertrofia en por lo menos 9 secciones de cada área de corazón por animal (en un área definida de $250 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) con un microscopio Axiostar Carl-Zeiss, con fuente halógena de 50W. Las fotos digitales (Tiff) fueron tomadas con el mismo balance de blancos por el software IScapture®; las imágenes fueron capturadas con aumento 400X con la cámara Cooled-CCD Tucsen (5MP), los cardiomiocitos fueron medidos en busca de hipertrofia con el programa Image-pro plus. Los resultados de los grupos vacunados con TcVac1 y los grupos control (pcDNA3) fueron comparados por análisis de varianza de una sola variable y las diferencias entre grupos por la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró que existía diferencia significativa a un valor de $P < 0.05$.

3. Conteo de cardiomiocitos sanos en ratones vacunados e infectados por *T. Cruzi* usando la técnica de histología computarizada por análisis colorimétrico.

El aumento del número de cardiomiocitos fue normal para ratones vacunados vía intramuscular (Figura 3A) o vía electroporación intradérmica (Figura 3C), indicando que la vacuna no tiene efecto en alterar la proliferación celular, mientras fue relativamente alto en grupos de ratones vacunados e infectados vía intramuscular (Figura 3B). Al contrario, los ratones que recibieron la vacuna vía electroporación intradérmica mostraron cifras más bajas al compararse con ratones de control.

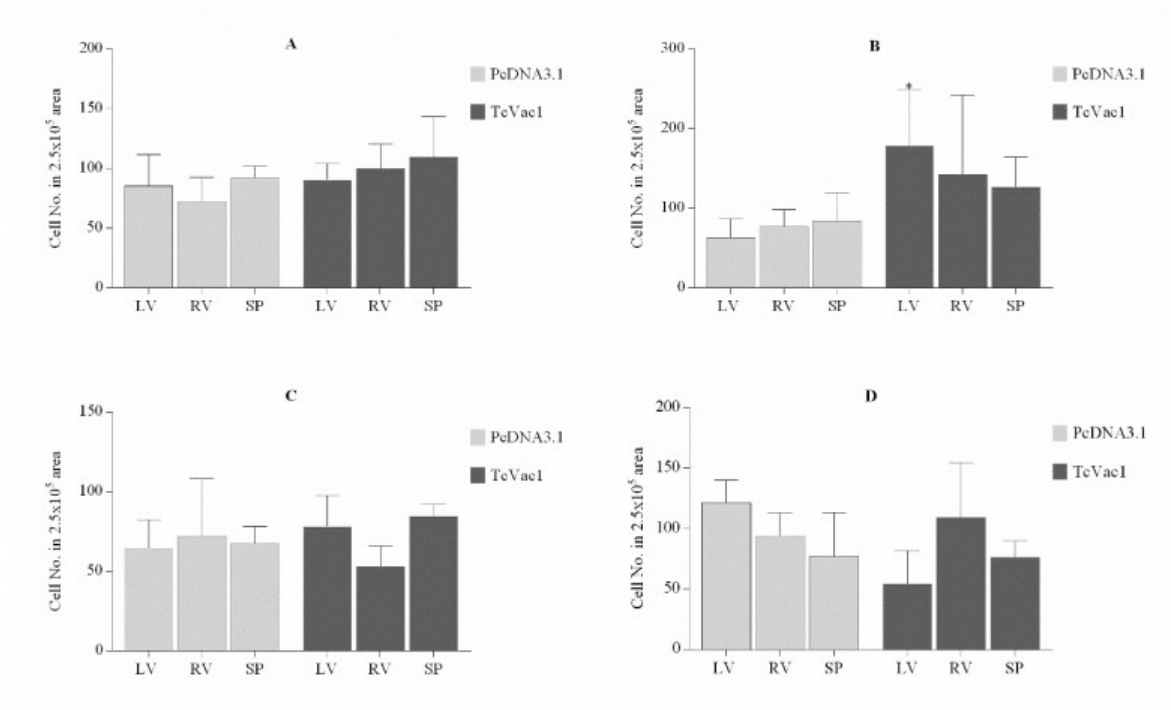


Figura 12. Cuento histopatológico de cardiomiocitos de ratones vacunados por vía intramuscular o por electroporación intradérmica y desafiados con *T. cruzi*, a través de software colorimétrico. Los ratones fueron vacunados y desafiados según lo descrito en la sección de material y métodos, se estableció el recuento mediante la determinación del número de cardiomiocitos sanos para grupos de ratones vacunados a vía intramuscular antes y después del desafío (A y B), así como, a través de la electroporación intradérmica (C y D, respectivamente). Se examinaron nueve secciones para cada área específica (LV: ventrículo izquierdo, RV: ventrículo derecho, SP: tabique, $250 \times 10^3 \text{ m}^2$) y se compararon los resultados entre los grupos de ratones vacunados (TcVac1) y los grupos de ratones de control (PcDNA3.1) para ambas técnicas de administración. Los resultados se analizaron en busca de diferencias significativas mediante el análisis unidireccional de la varianza ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). *: mostrar diferencias estadísticas entre los grupos de control (PcDNA3.1, solo vector) y los grupos vacunados (TcVac1).

DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio, comparamos el enfoque de electroporación intradérmica y la técnica de administración intramuscular convencional para determinar la eficiencia diferencial de estos dos protocolos para la administración de la vacuna TcVac1 en un modelo murino. Las vacunas candidatas contra la enfermedad de Chagas se han probado principalmente por vía de inmunización intramuscular. La inyección intradérmica o intramuscular de vacunas de ADN proporcionan un sistema eficiente para activar las células presentadores de antígenos (CPA), principalmente debido a la presencia de células dendríticas en el sitio de administración del ADN y a que el antígeno expresado se presenta en asociación con las principales moléculas de clase I del complejo de histocompatibilidad (MHC) (Lin et al. 2012a). Esto puede estimular posteriormente la proliferación de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno en combinación con células T-helper. Los tejidos cutáneos, especialmente la epidermis y la dermis, están llenos de varios tipos de CPA, incluidas las células dendríticas, en contraste con el tejido muscular por lo que la vía de vacunación intradérmica puede ser más eficiente que la vía intramuscular en la estimulación del sistema inmune (Bråve et al. 2011; Lin et al. 2012b; Hegazy-Hassan et al. 2019) Varios investigadores han informado que la permeabilización de las células diana a través de la electroporación (EP) conduce a una mayor aceptación del plásmido recombinante desnudo y una expresión superior del gen de interés por las células presentadoras de antígeno, y por lo tanto una mejor eficacia de inmunización en comparación con la simple vacunación intramuscular (Widera et al. 2000; Faurie et al. 2005; Zhou et al. 2008; Monie et al. 2009; Bråve et al. 2011; Best et al. 2009; Lin et al. 2012a; Daemi et al. 2012; Bolhassani et al. 2014). Además, la ruta de la vacunación intradérmica se dirige específicamente a los dérmicos y a los macrófagos que, cuando se activan, transportarán los componentes de la vacuna al drenaje linfático mediante difusión pasiva o transporte celular de antígenos. Después, la presentación de los antígenos a las células T CD4⁺ y CD8⁺ inmaduras, conduce a su activación, así como, la activación de células B específicas dentro del centro germinativo. Por último, la generación de un grupo de células T y B de memoria específica en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos y médula ósea) y en la periferia (piel

y mucosa) también se observa por la entrega de IDE de antígenos candidatos (Combadiere and Liard 2011). Otros estudios compararon el efecto de la vacunación por plásmido a través de intradérmica (ID) sólo vs intradérmica seguida electroporación (EP), y observaron que con la EP+ID había una mayor y mejor respuesta de anticuerpos que ID solamente (Hirao et al. 2008). Por lo tanto, en el presente estudio se hipotetizó que la electroporación intradérmica mejoraría la eficacia de la vacuna basada en el ADN contra la enfermedad de Chagas.

Es importante tener en cuenta que ambos tipos de respuestas inmunitarias, humorales y celulares, son necesarios para controlar la infección. Esto se evidencia en los hallazgos de que los ratones deficientes en la función de células CD8⁺T y/o B eran susceptibles a la infección por *T. Cruzi* y presentaban una alta parasitemia y mortalidad (KUMAR and TARLETON 1998; Sullivan et al. 2015). Por lo tanto, se considera que una vacuna candidata capaz de obtener respuestas de células B y T y citoquinas Th1 ofrece la mejor protección contra la infección por *T. Cruzi*. Nuestro grupo ha identificado dos candidatos a vacunas, llamados TcG2 y TcG4, que cuando se entregan como vacuna de ADN-prime/boost ADN (TcVac1), provocaron inmunidad protectora y resistencia contra la infección por *T. cruzi* en ratones y perros (Bhatia and Garg 2008; Gupta and Garg 2010; Aparicio-Burgos et al., 2011). A lo largo del uso de antígenos parasitarios, el uso de adyuvantes de ADN como el plásmido de expresión de GM-CSF, mejora la capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas y facilita la inmunidad mediada por células B y T y el Plásmido de expresión de IL-12, una citoquina clave implicada en la activación y la proliferación de células T CD8⁺ como respuesta a vacunas (Garg and Tarleton 2002). Sin embargo, cuando estos plásmidos adyuvantes fueron probados sin antígenos específicos para prevenir la infección por *T. cruzi* en ratones, no mostraron ninguna respuesta de anticuerpos específicos (Gupta et al. 2013; Gupta et al. 2015). Por lo tanto, se puede suponer que la respuesta inmunitaria específica anti-*T. cruzi* observada en el presente informe se basa en los antígenos parásitos TcG2 y TcG4 utilizados en la vacuna candidata. La activación inmune proporcionada por los plásmidos GM-CSF e IL-12 no se analizó en el presente informe.

Con el fin de determinar si la vacunación a través de IDE o vía IM provocó niveles similares (o diferentes) de respuestas inmunitarias celulares, evaluamos la reacción de proliferación de linfocitos después de la inmunización y desafiamos la infección. Si bien los modos IDE e IM

de la proliferación de linfocitos específicos de antígenos provocaron la proliferación de linfocitos específicos de antígenos ($TcG4 > TcG2$), la extensión de la proliferación de linfocitos específicos de antígenos fue mayor en TcVac1_IDE que en el grupo TcVac1_IM ($p < 0.0001$). Es importante destacar que las células T inducidas por la vacuna mostraron una mejor expansión y una función efectora rápida en el control de la carga de parásitos tisulares en ratones inmunizados a través de la vía IDE que a través de la aplicación intramuscular simple. Una mejor protección contra la infección por desafío se asoció con una mayor frecuencia de proliferación de linfocitos específicos contra TcG2 y TcG4 en el grupo TcVac1_IDE frente a TcVac1_IM. Nuestros datos nos permiten suponer que la entrega IDE de TcVac1 mejora la generación de células T de memoria específicas de antígenos que son capaces de responder a la exposición a patógenos, y por lo tanto proporcionaron una mejor eficiencia de la vacuna.

Nuestro hallazgo de mayores niveles de respuesta humoral después de la inmunización y la infección post-desafío también favoreció al IDE sobre el sistema de vacunación IM (Figura 1, capítulo 1). Los ratones TcVac1_IDE mostraron niveles más altos de la respuesta IgG2a/b específica de TcG2 y TcG4 después de la vacunación, un aumento significativo de los niveles de IgG2a/b e IgG1 específicos contra antígenos recombinantes y lisados de parásitos después del desafío. Se propone que los subtipos de anticuerpos IgG1 e IgG2 participen en la eliminación de las formas sanguíneas de parásitos y en una reducción de la tasa de mortalidad animal durante la fase aguda de la infección (Brodskyn et al. 1989). El IgG2a/b generalmente constituye una respuesta inmune prevalente contra los antígenos carbohidratos/polisacáridos, y los IgG1 se consideran predominantemente para reconocer proteínas y antígenos polipéptidos unidos al receptor Fc de células fagocíticas y participar en activación de la cascada de complemento a través de la unión al complejo C1. No se sabe si los antígenos TcG2 y TcG4 se cuentan con modificaciones postraduccionales, o si la entrega IDE de TcVac1 mejora la modificación postraduccional de TcG2 y TcG4 que conduce a un aumento de la respuesta IgG2a/b. Sin embargo, nuestros datos sugieren que la ruta IDE de la administración de TcVac1 es más eficaz para obtener una respuesta predominante de IgG2a/b sobre IgG1 para las fases anteriores y posteriores a la infección, lo que sugiere un perfil inmune sesgado a una respuesta Th1 en ratones experimentales.

Los estudios realizados en caninos, bovinos, primates y humanos indicaron que la vacunación IM con ADN desnudo produce un bajo nivel de expresión del antígeno recombinante, lo que a su vez induce una respuesta inmune subóptima. Esto se explica por el hecho de que el tejido muscular no es un sitio eficiente para la presentación de antígenos, debido a la falta de cantidades adecuadas de CDs, macrófagos y linfocitos. Por lo tanto, se requerían grandes cantidades de administración de dosis de vacunas de ADN por vía IM para establecer una fuerte respuesta inmune en especies mayores (por ejemplo, perros, cerdos, seres humanos), pero esto puede bien aplicar a ratones también. Comparativamente, la administración IDE de la vacuna de ADN requiere cantidades más pequeñas del ADN plasmídico para lograr respuestas inmunitarias fuertes, y por lo tanto ofrece ahorros significativos en tiempo, costo y esfuerzo para la producción y administración de vacunas (Raz et al. 1994; Mumper and Ledebur 2001; Liu and Ulmer 2005). Por lo tanto, la entrega IDE de plásmidos desnudos podría competir favorablemente con otros protocolos de vacunas que incluyen vectores de expresión de antígenos eficientes, como Adenovirus o Salmonella (Miyahira et al. 2005; Cazorla et al. 2008).

La parasitemia sanguínea no se detectó durante la fase experimental aguda en ratones de ningún grupo, lo que indica que la cepa *Sylvio X10/4* de *T. Cruzi* tiene un fuerte tropismo tisular. Este comportamiento de cepa fue reportado previamente por Marinho et al. 2004, quien describió la ausencia de una fase aguda, así como de parasitemia en las semanas siguientes a la infección, cuando se utiliza cepa *Sylvio X10/4* de *T. Cruzi*, con varias cepas de ratón (Marinho et al. 2004). Además, informaron de la presencia de nidos de parásitos, que fueron totalmente ignorados por el sistema inmunológico en ratones en tejido miocárdico. En el presente estudio también, observamos una infiltración leve y difusa de tejido de infiltrado inflamatorio que no se localizó cerca de nidos de parásitos en animales no vacunados/infectados. Por el contrario, el infiltrado inflamatorio tisular se asoció fuertemente con los nidos de parásitos, y contribuyó al control del tamaño y el número de nidos de parásitos tisulares en los ratones vacunados (TcVac1_IM/Tc y TcVac1_IDE/Tc). Por lo tanto, los ratones vacunados/desafiados mostraron una capacidad para controlar la destrucción de tejido mediada por parásitos que era evidente por la observación macroscópica y microscópica de tejido aparentemente más saludable.

Las principales manifestaciones patológicas para la cardiomiopatía chagásica en ratones son cardiomegalia con hipertrofia de tejido cardíaco, dilatación de las cavidades cardíacas y aneurisma principalmente en el ventrículo izquierdo, asociado con inflamación fuerte, y necrótica de cardiomiocitos y de cicatrización por fibrosis (Garg and Bhatia 2005). El protocolo de vacunación IDE alteró los desarrollos histopatológicos en el miocardio de ratones gravemente infectados mediante la inducción de inflamación focal específica para parásitos; además, los ratones vacunados produjeron más anticuerpos y mostraron una respuesta inmune celular más fuerte, que eran capaces de reducir el número de nidos de amastigotes en el tejido cardíaco de ratones (Tabla 2, capítulo 1). Sin embargo, nuestras observaciones de necrosis de cardiomiocitos en ratones TcVac1_IDE/Tc (Figura 3, capítulo 1) sugieren que las respuestas inflamatorias son persistentes y también pueden ser perjudiciales para el huésped. Esta interpretación es consistente con estudios en ratones deficientes de IL-4, que fueron capaces de desarrollar una fuerte respuesta inmune de tipo Th1 y controlar la carga parasitaria aguda, pero también desarrollaron inflamación exacerbada en el tejido miocárdico (SOARES et al. 2001). Se requerirán estudios futuros para determinar si las respuestas inflamatorias inducidas por TcVac1_IDE desaparecen con el control del parásito y no constituyen un factor de riesgo para causar daño tisular constante y a largo plazo en el huésped. De hecho, los ratones vacunados con antígenos TcG2 y TcG4 de ADN mostraron un predominio de una respuesta inflamatoria de tipo 1 capaz de controlar los parásitos circulantes y tisulares en fase aguda, y luego cambiaron a inmunomoduladores, respuesta de curación de tejido tipo 2 proporcionando así protección al corazón (Aparicio-Burgos et al. 2015). Por lo tanto, creemos que IDE puede ofrecer una mayor eficacia protectora de TcVac1 contra la infección aguda y la enfermedad crónica de Chagas.

En estudios anteriores, nuestro grupo había informado de que TcVac1 proporciona una resistencia parcial a la infección por *T. Cruzi* y a la enfermedad de Chagas en modelos de ratón (Bhatia y Garg 2008) y perros (Aparicio-Burgos et al. 2011). TcVac1 es una vacuna de ADN multicomponente anti-*T. cruzi* que incluye tres antígenos de membrana del parásito (TcG1, TcG2 y TcG4) más adyuvantes genéticos (GM-CSF e IL-12). Más tarde demostramos que diferentes protocolos de entrega, como vacuna inicial de ADN/refuerzos de proteína

recombinante (TcVac2; Gupta y Garg 2010) e inicial de DNA/con refuerzo de MVA (TcVac3; Gupta y Garg 2013) mejoraron la respuesta inmunitaria y la protección de los animales contra una infección experimental con *T. Cruzi*. Además, del uso del protocolo de vacunación DNA/refuerzo MVA aprendimos que el uso de sólo dos antígenos (TcG2/TcG4) sin la necesidad de adyuvantes de ADN, era suficiente para inducir una fuerte respuesta de protección inmune contra la infección por *T. Cruzi*. Sin embargo, el costo y la dificultad asociados a la producción de proteínas recombinantes o MVA (Modified Vaccinia Ankara) nos llevaron a buscar un sistema de administración simple y eficaz de la vacuna TcVac1. Por lo tanto, utilizamos el sistema de administración de electroporación intradérmica para la vacuna TcVac1 y demostró que este sistema de vacunación de TcVac1 proporciona un nivel adecuado de protección contra una infección experimental con *T. Cruzi* en ratones (Hegazy-Hassan et al. 2019). Sin embargo, las preguntas que quedaban por responder fueron si este sistema de vacunación permitiría reducir el número de antígenos de tres a dos, la dosis utilizada (<15 µg) y el número de refuerzos de vacunación (< 3) e indujeran efectos protectores satisfactorios contra un desafío de infección de *T. Cruzi*. Por lo tanto, en un siguiente estudio utilizamos una vacuna de dos antígenos (TcG2/TcG4), sin adyuvantes de ADN, y probamos cuatro dosis diferentes (1, 5, 10 y 20 µg de cada plásmido), utilizando un único protocolo de electroporación intradérmica de entrega de ADN y desafiado contra una cepa *T. Cruzi* (MHOM/MX/1994/Ninoa) que ha demostrado ser muy patógena para ratones.

Los animales del grupo 1 (EP), en general parecían tristes y mostraban debilidad y habían reducido el comportamiento de interacción con otros compañeros de jaula al final de la infección experimental y por lo tanto esperábamos animales muertos entre este grupo, probablemente, si el período experimental hubiera durado unos días más, ningún animal de este grupo habría sobrevivido a la infección. A excepción de los animales del grupo I (EP), ningún animal mostró anomalías clínicamente conductuales o visibles durante el período experimental. Tres animales murieron derivados de la infección experimental por la cepa Ninoa de *T. Cruzi*. Dos de ellos pertenecían al grupo I (EP) y uno más al grupo V (20 µg). Ningún animal de grupos vacunados/infectados mostró signos de debilidad o problemas de conducta y no esperábamos ninguna muerte. Dado que no se encontró ninguna otra víctima (aparte de la que se encontró en el grupo V) en ninguno de los grupos vacunados, se podría

suponer que la vacuna de alguna manera tuvo algunos efectos protectores contra una infección por *T. Cruzi*, aun si considerar el nivel de dosis de vacunación.

Se ha demostrado que la serie de vacunas TcVac reduce los niveles de parasitemia y estimula respuestas inmunitarias celulares y humorales específicas (Bhatia and Garg 2008; Gupta and Garg 2013; Gupta et al., 2015; Hegazy-Hassan et al., 2019). La vacuna M-TcVac1 suministrada a través de la electroporación en ratones de los grupos III (5 µg) y IV (10 µg) redujo los recuentos de parásitos en el 50 y el 80%, respectivamente, e indujo una respuesta inmune humoral significativamente mayor. Para el grupo II (1 µg) no fue posible detectar la respuesta inmunitaria, lo que sugiere que esta dosis de vacunación no es adecuada para producir suficientes antígenos para inducir una respuesta inmunitaria detectable, lo que sugiere que se requieren dosis de refuerzo de vacunación para esta dosis de ADN. Después de la vacunación, los animales de los grupos III (5 µg), IV (10 µg) y V (20 µg), mostraron niveles de anticuerpos IgG específicos anti-TcG2 y -TcG4 significativamente más altos que los que se encuentran en animales de los grupos I (EP) y II (1 g). Para todos los animales infectados los niveles de anticuerpos anti-TcG2, -TcG4-, *-T. cruzi* en el día 30 después de la infección fueron estadísticamente diferentes de los niveles basales. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos, excepto para los animales de los grupos IV (10 µg) para TcG2 y V (20 µg) para TcG4, que eran estadísticamente más altos que todos los demás grupos. En informes anteriores siempre habíamos utilizado 25 µg de cada ADN plásmido con impulsos repetidos para inducir una buena respuesta inmune humoral (Bhatia and Garg 2008; Gupta and Garg 2013; Gupta et al. 2015; Hegazy-Hassan et al. 2019). El presente informe muestra que se pueden alcanzar niveles adecuados de anticuerpos específicos anti-TcG2 y -TcG4 con 10 µg de vacuna de ADN plásmido, cuando se administran a través de la electroporación intradérmica.

Un vector pcDNA3.1 (el utilizado para la vacuna TCVac1 DNA) incluye un promotor de CMV, que mejora y asegura una alta tasa de expresión y, por lo tanto, se esperaría que, cuanto mayor sea la dosis de la vacuna de ADN, mayor será la respuesta inmunitaria. Una posible explicación para encontrar una respuesta inmune humoral equivalente a partir de dosis de vacunación con ADN de plásmido de 10 y 20 µg, podría ser que se alcance una saturación de transfección de queratinocitos y células dendríticas (los tipos celulares principalmente

transpirados durante el proceso de electroporación intradérmica) presentes cerca del lugar de inyección de plásmido, al recibir altas concentraciones de ADN plasmídico, lo que podría conducir a una expresión limitada de la proteína deseada (Li and Petrovsky 2016).

En cuanto a los hallazgos histológicos, la vacuna M-TcVac1 confirió protección contra la infección por *T. Cruzi* para los grupos de ratones III, IV y V (5, 10 y 20 μ g, respectivamente), sin embargo, la afinidad de los estímulos inmunes específicos se evidenció más en el tejido miocárdico que en el musculoesquelético, donde se controló la propagación del daño necrotizante causado por el parásito. El estudio de las secciones del tejido miocárdico demostró agregaciones de linfocitos focales alrededor de los nidos de parásitos encontrados, formando una barrera entre los miocitos infectados y los sanos. Aunque la respuesta inmune celular no pudo prevenir el proceso de internalización del parásito en las células, si fue capaz de prevenir más complicaciones patológicas como cardiomegalia, hipertrofia biventricular, adelgazamiento de las paredes ventriculares, necrosis vascular o valvular y trombosis intramiocárdica.

Con este estudio hemos demostrado que la electroporación es un método eficaz para la administración de la vacuna génica TcVac1, que mejoró la biodisponibilidad e inmunogenicidad de los antígenos vacunales, disminuyó el tiempo y el costo de preparación de la vacuna, la dosis empleada por aplicación, el número de refuerzos de la vacuna y la necesidad de uso de adyuvantes.

Capítulo tres:

Se han diseñado y desarrollado sistemas de microscopía asistidos por ordenador para ayudar a los patólogos a entender las células enfermas. Los estudios "colorimétricos" descritos presentan información de análisis de muestras en color y facilitan el procesamiento y cuantificación de la información para ayudar a proporcionar un diagnóstico o a formar un pronóstico para el caso en particular. En el presente trabajo, determinamos el uso de la escala colorimétrica y el procesamiento y análisis de imágenes de microscopio para el tejido

cardíaco de ratones chagasicos a través de un software de procesamiento de imágenes (Image pro plus 5.1). Se establecieron la colección y cuantificación de datos respetando los siguientes criterios; longitud de onda fija, área central enfocada específica, ajuste de la trayectoria óptica del microscopio y la cámara de acuerdo con los estándares de iluminación de Koehler, ajuste del rango dinámico de la cámara, brillo de la luz, maximización de la relación señal-ruido, corrección la imagen de las aberraciones cromáticas, corrigiendo para la iluminación de las no uniformidades y validando la linealidad de la cámara. (Geusebroek et al. 2000; Tworkoski 2010). Para cada muestra, se verificó el protocolo de tinción (mención en la sección material y métodos) para que coincida con todas las muestras, y todas las muestras se analizaron utilizando el mismo microscopio y la misma cámara CCD de color fijo, las imágenes se analizaron directamente en el espacio de color RGB restringiendo el análisis a los píxeles ubicados en una región específica del RGB.

En función de las entidades evaluadas para cada celda a través de las segmentaciones, se atribuye una puntuación en función de la intensidad del marcador y su relación señal-ruido en el compartimiento objetivo. Una celda se considera positiva cuando el contenido del marcador de esa celda en el compartimiento específico del marcador la densidad óptica (intensidad) es significativamente mayor que en los compartimentos vecinos (se incluyó un rango de valores positivos, desde positivo débil hasta fuerte positivo, para el infiltrado de linfocitos y el núcleo de cardiomiocitos).

Los datos mostraron que la vacuna sólo no altera el número de cardiomiocitos o linfocitos presentes en el tejido miocárdico, así como, no se detectaron cambios morfológicos aparentes. Después de la infección de desafío las diferentes rutas mostraron un cambio en la reacción inmune que era evidente bajo el microscopio; ratones vacunados por vía intramuscular mostraron una menor protección contra la infección por *T. cruzi* que presentaba un aumento no significativo de infiltrado de linfocitos (Figura 1-C), por otro lado, los ratones vacunados a través de electroporación intradérmica mostraron recuentos significativamente más altos de infiltrados ($P < 0.05$) en los ventrículos derecho e izquierdo.

Debido a la falta de protección ofrecida por los ratones vacunados a través de la fecha cuantitativa intramuscular obtenida por el análisis colorimétrico demostró un ventrículo izquierdo y una hipertrofia del tabique alto ($P < 0.05$), que podría explicarse por la destrucción

del tejido que produce anomalías de conducción auriculoventricular e intraventricular y/o miocitosis, mionecrosis y necrosis de la banda de contracción. Las bandas de tejido fibroso reemplazan a los miocitos cardíacos y a la acumulación de colágeno extracelular que encierra fibras o grupos de fibras, además, la diferenciación de cardiomiocitos para restaurar la funcionalidad del corazón (Machado et al. 2012). Por el contrario, los ratones vacunados a través del IDE mostraron resultados más bajos que los grupos de ratones de control (RV, $P < 0.05$), lo que indica la eficacia de la técnica aplicada.

Por último, los sistemas de imágenes computarizados demostraron ser un método fiable en la detección de patologías y la precisión en la obtención de datos, sin la incertidumbre de los diferentes contextos de muestras examinadas por el patólogo durante la observación visual.

CONCLUSIÓN GENERAL

Ambos protocolos de vacunación TcVac1 (IDE e IM), protegen contra una infección aguda de *T. Cruzi*, permitiendo una mayor tasa de supervivencia, patologías cardíacas macroscópicas más leves y disminución de la carga tisular del parásito en corazón y músculo esquelético, de lo que se observó en la carga de parásitos en el grupo de ratones no vacunados/infectados. La entrega del IDE ofreció un sistema de vacunación más eficiente que la ruta IM. Esto se evidenció mediante la inducción de niveles más altos de respuestas inmunitarias celulares y humorales de tipo Th1 que se expandieron en respuesta a la infección de desafío y proporcionaron una infiltración más fuerte de células inflamatorias capaces de controlar nidos de parásito en el corazón y tejidos esqueléticos en ratones vacunados con TcVac1 por vía IDE, que el observado en ratones vacunados a través de la vía IM. Concluimos que la administración de IDE mejora la eficacia protectora de la vacuna TcVac1 en ratones y que la dosis efectiva de la vacuna M-TcVac1 a través de la electroporación intradérmica es de 10 µg de ADN plasmídico, sin adyuvantes, con una sola aplicación, mostrando una mayor inmunogenicidad y control de los nidos parasitarios. Finalmente, el uso de la tecnología aplicada en la determinación de lesiones histológicas fue de gran éxito en la obtención de datos cuantitativos y sin el margen de error humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aparicio-Burgos JE, Ochoa-García L, Zepeda-Escobar JA, Gupta S, Dhiman M, Martínez JS, de Oca-Jiménez RM, Arreola MV, Barbabosa-Pliego A, Vázquez-Chagoyán JC, Garg NJ (2011) Testing the Efficacy of a Multi-Component DNA-Prime/DNA-Boost Vaccine against *Trypanosoma cruzi* Infection in Dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1050 . doi: 10.1371/journal.pntd.0001050
- Aparicio-Burgos JE, Zepeda-Escobar JA, de Oca-Jimenez RM, Estrada-Franco JG, Barbabosa-Pliego A, Ochoa-García L, Alexandre-Aguilar R, Rivas N, Peñuelas-Rivas G, Val-Arreola M, Gupta S, Salazar-García F, Garg NJ, Vázquez-Chagoyán JC (2015) Immune Protection against *Trypanosoma cruzi* Induced by TcVac4 in a Canine Model. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003625 . doi: 10.1371/journal.pntd.0003625
- Best SR, Peng S, Juang C-M, Hung C-F, Hannaman D, Saunders JR, Wu T-C, Pai SI (2009) Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8+ T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery. *Vaccine* 27:5450–5459 . doi: 10.1016/j.vaccine.2009.07.005
- Bhatia V, Garg NJ (2008) Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clin Vaccine Immunol* 15:1158–1164 . doi: 10.1128/CVI.00144-08
- Bhatia V, Garg NJ, Sinha M, Luxon B, Garg NJ, Aparicio-Burgos JE, Ochoa-García L, Zepeda-Escobar JA, Gupta S, Dhiman M, Martínez JS, de Oca-Jiménez RM, Arreola MV, Barbabosa-Pliego A, Vázquez-Chagoyán JC, Garg NJ, Díaz-Albiter HM, Ochoa-García L, Aparicio-Burgos E, López-Heydeck SM, Velásquez-Ordoñez V, Fajardo-Muñoz RC, Díaz-González S, De Oca-Jimenez RM, Barbosa-Mireles M, Guzmán-Bracho C, Estrada-Franco JG, Garg NJ, Vázquez-Chagoyán JC (2011) *Trypanosoma cruzi* circulating in the southern region of the State of Mexico (Zumpahuacan) are pathogenic: a dog model. *PLoS Negl Trop Dis* 5:390–5 . doi: 10.1371/journal.pntd.0001050
- Bhatia V, Sinha M, Luxon B, Garg N (2004) Utility of the *Trypanosoma cruzi* Sequence Database for Identification of Potential Vaccine Candidates by In Silico and In Vitro Screening. *Infect Immun* 72:6245–6254 . doi:

10.1128/IAI.72.11.6245-6254.2004

- Bolhassani A, Khavari A, Oraf Z (2014) Electroporation – Advantages and Drawbacks for Delivery of Drug, Gene and Vaccine. In: Application of Nanotechnology in Drug Delivery. InTech, p 13
- Bolhassani A, Rafati S (2011) Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy and Vaccine Development. In: Non-Viral Gene Therapy. InTech
- Bråve A, Nyström S, Roos A-K, Applequist SE (2011) Plasmid DNA vaccination using skin electroporation promotes poly-functional CD4 T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 89:492–496 . doi: 10.1038/icb.2010.109
- Brener Z (1986) Why vaccines do not work in chagas disease. *Parasitol Today* 2:196–197 . doi: 10.1016/0169-4758(86)90193-6
- BRENER Z (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 4:389–96 . doi: <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/revista/vol04/389-396.pdf>
- Brodskyn C, Silva A, Takehara H, Mota I (1989) IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Cell Biol* 67:343–348 . doi: 10.1038/icb.1989.50
- Cazorla SI, Frank FM, Becker PD, Corral RS, Guzmán C a., Malchiodi EL (2008) Prime-boost immunization with cruzipain co-administered with MALP-2 triggers a protective immune response able to decrease parasite burden and tissue injury in an experimental *Trypanosoma cruzi* infection model. *Vaccine* 26:1999–2009 . doi: 10.1016/j.vaccine.2008.02.011
- Cazorla SI, Frank FM, Malchiodi EL (2009) Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Rev Vaccines* 8:921–35 . doi: 10.1586/erv.09.45
- 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1:159–218 . doi: 10.1590/S0074-02761909000200008
- Combadiere B, Liard C (2011) Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin* 7:811–827 . doi: 10.4161/hv.7.8.16274

- Costales J, Rowland EC (2007) A ROLE FOR PROTEASE ACTIVITY AND HOST-CELL PERMEABILITY DURING THE PROCESS OF TRYPANOSOMA CRUZI EGRESS FROM INFECTED CELLS. *J Parasitol* 93:1350–1359 . doi: 10.1645/GE-1074.1
- Coura JR, Borges-Pereira J (2012) Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 45:286–296 . doi: 10.1590/S0037-86822012000300002
- Daemi A, Bolhassani A, Rafati S, Zahedifard F, Hosseinzadeh S, Doustdari F (2012) Different domains of glycoprotein 96 influence HPV16 E7 DNA vaccine potency via electroporation mediated delivery in tumor mice model. *Immunol Lett* 148:117–125 . doi: 10.1016/j.imlet.2012.10.003
- Eduardo Montalvo C (2010) TÉCNICA HISTOLÓGICA. 1–12
- El-Sayed NM (2005) The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* (80-) 309:409–415 . doi: 10.1126/science.1112631
- Faurie C, Golzio M, Phez E, Teissié J, Rols M-P (2005) Electric Field-Induced Cell Membrane Permeabilization and Gene Transfer: Theory and Experiments. *Eng Life Sci* 5:179–186 . doi: 10.1002/elsc.200420068
- Forés R, Sanjuán I, Portero F, Ruiz E, Regidor C, López-Vélez R, Linares M, Gil S, Ojeda E, Krsnik I, Bautista G, Vallejo C, García-Marco J, Fernández MN, Cabrera JR (2007) Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39:127–128 . doi: 10.1038/sj.bmt.1705551
- Garg N, Bhatia V (2005) Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Rev Vaccines* 4:867–880 . doi: 10.1586/14760584.4.6.867
- Garg N, Tarleton RL (2002) Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 70:5547–5555 . doi: 10.1128/IAI.70.10.5547-5555.2002
- Gebrekrstos HT, Buekens P (2014) Mother-to-child transmission of *Trypanosoma cruzi*. *J Pediatric Infect Dis Soc* 3:36–40 . doi: 10.1093/jpids/piu059
- Geusebroek J-M, Cornelissen F, Smeulders AWM, Geerts H (2000) Robust

- autofocusing in microscopy. *Cytometry* 39:1–9 . doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(20000101)39:1<1::AID-CYTO2>3.0.CO;2-J
- Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK (2013) Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Vet Pathol* 50:1007–1015 . doi: 10.1177/0300985813485099
- Grant IH (1989) Transfusion-Associated Acute Chagas Disease Acquired in the United States. *Ann Intern Med* 111:849 . doi: 10.7326/0003-4819-111-10-849
- Gupta S, Garg NJ (2010) Prophylactic Efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e797 . doi: 10.1371/journal.pntd.0000797
- Gupta S, Garg NJ (2013) TcVac3 Induced Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Chronic Myocarditis in Mice. *PLoS One* 8:e59434 . doi: 10.1371/journal.pone.0059434
- Gupta S, Smith C, Auclair S, Delgadillo ADJ, Garg NJ (2015) Therapeutic Efficacy of a Subunit Vaccine in Controlling Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease Is Enhanced by Glutathione Peroxidase Over-Expression. *PLoS One* 10:e0130562 . doi: 10.1371/journal.pone.0130562
- Gupta S, Wan X, Zago MP, Martinez Sellers VC, Silva TS, Assiah D, Dhiman M, Nuñez S, Petersen JR, Vázquez-Chagoyán JC, Estrada-Franco JG, Garg NJ (2013) Antigenicity and Diagnostic Potential of Vaccine Candidates in Human Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2018 . doi: 10.1371/journal.pntd.0002018
- Hegazy-Hassan W, Zepeda-Escobar JA, Ochoa-García L, Contreras-Ortíz JME, Tenorio-Borroto E, Barbabosa-Pliego A, Aparicio-Burgos JE, Oros-Pantoja R, Rivas-Santiago B, Díaz-Albiter H, Garg NJ, Vázquez-Chagoyán JC (2019) TcVac1 vaccine delivery by intradermal electroporation enhances vaccine induced immune protection against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* 37:248–257 . doi: 10.1016/j.vaccine.2018.11.041
- Hirao LA, Wu L, Khan AS, Satishchandran A, Draghia-Akli R, Weiner DB (2008) Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine* 26:440–448 . doi: 10.1016/j.vaccine.2007.10.041

- Hotez PJ, Ferris MT (2006) The antipoverty vaccines. *Vaccine* 24:5787–99 . doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.008
- Kuhn RE, Vaughn RT, Herbst GA (1975) The effect of BCG on the course of experimental Chagas' disease in mice. *Int J Parasitol* 5:557–560 . doi: 10.1016/0020-7519(75)90049-1
- KUMAR S, TARLETON RL (1998) The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 20:207–216 . doi: 10.1046/j.1365-3024.1998.00154.x
- Kutzler MA, Weiner DB (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9:776–788 . doi: 10.1038/nrg2432
- Li L, Petrovsky N (2016) Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines* 15:313–329 . doi: 10.1586/14760584.2016.1124762
- Lin F, Kichaev G, Mendoza JM, Yang M, Armendi P, Kobinger GP, Bello A, Khan AS, Broderick KE, Sardesai NY (2012a) Optimization of Electroporation-Enhanced Intradermal Delivery of DNA Vaccine Using a Minimally Invasive Surface Device. *Hum Gene Ther* 168:157–168 . doi: 10.1089/hgtb.2011.209
- Lin F, Shen X, Kichaev G, Mendoza JM, Yang M, Armendi P, Yan J, Kobinger GP, Bello A, Khan AS, Broderick KE, Sardesai NY (2012b) Optimization of Electroporation-Enhanced Intradermal Delivery of DNA Vaccine Using a Minimally Invasive Surface Device. *Hum Gene Ther Methods* 23:157–168 . doi: 10.1089/hgtb.2011.209
- Liu MA, Ulmer JB (2005) Human Clinical Trials of Plasmid DNA Vaccines. In: *Advances in Genetics*. pp 25–40
- Lopes ER, Chapadeiro E, Andrade ZA, Almeida H de O, Rocha A (1981) Anatomia patológica de corações de chagásicos assintomáticos falecidos de modo violento. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76:189–197 . doi: 10.1590/S0074-02761981000200010
- LÚCIA PEREIRA-CHIOCCOLA V, COSTA F, RIBEIRÃO M, SOARES IS, ARENA F, SCHENKMAN S, RODRIGUES MM (1999) Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as

- naked DNA or recombinant protein. *Parasite Immunol* 21:103–110 . doi: 10.1046/j.1365-3024.1999.00201.x
- Machado FS, Jelicks LA, Kirchoff L V., Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho ACC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB (2012) Chagas Heart Disease. *Cardiol Rev* 71:1 . doi: 10.1097/CRD.0b013e31823efde2
- Manning-Cela R, Cortés A, González-Rey E, Van Voorhis WC, Swindle J, González A (2001) LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 69:3916–3923 . doi: 10.1128/IAI.69.6.3916-3923.2001
- Marinho CRF, Bucci DZ, Dagli MLZ, Bastos KRB, Grisotto MG, Sardinha LR, Baptista CRGM, Penha Goncalves C, Lima MRD, Alvarez JM (2004) Pathology Affects Different Organs in Two Mouse Strains Chronically Infected by a *Trypanosoma cruzi* Clone: a Model for Genetic Studies of Chagas' Disease. *Infect Immun* 72:2350–2357 . doi: 10.1128/IAI.72.4.2350-2357.2004
- Menezes H (1965) [Use of adjuvants in the vaccination of mice with *Trypanosoma cruzi*. II]. *Rev Bras Med* 22:536–8
- Miyahira Y, Takashima Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Takeuchi T, Ohyanagi-Hara M, Yoshida A, Ohwada A, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Ogawa H (2005) Immune Responses against a Single CD8+-T-Cell Epitope Induced by Virus Vector Vaccination Can Successfully Control *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infect Immun* 73:7356–7365 . doi: 10.1128/IAI.73.11.7356-7365.2005
- Monie A, Tsen S-WD, Hung C-F, Wu T-C (2009) Therapeutic HPV DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 8:1221–1235 . doi: 10.1586/erv.09.76
- Mumper RJ, Ledebur HC (2001) Dendritic Cell Delivery of Plasmid DNA: Applications for Controlled Genetic Immunization. *Mol Biotechnol* 19:079–096 . doi: 10.1385/MB:19:1:079
- Ochoa L (1999) Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Nom-062-Zoo 1–58
- Pan CH, Chen HW, Tao MH (1999) Modulation of immune responses to

DNA vaccines by codelivery of cytokine genes. *J Formos Med Assoc* 98:722–9

Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R (2010) Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother* 1:87 . doi: 10.4103/0976-500X.72350

Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA (1994) Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci* 91:9519–9523 . doi: 10.1073/pnas.91.20.9519

Ribeirao M, Lúcia V, Ferguson P-C, Rénia L, Fragata Filho AA, Schenkman S, MRodrigues M (2000) Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol* 22:49–53 . doi: 10.1046/j.1365-3024.2000.00260.x

Rodrigues MM, Alencar BC de, Claser C, Tzelepis F, Silveira EL, Haolla FA, Dominguez MR, Vasconcelos JR (2009) Swimming against the current: genetic vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:281–287 . doi: 10.1590/S0074-02762009000900037

Rodriguez-Morales AJ (2008) Chagas disease: an emerging food-borne entity? *J Infect Dev Ctries* 2:149–50

Rojo-Medina J, Ruiz-Matus C, Salazar-Schettino PM, González-Roldán JF (2018) Enfermedad de Chagas en México. *Gac M* México 154:605–612 . doi: 10.24875/GMM.18004515

Rowland EC, Sibley-Phillips S (1984) Bone Marrow Eosinophil Levels in *Trypanosoma cruzi* Infected Mice. *J Parasitol* 70:819 . doi: 10.2307/3281771

Salazar Schettino PM, de Haro Arteaga I, Cabrera Bravo M (2005) Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en Mexico. *Medicina (B Aires)* 65:63–69

Schmunis GA (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl:75–85

Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: A Latin American health

problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 115:14–21 . doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003

SOARES MBP, PONTES-DE-CARVALHO L, RIBEIRO-DOS-SANTOS R (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An da Acad Bras Ci?ncias* 73:547–559 . doi: 10.1590/S0001-37652001000400008

Souza FF, Castro-e-Silva O, Marin Neto JA, Sankarankutty AK, Teixeira AC, Martinelli ALC, Gaspar GG, Melo L, Figueiredo JFC, Romano MMD, Maciel BC, Passos ADC, Rossi MA (2008) Acute Chagasic Myocardopathy After Orthotopic Liver Transplantation With Donor and Recipient Serologically Negative for *Trypanosoma cruzi*: A Case Report. *Transplant Proc* 40:875–878 . doi: 10.1016/j.transproceed.2008.02.032

Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (1993) Tropical disease research : progress 1991-92 : eleventh programme report of the UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: World Health Organization

Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA (1997) Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. McGraw-Hill

Sullivan NL, Eickhoff CS, Sagartz J, Hoft DF (2015) Deficiency of Antigen-Specific B Cells Results in Decreased *Trypanosoma cruzi* Systemic but Not Mucosal Immunity Due to CD8 T Cell Exhaustion. *J Immunol* 194:1806–1818 . doi: 10.4049/jimmunol.1303163

Tworowski K (2010) Molecular Pathology in Drug Discovery and Development.

Velasco-Castrejón O, Guzmán-Bracho C [Importance of Chagas disease in Mexico]. *Rev Latinoam Microbiol* 28:275–83

Velasco-castrejón Ó, Rivas-sánchez B (2008) Apuntes para la historia de Chagas en México. 65:

Warren TL, Weiner GJ (2000) Uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vaccine development. *Curr Opin Hematol* 7:168–73

WHO (2017) Chagas disease (American trypanosomiasis). In: world Heal. Organ. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Accessed 7 Mar 2018

- Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ, Ulmer JB (2000) Increased DNA Vaccine Delivery and Immunogenicity by Electroporation In Vivo. *J Immunol* 164:4635–4640 . doi: 10.4049/jimmunol.164.9.4635
- Zeledón R, Dias JC, Brilla-Salazar A, de Rezende JM, Vargas LG, Urbina A Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist? *Rev Soc Bras Med Trop* 21:15–20
- Zhou Y, Fang F, Chen J, Wang H, Chang H, Yang Z, Chen Z (2008) Electroporation at Low Voltages Enables DNA Vaccine to Provide Protection against a Lethal H5N1 Avian Influenza Virus Challenge in Mice. *Intervirology* 51:241–246 . doi: 10.1159/000156483