



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**INMUNIZACIÓN CON UNA VACUNA HETERÓLOGA,
ADN/PROTEÍNA RECOMBINANTE (TCVAC2),
COMO ALTERNATIVA EN LA PROFILAXIS DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS EN UN MODELO CANINO**

T E S I S

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

PRESENTA:

M.V.Z. JOSÉ ANTONIO ZEPEDA ESCOBAR

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**INMUNIZACIÓN CON UNA VACUNA HETERÓLOGA,
ADN/PROTEÍNA RECOMBINANTE (TCVAC2),
COMO ALTERNATIVA EN LA PROFILAXIS DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS EN UN MODELO CANINO**

T E S I S

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

PRESENTA:

M.V.Z. JOSÉ ANTONIO ZEPEDA ESCOBAR

COMITÉ DE TUTORES:

PH. D. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN

DR. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

DR. JOSÉ GUILLERMO ESTRADA FRANCO

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO 2013

El siguiente trabajo forma parte del proyecto de investigación titulado ““Testing DNA Vaccine Against *T. cruzi* Large Animal Model (Dogs)” con financiamiento externo (UTMB) con clave 2681/2008E”.

AGRADECIMIENTOS

A la UAEM y la Secretaría de Investigación

Por brindar un espacio académico, en el cual desarrollar habilidades y adquirir conocimientos para alcanzar las metas fijadas.

Al CONACyT

Por la beca proporcionada durante el período de estudios de Maestría.

A mi esposa

Por su apoyo incondicional, comprensión y paciencia.

Al equipo de trabajo CIESA – UAEM

José Esteban Aparicio Burgos

Viridiana Camacho Sierra

César González

Laucel Ochoa García

Lidia Serrano Jaimes

Por la colaboración brindada durante el desarrollo de los trabajos encaminados a la realización de los objetivos planteados.

A mis asesores

Dr. Alberto Barbabosa Pliego

Dr. José Guillermo Estrada Franco

Por el apoyo brindado en la realización del proyecto.

A mi tutor

Ph. D. Juan Carlos Vázquez Chagoyán

Por la guía y el consejo en cada etapa del proceso para la conclusión del proyecto. Sin él no hubiera sido posible.

TÍTULO

Inmunización con una vacuna heteróloga, ADN/Proteína recombinante (TcVac2), como alternativa en la profilaxis de la enfermedad de Chagas en un modelo canino

ÍNDICE GENERAL

TÍTULO.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VI
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. MARCO TEÓRICO.....	7
4.1. La enfermedad.....	7
4.2. El agente etiológico.....	8
4.3. El vector.....	12
4.3.1. Ciclo biológico.....	13
5. ANTECEDENTES.....	15
6. HIPÓTESIS.....	28
7. OBJETIVOS.....	29
7.1. Objetivo general.....	29
7.2. Objetivos específicos.....	29
8. JUSTIFICACIÓN.....	30
9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
9.1. Animales.....	31
9.2. Parásitos y células.....	32
9.3. Inmunización y desafíos.....	32
9.4. Toma de muestras.....	34
9.4.1. Serología.....	34
9.4.1.1. Determinación de anticuerpo por el método ELISA.....	34
9.4.2. Evaluación clínica y electrocardiograma.....	35

9.4.3. Parasitemia.....	35
9.4.4. Xenodiagnóstico.....	35
9.5. Estudios de necropsia e histopatológicos.....	35
10. RESULTADOS.....	36
10.1. ELISA.....	36
10.2. Electrocardiogramas.....	37
10.3. Parasitemia.....	38
10.4. Xenodiagnóstico.....	39
10.5. Hallazgos anatomopatológicos e histopatológicos.....	39
10.5.1. Anatomopatológico.....	39
10.5.2. Histopatológico.....	40
11. ARTÍCULO ENVIADO.....	44
12. DISCUSIÓN.....	80
13. CONCLUSIONES.....	84
14. REFERENCIAS.....	85
15. ANEXOS.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. “Etapas de la enfermedad de Chagas”	8
Tabla 2. “Clasificación taxonómica del <i>Trypanosoma cruzi</i> ”	8
Tabla 3. “Morfología de <i>T. cruzi</i> ”	9
Tabla 4. “Ciclo de vida de <i>Triatoma pallidipennis</i> ”	13
Tabla 5. “Vacunas de ADN contra la enfermedad de Chagas”	18
Tabla 6. “Evolución de las vacunas contra la enfermedad de Chagas”	24
Tabla 7. “Evaluación electrocardiográfica por grupos (calificación final y diagnóstico)”	37
Tabla 8. “Calificación final del análisis anatomopatológico (se evaluaron aspectos generales de la condición del corazón)”	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. “Flujo de migraciones de América latina hacia regiones no endémicas para la enfermedad de Chagas”	6
Figura 2. “Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> ”	9
Figura 3. “Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> ”	11
Figura 4. “Ciclo biológico de <i>Triatoma pallidipennis</i> ”	14
Figura 5. “Planeación del experimento”	33
Figura 6. “Aspectos anatomopatológicos de corazones observados en la necropsia”	40
Figura 7. “Hallazgos histopatológicos en fase aguda”	41
Figura 8. “Hallazgos histopatológicos en fase crónica”	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. “Niveles de IgM antes (A) y después del desafío (B)”	36
Gráfica 2. “Niveles de IgG antes (A) y después del desafío (B)”	36
Gráfica 3. “Comportamiento de los promedios electrográficos por grupos de perros”	38
Gráfica 4. “Medición de los promedios de las parasitemias de los grupos”	38
Gráfica 5. “Porcentaje de triatomos infectados vivos/infectados”	39

1. RESUMEN

La Tripanosomiasis americana también conocida como enfermedad de Chagas es producida por el parásito *Trypanosoma cruzi* el cual puede ingresar al organismo por diversas vías (vectorial y no vectoriales) produciendo en el organismo del hospedero vertebrado una serie de reacciones que van desde los síntomas que produce un resfriado común hasta una enfermedad debilitante que conlleva el riesgo de muerte súbita (Carrada-Bravo 2004a; de Jogna Prat 1997; Diario Oficial de la Federación 2001).

Algunos de los inconvenientes más graves de este padecimiento es que en la actualidad se carece de un tratamiento que sea efectivo e inocuo (Urbina 2010), por otro lado, si bien se ha trabajado en la búsqueda de una vacuna que prevenga los daños ocasionados por *T. cruzi* con resultados esperanzadores, todavía no existe una vacuna capaz de detener la infección (Aparicio-Burgos et al. 2011; Cazorla et al. 2009; Garg and Bhatia 2005; Gupta and Garg 2010).

A lo largo de los últimos años se han estudiado diferentes antígenos del *Trypanosoma cruzi* tanto en su estadio extracelular como en su estadio intracelular, además de metodologías de inmunización que exhiben un buen potencial como vacunas, esto se ha hecho de forma experimental *in vivo*, *in vitro* e *in silico* (Bhatia et al. 2004). En este último caso, Bhatia y colaboradores analizaron la base de datos de la secuencia de *T. cruzi* e identificaron 71 candidatos únicos para *T. cruzi*, entre los cuales, ocho eran filogenéticamente conservados en las cepas de *T. cruzi* de importancia clínica. Entre estos últimos, tres (TcG1, TcG2 y TcG4) son expresados en las fases presentes en el hospedero mamífero (Tripomastigote y amastigote) y provocan niveles significativos de anticuerpos líticos en ratón (Bhatia and Garg 2008) por lo que sugieren ser una alternativa importante para su estudio en otras especies, tal es el caso del perro.

Los trabajos realizados en el estudio de los antígenos antes mencionados incluyen desde las vacunas tradicionales con cepas atenuadas del parásito, utilización de otros parásitos emparentados que comparten epítopes antigénicos (*T. rangeli*), hasta las nuevas generaciones de vacunas en las que se encuentran las vacunas génicas y las de proteínas recombinantes (Garg & Bhatia 2005).

Paralelamente se ha trabajado en la selección de adyuvantes para mejorar la respuesta inmune protectora, en estos podemos encontrar proteínas de bacterias como *Mycoplasma*, aluminio, saponina, interleucinas, entre muchos otros (Cazorla, Frank, & Malchiodi 2009).

En lo referente a las vacunas de nueva generación se ha demostrado que las compuestas de ADN son capaces de ofrecer protección ante un desafío con cepas patógenas de *T. cruzi*, además, se ha demostrado que cuando se inmuniza con ADN utilizando un antígeno específico, y se administra posteriormente un refuerzo con el mismo antígeno pero como proteína recombinante, se estimula la respuesta inmunitaria humoral y celular de mejor forma, en comparación con el uso solo de ADN (Mota-Sánchez 2009).

2. ABSTRACT

American trypanosomiasis also known as Chagas' disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* which can enter the body through various means (vector and non-vector) occurring in the body of the vertebrate host a series of reactions ranging from symptoms that produces a common cold to a debilitating condition that carries the risk of sudden death (Carrada-Bravo 2004a of Jogna Prat 1997 Official Journal of the Federation 2001).

Some of the most serious drawbacks of this condition is that at present no treatment that is effective and safe (Urbina 2010), on the other hand, while we worked on finding a vaccine to prevent damage from *T. cruzi* with encouraging results, there is still no vaccine to stop the infection (Aparicio-Burgos et al. 2011; Cazorla et al. 2009; Garg and Bhatia 2005; Gupta and Garg 2010).

Over recent years the study of different *T. cruzi* antigens in both their extracellular stage in its stadium as intracellular, also immunization methodologies exhibiting good potential as vaccines, this has been done experimentally *in vivo*, *in vitro* and *in silico* (Bhatia et al. 2004). In the latter case, Bhatia et al analyzed the database sequence of the *T. cruzi* and identified 71 candidates only for *T. cruzi*, of which eight were phylogenetically conserved among strains of *T. cruzi* clinically important. Among these, three (TCG1, TcG2 and TcG4) are expressed in the phases present in the mammalian host (trypomastigote and amastigote) and cause significant levels of lytic antibodies in mice (Gupta & Garg 2010) suggest therefore be an important alternative for study in other species, as in the case of the dog.

The work done in the study of the above antigens ranging from traditional vaccines with attenuated strains of the parasite, using other related parasites that share antigenic epitopes (*T. rangeli*), until the new generation of vaccines that are in vaccines gene and the recombinant proteins (Garg & Bhatia 2005).

Parallel work has been done in the selection of adjuvants to enhance protective immune responses, these can be found in bacteria such as *Mycoplasma* proteins, aluminum, saponin, cytokines, among many others (Cazorla, Frank & Malchiodi 2009).

In terms of new generation vaccines has shown that DNA composite are able to provide protection against a challenge with pathogenic strains of *T. cruzi* also been shown that when immunized with

DNA using a specific antigen, and later given a booster with the same antigen but as recombinant protein, stimulates the immune response of humoral and cellular better way, compared with the use DNA alone (Mota-Sanchez 2009).

3. INTRODUCCIÓN

A pesar de que la Tripanosomiasis Americana ha sido ampliamente estudiada desde su descubrimiento en 1909 (Chagas 1909) todavía representa un problema muy grave de salud pública en América, debido en parte a los altos costos que representa el control del vector; así como a los tratamientos largos y con efectos adversos, y a la falta de una vacuna que brinde una profilaxis efectiva.

La importancia de la enfermedad de Chagas radica en la asociación de diversos factores, que incluyen sociales, culturales, políticos y económicos (Mitelman JE 2012); además, de los relacionados a la salud pública. Lo que convierte a esta enfermedad en uno de los problemas de salud más importantes en el continente americano (López-Ordóñez *et al.* 2009), responsable por la mortalidad de 12,500 casos reportados cada año; 8 millones de personas en Latinoamérica están en riesgo de contraer la enfermedad; la aparición de 41,000 nuevos casos por año (World Organisation Health 2010); y de la presencia de nuevos casos en otras partes del mundo como en España, Italia, Francia, Japón, Australia, solo por mencionar algunos, debido a la migración de personas de zonas endémicas a zonas no endémicas, esto se ilustra en la Figura 1 (Schmunis 2007;World Organisation Health 2010).

Los gastos derivados por la enfermedad de Chagas son muy elevados, tanto que el banco mundial la ha catalogado en el cuarto lugar de las patologías que causa más pérdidas económicas, solo por detrás de las enfermedades agudas, las diarreas y el VIH/SIDA; considerando la morbilidad medida en años de vida perdidos por discapacidad, debido a que los más afectados por sus complicaciones y consecuencias son los hombres y mujeres entre 30 y 40 años, los cuales ven limitada su capacidad laboral y su calidad de vida (Mitelman J and Giménez L 2012;World Bank 1993).

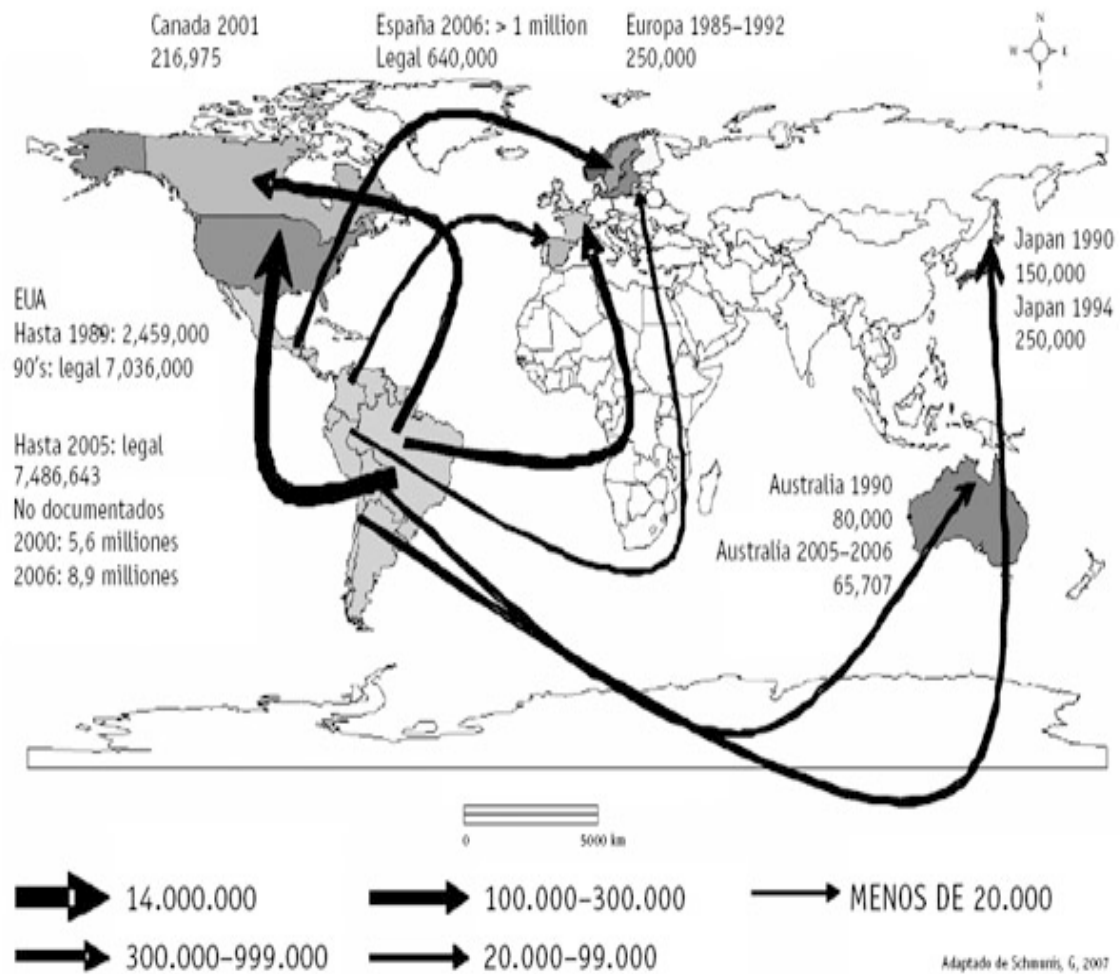


Figura 1. "Flujo de migraciones de América latina hacia regiones no endémicas para la enfermedad de Chagas" (Schmunis, G.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. La enfermedad

La Tripanosomiasis Americana también llamada enfermedad de Chagas entre otros nombres más (Godínez 2012), es el resultado de la infección del parásito *Trypanosoma cruzi*, un protozoo, hemoflagelado que pertenece al Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae; de forma natural, la infección es transmitida a través de la contaminación de mucosas o laceraciones en la piel a partir de las deyecciones de chinches hociconas, hematófagas del género *Triatoma spp*, Familia *Reduviidae*, Subfamilia *Triatominae* (triatominos) (Carrada-Bravo 2004b). Dependiendo en donde circulen estos vectores se pueden diferenciar tres ciclos: doméstico (cuando los triatominos se encuentran dentro de las casas y participan humano y animales); peridoméstico (los triatominos circulan en los alrededores de las casas y participan hospederos como perros, gatos y roedores); y silvestre (se presenta alejado de asentamientos humanos y con la participación exclusiva de reservorios silvestres -marsupiales y roedores principalmente-) (Guzmán-Bracho 2001). Además de la transmisión vectorial, la infección puede ocurrir a través de la transfusión de sangre y tejidos de donadores infectados, por accidentes de laboratorio y por vía transplacentaria (Guzmán-Bracho 2001), aunque también se ha descrito la infección por la ingestión ya sea de alimentos contaminados o bien en el caso de animales por el consumo de vectores positivos a la enfermedad (TOSO et al. 2011; World Organization Health 2008).

La patogenia de las infecciones adquiridas dependerá por una parte del polimorfismo del parásito, el tropismo, la virulencia, la constitución antigénica y de la dosis de inóculo; y por otra, del hospedero, la constitución genética, el sexo, la edad, la especie, la raza, las infecciones oportunistas, la respuesta inmunológica, la temperatura, el estado nutricional y la dieta (Salazar-Schettino and Marin 2006).

Las formas agudas suelen pasar desapercibidas, excepto por el signo de Romaña y el chagoma de inoculación, presentándose en ocasiones la muerte súbita por falla cardíaca. Las formas crónicas más frecuentes son la miocarditis crónica y/o las megaformaciones (Náquira Velarde *et al.* 2001). Algunos de los signos asociados a las etapas de la enfermedad se muestran en el Tabla 1.

Fase Aguda	Fase Crónica
Fiebre	Alteraciones del sistema nervioso
Reacción inflamatoria alrededor de las células parasitadas	Megaesófago
Dolores de cabeza	Megacolon
Muerte súbita por falla cardíaca	Cardiomegalia
	Alteraciones cardíacas
	Presencia escasa del parásito
	Del 30 al 40% de infectados entran en esta etapa

Tabla 1. "Etapas de la enfermedad de Chagas."

Modificado de (Díaz-Limay *et al.* 2004; Dumonteil 1999; Vega Chirinos and Náquira Velarde 2006).

4.2. El agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un protista de la clase Kinetoplastea, familia Trypanosomatidae, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, dentro de la cual su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta red denominada kinetoplasto. Es un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados.

Reino:	Protista
filo:	Euglenozoa
clase:	Kinetoplastea
Orden:	Trypanosomatida
Género:	<i>Trypanosoma</i>
Especie:	<i>Trypanosoma cruzi</i>

Tabla 2."Clasificación taxonómica del *Trypanosoma cruzi*"

Modificado de (Tanowitz *et al.* 1992).

Durante su ciclo de vida, el parásito presenta tres estadios morfológicamente diferenciados, que involucran cambio de tamaño, de forma y la posición del kinetoplasto en relación con el núcleo: amastigote, epimastigote y tripomastigote (ver Tabla 3 y Figura 2).

Características	Amastigote	Epimastigote	Tripomastigote
Organelo	Kinetoplasto cerca del núcleo	Kinetoplasto cerca del núcleo	Kinetoplasto en extremo posterior
Movimiento	Inmóvil	Móvil	Móvil
Tamaño	1.5-4 micrómetros	20-40 micrómetros	~20 micrómetros
Forma	Redondo	Delgado alargado y fusiforme	Alargado fusiforme
Organelo para movimiento	Sin flagelo	Membrana ondulante y flagelo libre	Flagelo libre
Presencia en el organismo	Intracelular	Extracelular	Extracelular
	Multiplicación en las células del huésped	Vive en el vector	Circula en sangre
	Nidos en tejidos lesionados	Multiplicación en el intestino medio del vector	Invasión de células blanco del huésped

Tabla 3. "Morfología de *T. cruzi*"

Modificado de (Carrada-Bravo 2004a; Náquira Velarde, Huapaya, Espinoza Blanco, & Vega Chirinos 2001; Vega Chirinos & Náquira Velarde 2006).

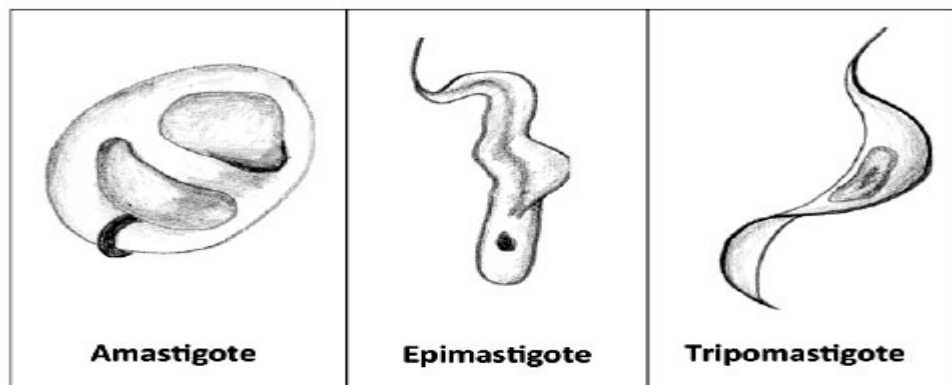


Figura 2. "Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*"
Tomado de (TOSO, VIAL, & GALANTI 2011).

Con respecto al ciclo de vida, el vector después de alimentarse, defeca y con el material excretado las formas infecciosas (tripomastigotes metacíclicos) contenidas en el intestino medio son liberadas. Las formas metacíclicas pasan a las deyecciones del vector, desde donde puede penetrar los tejidos subcutáneos del huésped. El tripomastigote invade las células del huésped desplazándose por medio de la circulación sanguínea para llegar a las células blanco especialmente las del corazón y músculos. Luego de penetrar las células se diferencia otra vez en amastigote. El parásito penetra en los tejidos subcutáneos en los cuales se multiplica en el sistema retículoendotelial y es enseguida fagocitado por los macrófagos del huésped. Cuando se encuentra en la sangre, *T. cruzi* migra hacia las células cardíacas y a las células musculares lisas (tubo digestivo) en donde pierde su flagelo para entrar en el estadio amastigote y se multiplica. Es así como consigue formar un pseudoquiste. Una cantidad de parásitos se diferencian en tripomastigotes para aparecer en la circulación sanguínea e infectar otros tejidos. Si un vector se alimenta de sangre de un sujeto infectado, los tripomastigotes llegan al intestino medio del nuevo vector y se diferencian en epimastigotes para multiplicarse. La población de parásitos aumentada se diferencia en tripomastigotes metacíclicos en el recto del vector en espera de una nueva infección contaminante a través de la defecación (Figura 3.) (de Jogna Prat 1997; Náquira Velarde, Huapaya, Espinoza Blanco, & Vega Chirinos 2001; Ramsey and Schofield 2003; Vega Chirinos & Náquira Velarde 2006).

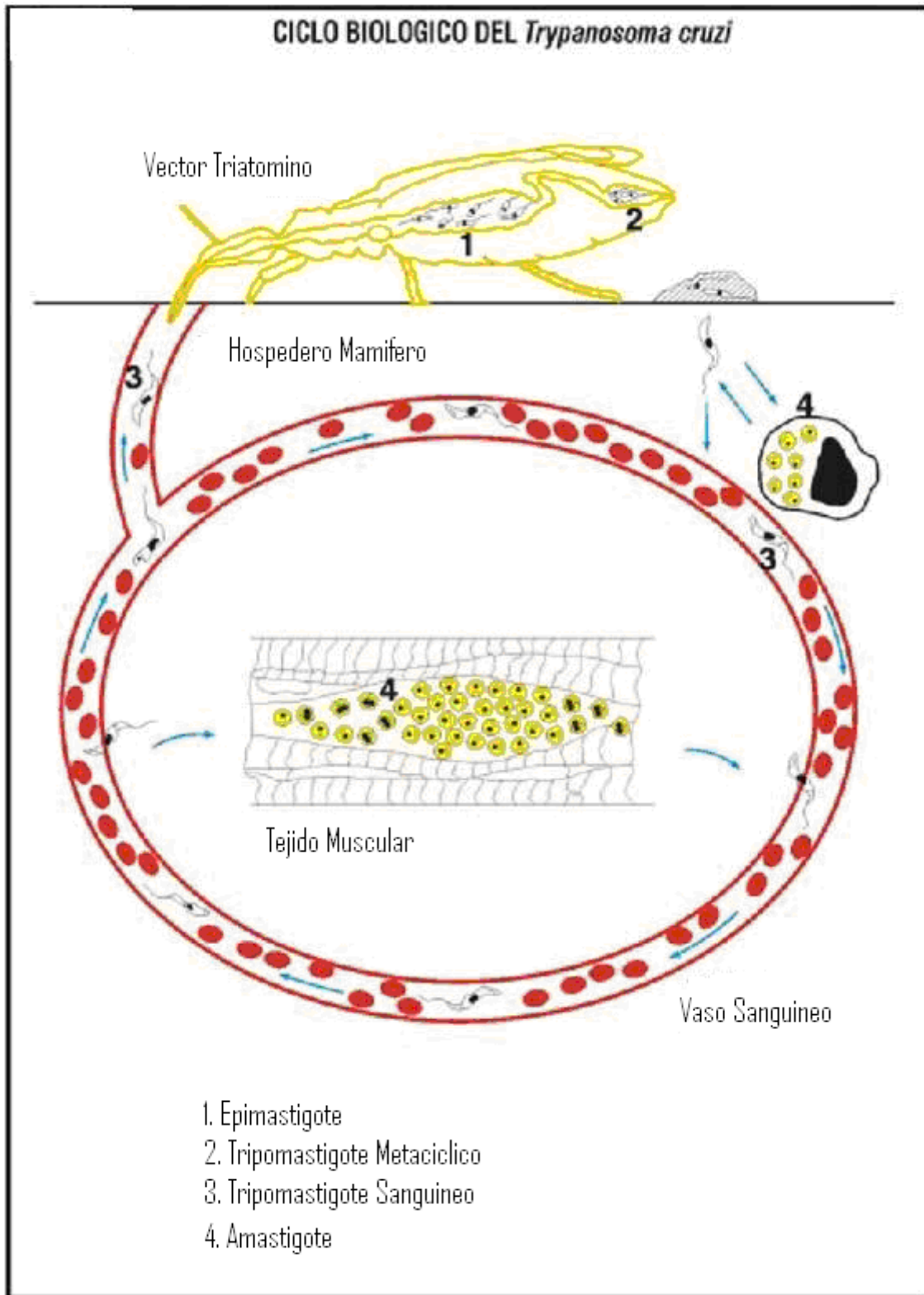


Figura 3. "Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*"
 Modificado de (Náquira Velarde, Huapaya, Espinoza Blanco, & Vega Chirinos 2001).

4.3. El vector

Más del 85% de la transmisión de la enfermedad se lleva a cabo a través del vector denominado chinche besucona, chinche picuda, y una variedad de palabras indígenas como *Pic* (Maya), *Msin* o *bidi* (Zapoteco) (Ramsey *et al.* 2003). Estos insectos se han adaptado de manera paulatina a su alimentación del bosque, luego al peridomicilio y hoy en día lo encontramos en zonas urbanas (intradomiciliario) conviviendo con humanos y animales domésticos (Martínez-Ibarra *et al.* 2001). En México se reconocen de 27 a 31 especies de *Triatoma* hematófagos, incluso hay autores que proponen la existencia de 32 especies, entre éstas, 23 se encuentran distribuidas exclusivamente en territorio mexicano (Espinoza-Gómez *et al.* 2002; Ramsey & Schofield 2003; Zárate and Zárate 1985).

Las especies más importantes en México (en cuestión de transmisión vectorial) mencionadas por Martínez y colaboradores en 2001 son: *Triatoma barberi*, *T dimidiata*, *T pallidipennis*, *T picturata*, *T lecticularia*, *Rhodnius prolixus* y el complejo *T phyllosoma*. Reportándose la aparición de por lo menos alguno de ellas en todo el territorio nacional, siendo la de más presencia *T dimidiata* en las zonas centro y sur de México, *T pallidipennis* en la zona norte (Cruz-Reyes and Pickering-Lopez 2005; Salazar-Schettino & Marin 2006).

Clasificación taxonómica del vector

Reino – Animalia - Animal

Phylum – Artropoda – Patas articuladas

Superclase – Hexapoda – Seis patas

Clase – Insecta - Insectos

Subclase – Pterigota – Insectos con alas

Orden – Hemiptera – Chinchas verdaderas

Familia – Reduviidae – Chinchas asesinas

Genero – *Triatoma* – Chupadoras de sangre, nariz cónica

Especies- *Trypanosoma cruzi*

(Tomado de Iowa State University Entomology).

La subfamilia Triatominae (Reduviidae) contiene numerosas especies que actúan como vectores de la enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*. Todas las especies de triatominos requieren sangre de vertebrados para su desarrollo completo, la mayoría de las especies se alimentan de mamíferos terrestres o arbóreos especialmente didélfidos y roedores; otras se encuentran asociados con murciélagos y algunas con aves (Ramsey *et al.* 2003, INS, 2000; Vega y Náquira, 2005).

Un factor para la colonización, proliferación y mantenimiento de las chinches son las condiciones de edificación de viviendas en las que construcciones las observan hendiduras, rajaduras y grietas, en las paredes y techos de barro o cemento, así mismo en las uniones entre los adobes y ladrillos, los espacios entre tablas, techos de hojas de palmera lo que crean un micro hábitat apropiado por lo que varias especies de triatominos han podido colonizar las habitaciones humanas (Ramsey et al., 2003; Espinoza-Gómez, 2002; Vega y Náquira, 2005).

4.3.1. Ciclo biológico

Los triatominos son insectos hemimetábolos, es decir de metamorfosis incompleta. De cinco estadios ninfales, muy parecidos a los adultos pero carecen de alas y son de menor tamaño (Ramsey et al., 2003), la duración del ciclo de vida es variable dependiendo de la especie y de la disponibilidad de fuente alimenticia. En la mayoría de las especies se completa el ciclo entre 5 y 12 meses en condiciones óptimas (Salazar-Schettino et al., 2006).

Transición de estadio	Días transcurridos
De huevo a 1ª ninfa	35 días
1ª ninfa a 2ª ninfa	37 días
2ª ninfa a 3ª ninfa	48 días
3ª ninfa a 4ª ninfa	56 días
4ª ninfa a 5ª ninfa	59 días
5ª ninfa a Adulto	73 días

Tabla 4. "Ciclo de vida de *Triatoma pallidipennis*"
Modificado de Tay et al., 2008

Huevo

Los huevos son ovipositados entre 5 – 10 días postcópula. Algunas hembras pueden poner huevos no fertilizados. La cantidad de huevos y la frecuencia de oviposición dependen de la cantidad de sangre ingerida. En la mayoría de los casos la hembra pone entre 100 y 600 huevos durante su vida. Los huevos son de forma oval, presentan un opérculo en uno de sus extremos, son de color blanco a rojizo según la edad del embrión. La eclosión varía de 10 – 30 días después de la postura (Ramsey et al., 2003; Salazar-Schettino et al., 2006; Vega y Náquira, 2005; Martínez *et al.*, 2001; Tay et al., 2008).

Ninfa

Presenta cinco estadios ninfales, transcurridos dos o tres días después de eclosionar, las ninfas se pueden alimentar, pueden pasar varias semanas sin hacerlo. En condiciones adecuadas las ninfas pueden ingerir hasta nueve veces su peso, mientras que los adultos de dos a cuatro. Todas las etapas de ninfa, hembras y machos pueden vivir hasta once meses sin ingerir alimento (Ramsey et al., 2003; Salazar-Schettino et al., 2006; Vega y Naquira, 2005; Martínez *et al.*, 2001; Tay et al., 2008).

Adulto

Los triatominos adultos se diferencian de la ninfa por sus alas anteriores y posteriores bien desarrolladas y por ser sexualmente maduros, con genitales completamente desarrollados. La hembra copula una sola vez y después de ser fecundada comienza la postura, se han observado hasta 40 posturas que sobrepasan los 200 huevos. Los adultos tienen un par de ocelos sensibles a la luz en la parte posterior de la cabeza, justo detrás de los ojos. Lo que las ninfas no poseen (Ramsey et al., 2003; Salazar-Schettino et al., 2006; Vega y Náquira, 2005; Martínez *et al.*, 2001; Tay et al., 2008).



Figura 4. Ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis*
Tomado de Tay et al., 2008

5. ANTECEDENTES

Existen diferentes estrategias para el control de la enfermedad de Chagas, entre las que se encuentra, el tamizaje en bancos de sangre. La importancia de este, radica en el hecho de que, en la mayoría de las ocasiones, la infección en zonas no endémicas de la enfermedad es debido a transfusiones sanguíneas, con base en reportes de casos en países como: España, Italia, Japón y Australia (Briceño-León and Galván 2007;Schmunis 2007;World Organization Health 2010). El control se logra con el análisis serológico para la detección de pacientes infectados evitando así la donación de sangre y tejidos de estos individuos (Guzmán-Bracho 2001).

Asimismo, se encuentra el control químico del vector, el cual ha demostrado que es eficaz para bloquear la transmisión vectorial, ejemplo de ello es la iniciativa del cono sur iniciada en 1991 por seis países endémicos a la enfermedad (Uruguay, Chile, Brasil, Argentina, Paraguay y Bolivia) con lo cual se redujo la incidencia en un 70% en niños y adultos jóvenes, además Uruguay y Chile se declararon libres de la transmisión vectorial y transfuncional (Moncayo and Silveira 2009).

En relación a la medicación, se cuenta con quimioterapéuticos nitrofuranos y nitroimidazoles (Nifórtimox y Benznidazol respectivamente) con una eficacia de entre el 60% y 70% de cura en pacientes en fase aguda, pero con un porcentaje más bajo en el caso de los pacientes en fase crónica (Docampo 2001;Michailowsky *et al.* 2003).

Debido a que los esfuerzos empleados hasta ahora distan todavía de resolver la problemática que envuelve a la enfermedad de Chagas, el uso de herramientas profilácticas se presenta como una alternativa (Gupta & Garg 2010) prometedora para minimizar la transmisión, reducir costos, y efectos adversos, con la probabilidad de alcanzar con más eficiencia a individuos de zonas en riesgo.

Desde hace más de 30 años se han realizado esfuerzos en el desarrollo de vacunas para la prevención de la enfermedad, con un éxito limitado. En los últimos diez años, estos esfuerzos se han encaminado al estudio de vacunas a base de proteínas recombinantes y vacunas génicas, basadas en proteínas antigénicas importantes del parásito, tales como: cruzipaina, trans-sialidasas, proteína de superficie de amastigotes y proteína de bastón paraflagelar, entre otras. Más recientemente se han evaluado vectores modificados genéticamente para la expresión de los genes antes mencionados, estos vectores incluyen bacterias y virus. También se han estudiado diversos adyuvantes para modular una respuesta inmune, ya sea, de tipo Th1 o Th2 dependiendo

de varios factores liberados en presencia de las células del sistema inmune al cual se presentan (Cardoni *et al.* 1999). Algunos ejemplos de estos adyuvantes son: CpG-oligodesoxinucleótidos, macrófagos activados, lipopéptido de *Mycoplasma fermentans*, glicolípido alfa-galactosilceramida, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-12, además de otras citocinas y quimiocinas (Cazorla, Frank, & Malchiodi 2009).

A lo largo del tiempo, en lo que a la producción de vacunas se refiere, existen dos estadios del parásito que han sido blanco de los esfuerzos por encontrar la mejor opción para detener la enfermedad, estos son: el tripomastigote, el cual entra al hospedero después de ser contagiado por un triatomino infectado o bien por la exposición a este mediante alguna de las formas de transmisión ya antes mencionadas, el objetivo de las vacunas enfocadas a este estadio, es bloquear la infección de las células diana una vez que el parásito ingresó al organismo; por otro lado, está el estadio de amastigote, en el cual se pretendería detener la propagación del parásito y su posterior ingreso al torrente sanguíneo. Estos dos tipos de objetivos, pretenden frenar o atenuar el desarrollo de la enfermedad, tanto en los humanos como en los reservorios; esto además de beneficiar al individuo infectado, propiciaría la ruptura del ciclo en el que interviene el triatomino, ya que disminuiría la parasitemia y con esto se disminuiría la transmisión vectorial entre humanos y reservorios mamíferos.

La evolución de la investigación en pro de las vacunas contra *T. cruzi* comienza con parásitos muertos o inactivados por calor, parásitos atenuados o bien, fracciones subcelulares del parásito en modelos animales, entre los que se encuentran: ratones, cobayos, perros y monos (Bhatia *et al.* 2009; Garg & Bhatia 2005), estos trabajos utilizaron epimastigotes de *T. cruzi*, lo que propició un limitado éxito en el desarrollo de este tipo de vacunas, ya que en la fase infectiva del parásito (tripomastigote y amastigote) encuentra otros antígenos, además de que se cree que durante la inactivación del parásito se pierden proteínas inmunogénicas (Vázquez-Chagoyán *et al.* 2011).

Más adelante se utilizaron vacunas con parásitos vivos atenuados por diversas vías, entre las que se incluyen: tratamiento con agentes farmacológicos (timerosal, formalina), o bien atenuados mediante pasajes en cultivos celulares, además de bloque de genes potencialmente virulentos mediante knockouts genéticos; estas fueron probadas tanto en ratones como en perros, encontrando buena efectividad en infecciones subsecuentes de cepas virulentas, sin embargo, estas vacunas se juzgaron poco prácticas debido al riesgo que existe de la reversión de estas cepas atenuadas a cepas virulentas o patógenas y comprometer a individuos con deficiencias

inmunológicas (Bhatia, Wen, Zacks, & Garg 2009;Garg & Bhatia 2005). No obstante, estos estudios mostraron que una vacuna capaz de inducir inmunidad protectora con un mínimo de riesgo de reversión biológica a fenotipo virulento sería útil en el control de la infección de *T. cruzi*, además proporcionaron una base para la identificación de los antígenos que son blanco del sistema inmune y con ello el desarrollo de subunidades vacunales (Vázquez-Chagoyán, Gupta, & Jain Garg 2011).

Con las nuevas tecnologías de secuenciación mediante las que se puede conocer la totalidad del genoma del parásito (El-Sayed *et al.* 2005), es viable investigar cuáles de sus proteínas son las más factibles para el desarrollo de vacunas a partir de las subunidades capaces de despertar la respuesta inmune. Con la adquisición de datos sobre los mecanismos de protección inmunes y las características de dianas antigénicas potenciales, los investigadores han dirigido sus esfuerzos de investigación a la identificación de antígenos eficaces y sistemas de administración de antígenos para provocar respuestas inmunes potentes para el control de *T. cruzi* (Vázquez-Chagoyán, Gupta, & Jain Garg 2011).

La mayoría de los estudios de vacunas se han centrado en antígenos derivados de las trans-sialidasas, que es una de las familias más grandes de proteínas del parásito; compuesta de alrededor de 1400 miembros, que representan más del 10% de las proteínas codificadas por los parásitos (El-Sayed, Myler, Bartholomeu, Nilsson, Aggarwal, Tran, Ghedin, Worthey, Delcher, & Blandin 2005). También existe una inmunodominancia muy fuerte de las proteínas trans-sialidasa, lo que resulta en hasta un 30% de IFN- γ secretado por las células T CD8 + que responden a un solo epítotope (Martin *et al.* 2006;Tzelepis *et al.* 2008), lo que representa uno de los más fuertes dominios descrito hasta ahora (Dumonteil 2009).

Vacunas con base en trans-sialidasas y cruzipaína como: ADN, proteína recombinante, y sus combinaciones, han probado ser eficaces como vacunas profilácticas y terapéuticas contra la infección por *T. cruzi* en ratones (Cazorla *et al.* 2008;Dumonteil *et al.* 2004;Garg and Tarleton 2002;Hoft *et al.* 2007;Machado *et al.* 2006;Miyahira *et al.* 2005a;Sanchez-Burgos *et al.* 2007). Una evaluación más profunda de estas vacunas en modelos animales adicionales, tales como perros (Quijano-Hernandez *et al.* 2008) se ha iniciado, proporcionando datos clave para el posterior desarrollo de estas vacunas (Tabla 5) . Sin embargo, como se señaló antes (Martin, Weatherly, Laucella, Cabinian, Crim, Sullivan, Heiges, Craven, Rosenberg, & Collins 2006), no está claro si los antígenos basados en trans-sialidasas son tan buenos candidatos vacunales (Dumonteil 2009).

Modelo experimental	Antígeno	Régimen vacunal	Protección	Referencia
Ratón C57bl/6	ASP-1, ASP-2 and TSA-1 ADN	Profilaxis	Buena	(Garg & Tarleton 2002)
Ratón A/Sn	ASP-2 en varias formulaciones	Profilaxis	Buena	(Araújo <i>et al.</i> 2005; de Alencar <i>et al.</i> 2007)
Ratón C57bl/6 y BALB/C	ASP-2, TS en vector viral	Profilaxis	Buena	(Machado, Cardoso, Claser, Rodrigues, Gazzinelli, & Bruna-Romero 2006)
Ratón C57bl/6	Epítotope de TSSA CD8+ T en vector viral	Profilaxis	Buena	(Miyahira, Takashima, Kobayashi, Matsumoto, Takeuchi, Ohyanagi-Hara, Yoshida, Ohwada, Akiba, & Yagita 2005a)
Ratón BALB/C	TS en proteína recombinante y ADN	Profilaxis	Buena	(Hoft, Eickhoff, Giddings, Vasconcelos, & Rodrigues 2007)
Ratón C3H	Cruzipaina en varias formulaciones	Profilaxis	Buena	(Cazorla, Becker, Frank, Ebensen, Sartori, Corral, Malchiodi, & Guzmán 2008)
Ratón BALB/C y CD1	TSA-1, Tc24 en ADN	Terapéutica	Buena	(Dumonteil, Escobedo-Ortegon, Reyes-Rodriguez, Arjona-Torres, & Ramirez-Sierra 2004; Zapata-Estrella <i>et al.</i> 2006)
Ratón BALB/C	Tc52 en ADN	Terapéutica	Buena	(Sanchez-Burgos, Mezquita-Vega, Escobedo-Ortegon, Ramirez-Sierra, Arjona-Torres, Rodrigues, Ouaiissi, & Dumonteil 2007)
Perro	TSA1-Tc24 ADN	Terapéutica	Regular	(Quijano-Hernandez, Bolio-González, Rodríguez-Buenfil, Ramirez-Sierra, & Dumonteil 2008)

Tabla 5. "Vacunas de ADN contra la enfermedad de Chagas"

ASP: Proteína de superficie de Amastigote; Tc24: Antígeno *T. cruzi* de 24 kDa; Tc52: Antígeno *T. cruzi* 52 kDa; TS: Trans-sialidasa; TSA-1: Trans-sialidasa-1; TSSA: Antígeno pequeño de superficie de tripomastigote. Modificado de (Dumonteil 2009).

En lo referente a vacunas de subunidades, estudios iniciales examinaron el potencial de proteínas purificadas de *T. cruzi*, que incluyen: GP90, GP82, GP56, cruzipaína (Cz), bastón del rodete

paraflagelar (PFR), TC52, proteína reguladora del complemento (CRP), entre otras; algunas de las cuales fueron probadas también como proteínas recombinantes (Tabla 6). Muchos de estos antígenos exhibieron una serie de propiedades atractivas como candidatos para vacunas, lo que se expresa abundantemente en la fase infecciosa y en la fase intracelular de *T. cruzi*, además de ser altamente inmunogénicos en la infección natural.

Estos estudios se diseñaron para estimar la eficacia protectora de las vacunas candidatas basándose en la supervivencia de los individuos después del desafío con una infección letal, pronto se hizo claro que las vacunas proteicas fueron más adecuadas para la inducción de respuestas de anticuerpos y no eran eficaces en producir la inmunidad mediada por células, que es esencial para el control de la etapa de un patógeno intracelular. Se acepta generalmente que el uso de un enfoque de vacunación, que presente el antígeno por las vías de la clase I y clase II provoca una respuesta de anticuerpos específica ante este antígeno y la actividad de los linfocitos T cototoxicos podría ser más eficaz contra las fases extracelulares e intracelulares de *T. cruzi*. Por lo tanto, el enfoque de la inmunización de ADN fue favorecido y adoptado fácilmente por su capacidad para producir anticuerpos, citocinas Th1 y de células T CD8 (Donnelly *et al.* 2005; Dumonteil 2007; Huygen 2005) necesarios para el control de *T. cruzi*; además de su facilidad de construcción y producción en los vectores, de la estabilidad del ADN y su capacidad de aumentar la respuesta inmune mediante la co-administración de genes que codifican citocinas.

Varias proteínas de *T. cruzi* se han probado como vacunas de ADN en modelos experimentales, estos incluyen los miembros de la familia trans-sialidasa (por ejemplo TSA1, ASP1, ASP2 y TS), TSSA, KMP11, LYT1, CRP, Cz, PFR y otros). Muchos de estos candidatos fueron identificados como dianas de la respuesta de anticuerpos y células T CD8 o linfocitos T citotóxicos en ratones y seres humanos infectados. Cuando se ensayó como una vacuna de ADN en ratones, estos antígenos provocaron diversos niveles de citocinas Th1, la actividad de linfocitos cototoxicos CD8 y las respuestas de anticuerpos que se correlacionaban con el grado de control de la parasitemia y la supervivencia del ratón ante un desafío de una infección letal (Tabla 6). Teniendo en cuenta que los genes completos se incorporaron en los vectores de ADN, los epítopes fueron capaces de ser presentados por el MHC. En consecuencia, varios de los genes de la prueba (por ejemplo, ASP-2, TSA-1, TSSA y TC24) proporcionaron inmunidad protectora en muchos, aunque no todas las cepas de ratón. Algunas de las vacunas, también bloquearon o disminuyeron las reacciones inflamatorias del músculo esquelético y el corazón, y las necrosis de tejidos en ratones inmunizados (por

ejemplo, ASP-2, TSA-1 y TS), características de la enfermedad de Chagas en su etapa crónica (Vázquez-Chagoyán, Gupta, & Jain Garg 2011) (Tabla 6)

Se ha encontrado que no todos los blancos antigénicos son útiles como vacunas de ADN; por ejemplo, los genes que codifican FCaBP, TCb3, TC13, mucinas y CCL4/MIP-1b, no proporcionaron protección alguna frente a la infección por *T. cruzi* (Fralish and Tarleton 2003; Garcia *et al.* 2008; Katae *et al.* 2002; Roffe. *et al.* 2006), aunque es interesante que FCaBP y TCb3 fueron reconocidos por los linfocitos citotóxicos en ratones infectados y provocó una respuesta inmune mediada por células en ratones cuando se administra como una vacuna de ADN, un hallazgo que implica que la mera estimulación de respuesta de células T CD8 por un antígeno no es indicativo de su potencial de vacuna. Tc13 despertó una respuesta inmune que se asoció con patología en lugar de protección (Garcia, Arnaiz, Esteva, Laucella, Garavaglia, Ibarra, & Ruiz 2008). Por otro lado, los genes que mostraron protección en una cepa de ratón no fueron protectores en otras cepas de ratones. Los ejemplos incluyen ASP1, ASP2 y tSA1 que fueron probados individualmente o en combinación, TSSA (Katae, Miyahira, Takeda, Matsuda, Yagita, Okumura, Takeuchi, Kamiyama, Ohwada, & Fukuchi 2002) y antígeno repetitivo citoplásmico CRA y antígeno repetitivo flagelar FRA (Pereira *et al.* 2005). Todos estos genes proporcionan una mejor protección en ratones C57BL/6 que en ratones Balb/c o ratones C3H, un hallazgo que puede implicar que la restricción genética del huésped también puede contribuir a la ineficacia de las vacunas candidatas. A la inversa, isoformas de ASP-2 y TS, aisladas de cepas de parásitos diferentes, contenían epítopes de reacción cruzada. Sin embargo, la vacunación con ASP-2 y TS despierta inmunidad protectora únicamente de la cepa específica de *T. cruzi* después de una infección desafío (Claser *et al.* 2007; Haolla *et al.* 2009). Estos resultados alertan a la comunidad investigadora a ser cautelosos en la selección de genes / proteínas que tienen variantes de cepas y que en consecuencia no pueden proporcionar protección frente a diversas cepas clínicamente relevantes.

A la vez que se realizan trabajos en pos de la identificación de antígenos candidatos a vacunas, se han probado adyuvantes para mejorar o afectar la respuesta inmune dirigiéndola a la deseada respuesta tipo Th1. El uso de adyuvantes para aumentar la inmunidad protectora contra el *T. cruzi* se remonta a 1965 (Menezes 1965), cuando la saponina, un derivado de la corteza de Quillaja saponaria, se inyectó en ratones para mejorar la eficacia protectora de inmunógenos. Estudios recientes han examinado la utilidad de las citocinas (IL-12), moléculas coestimuladoras (por

ejemplo, GM-CSF, CD40, HSP70) y CpG-ODN para aumentar la respuesta Th1 a las vacunas de los antígenos seleccionados. GM-CSF fue elegido como un adyuvante genético debido a que es una potente citoquina que puede aumentar la capacidad de expresión de antígenos por las células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas. Además, facilita inmunidad mediada por células B y T (Warren and Weiner 2000). IL-12 es una citoquina clave involucrada en la activación y proliferación de células T CD8 y dirige la respuesta inmune al tipo Th1 (Pan *et al.*, 1999). De manera similar, otros adyuvantes fueron elegidos por su capacidad, ya sea para mejorar la inmunidad innata, o para sesgar la respuesta inmune al tipo Th1 a través de diferentes mecanismos (Singh and O'Hagan 2002). IL-12 y GM-CSF, coadministrado como adyuvantes de ADN, mejoró la respuesta de anticuerpos, la actividad de linfocitos T citotóxicos y la secreción de IFN- γ en los ratones inmunizados con solo LYT1 o mezclado con antígeno en plásmidos (por ejemplo, ASP-2, TSA- 1 y TSA-2) (Tabla 6). El aumento de la amplitud y el nivel de respuestas inmunes correlacionadas con una mejor protección contra la infección por *T. cruzi*, quedan en evidencia por el control de la carga parasitaria, tanto en sangre como en tejidos, un aumento de la longevidad y reducción de la inflamación tisular.

Otros estudios realizados mostraban la capacidad para mejorar la inmunogenicidad de la Cruzipaina usando adyuvante de Freund o con la administración de IL-12 (más neutralizante anti-IL-4 de anticuerpos) (Schnapp *et al.* 2002) y CpG-ODN (Frank *et al.* 2003) dio respuestas inmunes mejoradas y sesgadas hacia Th1 con anticuerpos específicos IgG2a, la activación de la IL-2 y / o IFN- γ produciendo macrófagos y una resistencia sustancial a *T. cruzi*, resultando en una supervivencia mayor al 80% en la infección aguda. Sin embargo, un análisis cuidadoso por investigadores también reveló que la inmunización con Cruzipaina generó diversos grados de lesión del tejido cardíaco que depende de los tipos de linfocitos T cooperadores y el adyuvante utilizado, por lo que es evidente la necesidad de establecer adecuadamente la estrategia que se utilizará para la inmunización, así como, el modo de presentación del antígeno y el adyuvante a usar.

Teniendo en cuenta que un aumento en el nivel y la diversidad de las respuestas inmunes específicas para *T. cruzi* podrían mejorar la capacidad protectora de las vacunas, algunos investigadores probaron la inmunización con múltiples genes que codifican miembros de las familias de TS o mucinas. La capacidad de los genes mixtos para provocar respuestas inmunitarias protectoras dependía de (I) la cantidad de un plásmido dado que fuera suficiente para provocar

respuestas protectoras y (II) la cantidad total de ADN que puede ser inyectado sin toxicidad (Vázquez-Chagoyán, Gupta, & Jain Garg 2011). La inmunización con diversas diluciones de miembros de la familia (por ejemplo, TS ASP1, ASP2 y tSA1) con y sin adyuvantes IL-12 y GM-CSF (en rango: 1 ng-33 mg cada uno) mostró que el nivel de resistencia a la infección por *T. cruzi* está relacionado con la cantidad de ADN administrado y mejoró mediante la adición de las citocinas como adyuvantes. La dosis más alta de cada antígeno (total 150 mg de ADN) no produjo toxicidad (Garg and Tarleton 1998) . No se observó un efecto inhibitor sobre la estimulación de antígenos específicos de la respuesta inmune cuando los ratones fueron vacunados con la mezcla de plásmidos, lo que indica que múltiples genes con o sin citocinas como adyuvantes se pueden utilizar en estrategias de inmunización en desarrollo de inmunogenos para el control de la infección por *T. cruzi* .

El nivel de protección contra la infección por *T. cruzi* inducida en ratones inmunizados con una mezcla de miembros de la familia TS, no fue significativamente mejor que la inducida en ratones inmunizados con los miembros individuales de la familia (Fralish & Tarleton 2003;Garg & Tarleton 2002) (Tabla 6). Los intentos para mejorar la eficacia protectora de miembros de la familia de TS con un enfoque de sensibilización con ADN y un refuerzo de proteína, tampoco fueron exitosos (Vasconcelos *et al.* 2003). No se observó protección en los ratones inmunizados con un grupo de genes que codifican miembros de la familia de mucina (Fralish & Tarleton 2003). Los resultados de la mejora de la inmunidad protectora eran pequeños o incluso nulos, con un cóctel de vectores que codifican diferentes antígenos; esto se atribuye al hecho de que los genes de las familias grandes pueden expresar epítopes compartidos que no presentan efectos protectores en ratones.

Mediante el uso de la base de datos de secuencia de *T. cruzi* (El-Sayed, Myler, Bartholomeu, Nilsson, Aggarwal, Tran, Ghedin, Worthey, Delcher, & Blandin 2005), se tiene el potencial de llevar a cabo una evaluación imparcial del genoma de *T. cruzi*, para la identificación de genes de interés. Sofisticados programas bioinformáticos están diseñados para evaluar las funciones de genes con base en las homologías de los genes caracterizados en otros organismos y la presencia de “motifs” de focalización, localización celular, expresión y características funcionales del gen. Estos programas, por lo tanto, ahorran las laboriosas técnicas experimentales que consumen mucho tiempo, permitiendo pasar directamente de la información secuencial a la identificación antigénica objetivo y diseño de vacunas. Bhatia *et al.* (2004) han utilizado herramientas bioinformáticas, junto con una estrategia experimental para identificar los genes que codifican las proteínas

ancladas a GPI o proteínas de superficie secretadas por *T. cruzi* y se han considerado antígenos muy buenos candidatos para el desarrollo de vacunas.

La caracterización molecular y bioquímica de ocho de las secuencias seleccionadas mediante este enfoque, identificaron a tres candidatos (TCG1, TcG2, TcG4) que son secuencias que se conservan en el genoma de las cepas de *T. cruzi* de importancia clínica. Estos se expresan en diferentes etapas de desarrollo del parásito y despiertan inmunidad en varios hospederos. Los candidatos seleccionados fueron reconocidos por anticuerpos líticos y células T CD8 en ratones infectados (Bhatia & Garg 2008) y por anticuerpos en perros y en humanos (observaciones no publicadas). Este estudio validó la hipótesis de que una base de datos con la secuencia de *T. cruzi* y una apropiada estrategia de búsqueda, sería un recurso eficiente para la identificación de candidatos potenciales para la vacuna.

Desde entonces, se ha examinado la eficacia protectora de TCG1, TcG2 y TcG4 (individualmente o en combinación con y sin IL-12 y GM-CSF) como adyuvantes en ratones. Estos datos claramente establecen que la administración de los antígenos despierta una buena inmunidad y la protección contra la infección por *T. cruzi* con los candidatos de manera individual (Bhatia & Garg 2008); adicionalmente, una estrategia de vacunación que incluye una inmunización primaria con estos antígenos, seguida de un refuerzo con los mismos antígenos pero en forma de proteína recombinante (TcVac2), demostró obtener una mejor inmunidad protectora en ratones vacunados (Gupta & Garg 2010) que la administración de estos antígenos en forma únicamente de ADN (TcVac1) (Bhatia & Garg 2008).

Nuestro equipo de trabajo se ha encaminado al desarrollo de vacunas génicas (TcVac1) ADN/ADN dando como resultado una respuesta inmune preferentemente de tipo Th1 (Aparicio-Burgos, Ochoa-García, Zepeda-Escobar, Gupta, Dhiman, Martínez, de Oca-Jiménez, Arreola, Barbabosa-Pliego, & Vázquez-Chagoyán 2011), lo cual nos plantea la necesidad de promover una respuesta tipo Th2 para mejorar la protección conferida por la vacuna de manera más balanceada en perros. Esto se consigue con la estimulación de la respuesta inmune de tipo Th2 adicionando proteínas recombinantes en el protocolo de vacunación (TcVac2) como lo establecido por Gupta y Garg, en el 2010, en otros modelos animales.

Algunos de los trabajos antes descritos se presentan en la siguiente tabla para ejemplificar la evolución de las vacunas contra *T. cruzi* a lo largo del tiempo, mostrando algunos de sus alcances y el grado de éxito de cada una.

Antígeno	Adyuvante (si se usó)	Modelo experimental	% Sobrevivencia (dpi ^a)	Referencia
		cepa Ratón (cepa <i>T. cruzi</i>)		
Vacuna de proteína				
GP90	Saponina	CBA, Marmoset (Y)	60 (100) ^c	(Scott <i>et al.</i> 1985)
GP82	Aluminio o CpG-ODN	Balb/c (CL)	No determinado ^c o 20%	(Eickhoff <i>et al.</i> 2010; Santori <i>et al.</i> 1996)
GP56	Adyuvante de Freund	Swiss-Webster (Y)	40 (12)	(Harth <i>et al.</i> 2006)
Cruzipaina ^b	IL-12, CpG- ODN	C3H/HeN (RA), Balb/c (Tulahuen)	67–80 (60– 100) ^c	(Frank, Petray, Cazorla, Muñoz, Corral, & Malchiodi 2003; Laderach <i>et al.</i> 1996; Schnapp, Eickhoff, Sizemore, Curtiss III, & Hoft 2002)
PFR1, PFR2 ^b	Aluminio, Freund, IL- 12	C57BL/6, Balb/c (Perú)	83–100 (30– 60) ^c	(Luhrs <i>et al.</i> 2003; Miller <i>et al.</i> 1996; Wrightsman <i>et al.</i> 2002; Wrightsman and Manning 2000)
TC52	Aluminio, <i>Bordetella</i> <i>pertusis</i>	Balb/c (Y)	62 (120) ^c	(Ouaissi <i>et al.</i> 2002)
CRP	Adyuvante de Freund	Balb/c (Y)	10 (40) ^c	(Sepulveda <i>et al.</i> 2000)

ASP2	Aluminio, CpG-ODN	A/Sn (Y)	53 (60) ^d	(Araújo <i>et al.</i> 2005)
TS	CpG-ODN	Balb/c (Tul)	100 (84), 80 (48) ^d	(Giddings <i>et al.</i> 2010;Hoft, Eickhoff, Giddings, Vasconcelos, & Rodrigues 2007)
TS mutant engineered	Adyuvante completo de Freund	Balb/c (Tul)	100 (60) ^c	(Fontanella <i>et al.</i> 2008)
Vacunas de ADN				
CRP		C3H/HeJ, Balb/c (Y)	100 (40) ^c	(Sepulveda <i>et al.</i> 2000)
TSA1 ^b	IL-12 p GM- CSF	BALB/c, C3H/HeSnJ, C57BL/6 (Brazil)	60 (140) ^d	(Garg and Tarleton 2002;(Wizel <i>et al.</i> 1998)
ASP1 ^b	IL-12 p GM- CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6 (Brazil)	<60 (140) ^d	(Garg and Tarleton 2002)
ASP2 ^b	IL-12 p GM- CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6 (Brazil)	80 (140) ^{c,f}	Garg and Tarleton (2002)
ASP2		Balb/c (Y)	63 (60) ^{d,f}	(Vasconcelos <i>et al.</i> 2004)
ASP9		Balb/c (Y)	100 (60) ^c	(Boscardin <i>et al.</i> 2003)
ASP-3		A/Sn (Col)	80 (120) ^c	(Silveira <i>et al.</i> 2008)
TSA1		C57BL/6 (Tul)	60 (60) ^c	(Chou <i>et al.</i> 2008)
TSb		Balb/c (Y)	100 (50) ^{c,f}	(COSTA <i>et al.</i> 1998)
TSSA ^b	IL-12, RANK- L	BALB/c, C3H/HeJ, C57BL/ 6, B6 (Tulahuen)	80–100 (40) ^c	(Katae, Miyahira, Takeda, Matsuda, Yagita, Okumura, Takeuchi, Kamiyama, Ohwada, & Fukuchi 2002;Miyahira <i>et al.</i> 2003)
KMP11	HSP-70	Balb/c (Y)	50 (70) ^c	(Planelles <i>et al.</i> 2001)

LYT1	IL-12 p GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)	80 (75)	(Fralish and Tarleton 2003)
FCaBP	IL-12 p GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)	0 (75)	(Fralish and Tarleton 2003)
TCβ3	IL-12 p GM-CSF	C57BL/6 (Brazil)	0 (75)	(Fralish and Tarleton 2003)
PFR2 or PFR3	HSP70	Balb/c (Y)	100 (35) ^{c,f}	(Morell <i>et al.</i> 2006)
TcG1	IL-12 p GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		(Bhatia <i>et al.</i> 2004; Bhatia and Garg 2008)
TcG2	IL-12 p GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		(Bhatia <i>et al.</i> 2004; Bhatia and Garg 2008)
TcG4	IL-12 p GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		(Bhatia <i>et al.</i> 2004; Bhatia and Garg 2008)
TcG1 TcG2 TcG4	IL-12 p GM-CSF	C57BL/6/Sylvio		(Bhatia <i>et al.</i> 2004; Bhatia and Garg 2008)
ASP2 p TSA1	None	A/Sn (Y)	86 (60) ^{c,f}	(Vasconcelos <i>et al.</i> 2004)
ASP1 ASP2 TSA1	IL-12 p GM-CSF	C3H/HeSnJ, C57BL/6 (Brazil)	83 (140) ^c	(Garg and Tarleton 2002)
Miembros de la familia TS		C57BL/6 (Brazil)	75 (75)	(Fralish and Tarleton 2003)
Miembros de la familia de mucinas		C57BL/6 (Brazil)	25 (75)	(Fralish and Tarleton 2003)
pELI-TcT-E		C3H/HeN (RA)	80 (50) ^c	(Tekiel <i>et al.</i> 2009)
Vacunas de virus recombinante				
Ad-TSSA/MVA-TSSA	MVA-RANK-L	C57BL/6 (Tulahuen)	100 (50) ^c	(Miyahira <i>et al.</i> 2005)

rAD-ASP2		Balb/c (Y)	80 (160) ^c	(Machado <i>et al.</i> 2006)
rAD-TS		Balb/c (Y)	50 (160) ^d	(Machado <i>et al.</i> 2006)
rSeV-ASP2		C57BL/6 (Tul)	90 (50) ^d	Duan <i>et al.</i> (2009)
rADASP2 p rAD-TS		Balb/c (Y)	100 (160) ^c	(Machado <i>et al.</i> 2006)
Vacunas inmuno-terapéuticas de ADN				
TSA1 ^b		Balb/c (H4), modelo agudo	70 (45) ^{c,f}	(Dumonteil <i>et al.</i> 2004)
TSA1		CD1 (H1), modelo crónico	100 (140) ^f	(Dumonteil <i>et al.</i> 2004)
TSA1		ICR (H1) modelo agudo	70 (50) ^{c,f}	(Sanchez-Burgos <i>et al.</i> 2007; Zapata-Estrella <i>et al.</i> 2006)
Tc24 ^b		Balb/c, ICR (H1) modelo agudo	100 (50) ^{c,f}	(Sánchez-Burgos <i>et al.</i> 2007)
TS		ICR (H1) modelo agudo	50 (50) ^c	(Sánchez-Burgos <i>et al.</i> 2007)
Tc52		ICR (H1) modelo agudo	75 (50) ^c	(Sánchez-Burgos <i>et al.</i> 2007)
ASP9			50 (50) ^c	(Sánchez-Burgos <i>et al.</i> 2007)
TSA1 + Tc24		C57BL/6, Balb/c, ICR (H1)	80 (180) ^c	(Limon-Flores <i>et al.</i> 2010)
SA85-1.1		C57BL/6 (CL)	Dosis sub-letal (90) ^{d,f}	(Duthie <i>et al.</i> 2007)

Tabla 6. "Evolución de las vacunas contra la enfermedad de Chagas"

a Animales en experimentación fueron observados por n días post-infección.

b Estos antígenos mostraron varios grados de protección en diferentes cepas de ratón (los datos mostrados son de los animales que exhibieron mejor protección).

c-e Una vez los animales fueron desafiados con la infección mostraron niveles de parasitemia muy bajos (-10%) moderados (_50%) o similares a las detectadas en animales no inmunizados/infectados (los datos mostrados son de los animales que exhibieron mejor protección).

f La inmunización con este antígeno fue efectivo en disminuir la severidad de la enfermedad crónica, evaluado por análisis histopatológicos y biopsias de tejido cardíaco.

Tomado de (Vázquez-Chagoyán, Gupta, & Jain Garg 2011)

6. HIPÓTESIS

La inmunización con la candidata a vacuna, ADN/Proteína recombinante (TcVac2), será más eficiente para montar una respuesta inmune capaz de defender al organismo contra una infección experimental con una cepa patógena de *T. cruzi* (Sylvio X 10/4) que TcVac1 en un modelo canino.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar la protección que induce una vacuna candidata que incluye la inmunización con, ADN/Proteína recombinante (TcVac2), contra la infección experimental con *T. cruzi* causante de la enfermedad de Chagas en un modelo canino.

7.2. Objetivos específicos

Evaluar posibles cambios en perros inmunizados y desafiados en:

Parasitemia (microscopia óptica y xenodiagnóstico),

Respuesta inmune celular y humoral,

Estudios electrocardiográficos,

Hallazgos patológicos e histopatológicos,

Signología clínica,

Comparar la vacuna TcVac1 con TcVac2.

8. JUSTIFICACIÓN

Si bien en el área de la inmunización en contra de la enfermedad de Chagas se cuenta con avances importantes y alentadores, en la actualidad se carece de una vacuna que sea efectiva para prevenir los daños provocados por este padecimiento; por otro lado, el costo que puede llegar a alcanzar el tratamiento de esta enfermedad es muy elevado, el Banco Mundial considera a esta patología como la cuarta causa de pérdida económica por la morbilidad que ocasiona, sólo superada por las enfermedades agudas, las diarreicas y el VIH/SIDA. Por lo anterior se hace imperativo encontrar una vacuna que bloquee la enfermedad.

El grupo de investigación ha trabajado en la búsqueda de una vacuna que sirva como alternativa en la profilaxis de la Enfermedad de Chagas con la elaboración del protocolo denominado como TcVac1, el cual plantea una inmunización con plásmidos que contienen genes que codifican para las proteínas TcG1, TcG2 y TcG4 con la adición de un adyuvante comprendido por plásmidos que codifican para IL 12 y GM-CSF y reforzando la inmunización con la misma vacuna, esto con resultados que sugieren que se montó preferentemente una respuesta inmune de tipo Th1, lo que nos plantea la necesidad de estimular una respuesta que incluya de manera equilibrada la respuesta inmune de tipo Th2.

La estrategia de vacunación consistirá en aplicar una vacuna génica a base de plásmidos que expresan los antígenos TcG1, TcG2 y TcG4, utilizando como adyuvantes plásmidos de expresión de las citocinas IL 12 y GM-CSF, seguido de una vacuna de refuerzo a base de proteína recombinante de los mismos antígenos. La primo-inmunización tendrá por objetivo estimular la respuesta inmune tipo Th1 y la vacuna de refuerzo estimular la respuesta tipo Th2 y así producir una respuesta inmunológicamente balanceada que permita eliminar una infección experimental.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de biología molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México, el cual se encuentra situado a una altura de 2660 msnm, entre las coordenadas 19°, 24' latitud norte y 99°, 40' de longitud oeste del meridiano de Greenwich. El CIESA se localiza en el kilómetro 12.5 de la carretera Panamericana en su tramo Toluca–Atlacomulco.

El estudio consta de la evaluación una de la capacidad protectora de una vacuna TcVac2 y se comparó con un control positivo (No inmunizado-Desafiado), un control negativo (No inmunizado-No desafiado) y con la vacuna TcVac1 (Aparicio-Burgos, Ochoa-García, Zepeda-Escobar, Gupta, Dhiman, Martínez, de Oca-Jiménez, Arreola, Barbabosa-Pliego, & Vázquez-Chagoyán 2011);

9.1. Animales

Veintiún perros criollos jóvenes (menores a un año de edad), once machos y diez hembras, divididos de la siguiente manera: seis perros elegidos aleatoriamente integrados en un grupo experimental (TcVac2), seis perros elegidos aleatoriamente integrados en un grupo experimental (TcVac1), seis perros elegidos aleatoriamente conformaron un grupo control positivo, y por último, tres perros elegidos aleatoriamente en un grupo control negativo (no vacunado y no desafiado).

Estos perros fueron incluidos al experimento una que vez se determinaron libres de anticuerpos específicos para *Trypanosoma cruzi* evaluados por las técnicas de haemoaglutinación indirecta (HAI), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y examen de gota gruesa. Antes del inicio del experimento, los animales fueron sometidos a un período de adaptación a las instalaciones y al manejo, además de un entrenamiento para toma de muestra sanguínea y estudios electrocardiográficos y ecocardiográficos. En cuanto al estado de salud, fueron evaluados mediante monitoreo de constantes fisiológicas y seguimiento del comportamiento normal de cada individuo, utilizando las técnicas conducentes de un examen físico general; de manera profiláctica, cada individuo fue desparasitado contra parásitos intestinales, vacunados contra enfermedades infecciosas propias de la región (parvovirus canino, distemper canino, adenovirus canino tipo II, leptospira spp., bordetella bronquiseptica, coronavirus y rabia) y tratados con productos para control de pulgas.

Todos los animales fueron provistos de agua a libre acceso y alimentados de manera individual, con una dieta de alimento comercial de acuerdo a los requerimientos de su talla y estado fisiológico, dividida en dos raciones. Los puntos anteriores, fueron seguidos tomando en cuenta lo establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) referente a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

9.2. Parásitos y células

Los tripomastigotes de la cepa Silvio X 10/4 de *T. cruzi*, para el desafío, fueron mantenidos y propagados en pases continuos en monocapas de células NIH 3T3, en medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino (HyClone, USA) a un pH de 6.8, a 37°C, 5% CO₂ y en una atmósfera saturada de humedad.

9.3. Inmunización y desafíos

La vacunación propuesta como TcVac2 se diseñó con base en un protocolo que involucró una primera inmunización, incluyendo una dosis de antígeno compuesto por plásmidos integrados en un vector de expresión para células de mamífero: para los antígenos TcG1, TcG2 y TcG4 (pCDNA3.TcG1, pCDNA3.TcG2 y pCDNA3.TcG4) (Gupta & Garg 2010) y plásmidos de expresión para interleucina 12 (IL-12) (pCDNA3.1.IL-12), así como, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (pCMV1.GM-CSF) (Saldarriaga *et al.*, 2006) 200 µg de cada uno por perro (Nash *et al.*, 1991), repetida nuevamente transcurridas dos semanas; pasadas otras dos semanas, se aplicaba un refuerzo constituido por proteína recombinante TcG1, TcG2, TcG4 incluyendo 50µg de saponina como adyuvante, finalmente dos semanas después se repetía la dosis de proteína recombinante, para cada uno de los sujetos del grupo experimental, mientras que el grupo control positivo se inmunizó con vectores vacíos. Cada una de las vacunas, se aplicó en una suspensión que contenía todos los antígenos y los adyuvantes en un mililitro, del cual, el 90% fue inyectado de forma intramuscular y el restante 10% por vía intradérmica.

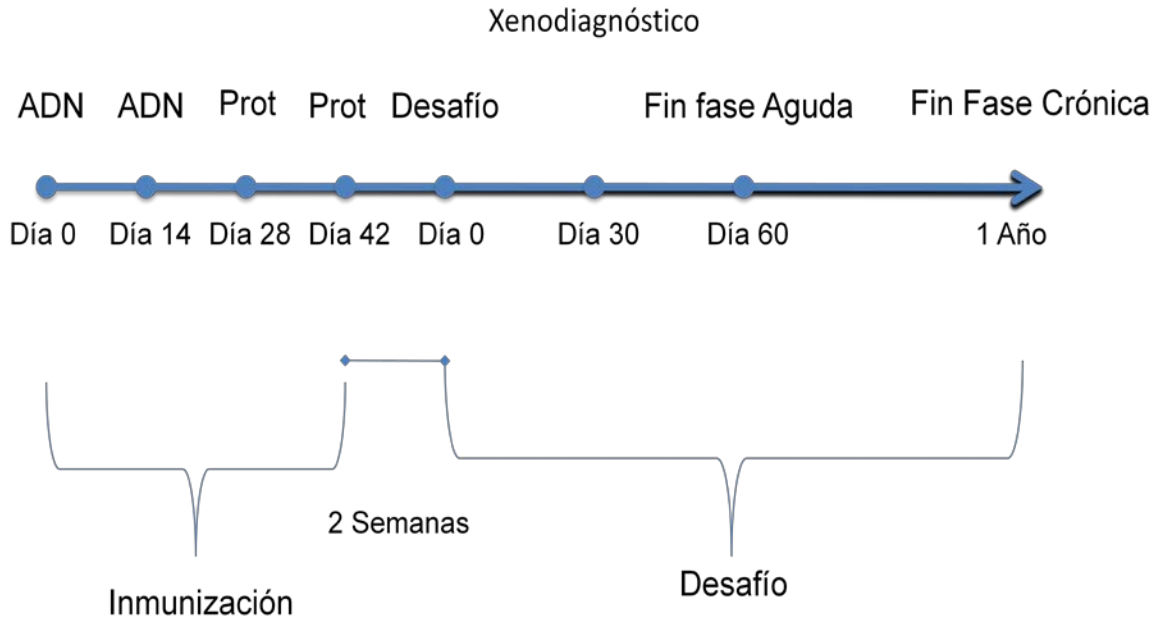


Figura 5. Planeación del experimento

Con los plásmidos recombinantes se transformaron células competentes *E. coli* DH5- α , que se cultivaron en caldo LB (Luria Bertani) con 100 mg / ml de ampicilina y purificados mediante intercambio aniónico de cromatografía usando un de kit Maxi preps de Qiagen (Qiagen, Chatsworth, CA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante; mientras que la interleucina 12 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, fueron donados por el Dr. Peter Melby.

El desafío se realizó dos semanas después de la última inmunización con la inoculación intraperitoneal de una dosis de 3.5×10^3 por kilogramo de peso corporal de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa Sylvio X10/4 producidos y mantenidos mediante consecución de pases en línea celular de células NHI 3T3 (fibroblastos de embrión de ratón).

Una vez desafiados los animales fueron monitoreados diariamente para verificar su estado de salud y a intervalos de dos semanas se realizaron estudios electrocardiográficos y ecocardiográficos para seguir la evolución de la enfermedad.

9.4. Toma de muestras

Aunado a lo descrito anteriormente, previo a cada inmunización, se colectaron muestras de sangre y a intervalos de dos semanas después del desafío para realizar una evaluación serológica, en busca de niveles de anticuerpos a través de las pruebas de ELISA y HAI.

Además, se colectaron muestras de sangre para la cuantificación de parásitos mediante la técnica de gota fresca, iniciando el día cinco post-infección, y cada tercer día (Brener, 1962), continuando así hasta el día cincuenta, posterior a éste, la toma de muestra se realizó cada dos semanas hasta el final del experimento (fase crónica).

9.4.1. Serología

Se obtuvieron 5 mL de sangre por punción de la vena cefálica en tubos vacutainer y cada muestra fue clasificada con un número de identificación y registrada. El suero fue separado de la sangre permitiendo que la muestra coagulara, o bien, mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. Se prepararon alícuotas de 500 µL de suero en tubos Eppendorff de 1.0 mL rotulados con su número de identificación y almacenados en congelación (-20 ° C) hasta su uso.

9.4.1.1. Determinación de anticuerpo por el método ELISA

Las muestras de suero obtenidas se analizaron por el método de ELISA (Barbabosa *et al.*, 2009). Brevemente, los sueros fueron analizados con anticuerpos anti-*T. cruzi* por la prueba de HAI (Polychaco, Laboratorio-Lemos SRL, Buenos Aires, Argentina) y ELISA (Laboratorio-Lemos SRL, Buenos Aires, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. La peroxidasa de suero/caballo (HRP)-lavada con anti-IgG humano en el kit de ELISA fue reemplazada con anticuerpos anti-dog-IgG. El punto de corte para HAI fue una dilución de 1:8 y para ELISA se utilizó el valor de OD 450 nm promedio de 30 sueros negativos \pm 2 desviaciones estándar. Las placas fueron cubiertas con lisado de *T. cruzi*, bloqueado con 5% leche sin grasa, después se aplicó el suero de perro sobre la proteína de la placa lavando el exceso de anticuerpos contenidos en el suero y luego aplicando los anticuerpos de conejo anti perro (todos los anticuerpos fueron de Bethyl Labs). La lectura se hizo en un equipo para microplacas SpectraMax microplate.

9.4.2. Evaluación clínica y electrocardiograma

Las evaluaciones electrocardiografías fueron tomadas a 25 mm / s y 1 mV / cm por 1 minuto, cada dos semanas antes del desafío y después de éste, con el Burdick Stylus, EK-8, USA.

9.4.3. Parasitemia

La parasitemia se determinó cada tercer día a partir del quinto día post infección según Brener 1962, hasta que se hicieron negativos. De cada perro se colectaron 5 µl de sangre, se colocaron en un portaobjetos con cubreobjetos (18 mm x 18 mm) y se observó en un microscopio óptico a 400X.

9.4.4. Xenodiagnóstico

Se utilizaron seis ninfas de *Triatoma longipennis*/perro, y fueron alimentadas al día treinta post infección y evaluadas al día sesenta post alimentación (Basso *et al.* 2007).

9.5. Estudios de necropsia e histopatológicos

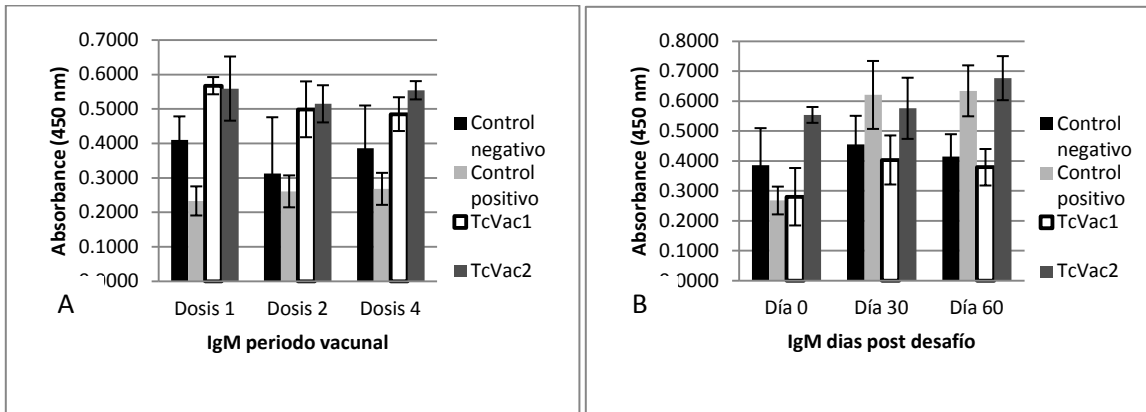
Se realizaron necropsias a los animales que murieron a causa de la infección o que fueron sacrificados humanitariamente, según la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1995), para observar los cambios macroscópicos y microscópicos en los órganos afectados. Los tejidos fueron fijados con formalina al 10 % por 24 horas, deshidratados en etanol e incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor, teñidos con hematoxilina y eosina, y se evaluaron con un microscopio óptico.

10. RESULTADOS

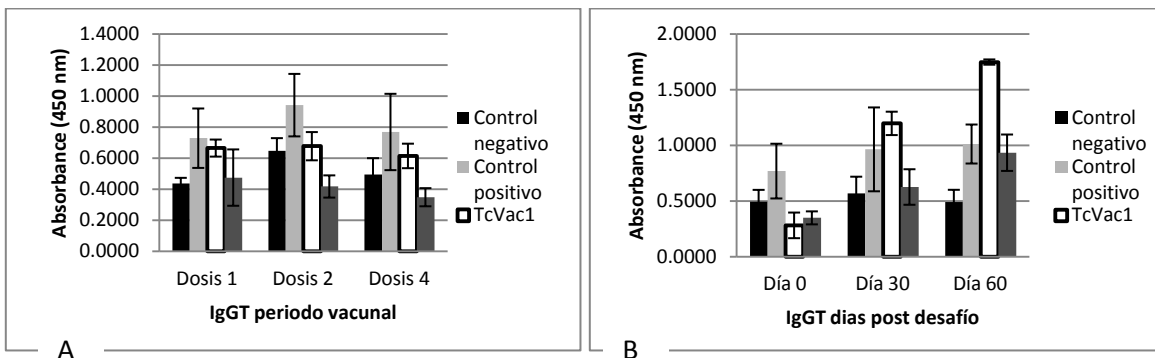
10.1. ELISA

Las muestras fueron colectas antes de cada inmunización y post- infección, para ver el desarrollo de la respuesta de anticuerpos inducida por cada una de las vacunas administradas por la técnica de ELISA. Se evaluaron los cambios en las inmunoglobulinas desde la toma basal (Previo a cualquier tratamiento) hasta el día 60 post- desafío (Ya sea que muriera a causa de la infección o por eutanasia. Todos los perros fueron seronegativos antes de la aplicación de la vacuna. No se presentaron cambios significativos durante el periodo vacunal en ninguno de los grupos, sin embargo, después del desafío se puede apreciar tendencias a favor en los grupos vacunados, a pesar de que no existe diferencia significativas (Gráfica 1A y 2A). No se detectaron niveles de la inmunoglobulina M (IgM) durante el periodo vacunal. En el periodo post- desafío se observa cambios discretos en todos los grupos, sin diferencia significativas (Gráfica 1B). En el grupo Control negativo no se detectaron anticuerpos durante todo el experimento.

Por otro lado, los títulos de anticuerpos IgG se incrementaron considerablemente después de la inmunización, esto se conservaron también durante el periodo post- infección, no se observaron diferencia significativas entre grupos (Gráfica 2B).



Gráfica 1. Niveles de IgM antes (A) y después del desafío (B)



Gráfica 2. Niveles de IgG antes (A) y después del desafío (B)

10.2. Electrocardiogramas

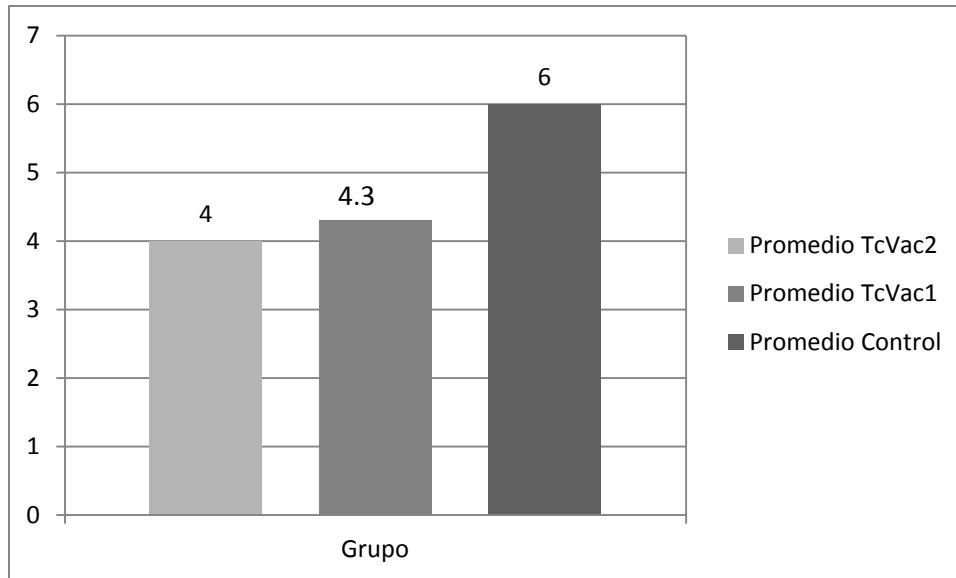
Antes de incluir a cualquier animal en el experimento se verifico su actividad cardiaca mediante el uso del electrocardiograma para asegurar que ninguno de los perros tuviera algún tipo de alteración; al inicio de las inmunizaciones, durante y al final de estas se tomaron pruebas electrocardiográficas a todos los individuos y se les asignó una calificación subjetiva mediante una escala de 0 a 10 (donde 0=normal – 10 = la anormalidad más severa). Después del desafío, los perros vacunado/desafiados y los perros no vacunados/desafiados no mostraron alteraciones electrocardiográficas al día 30, excepto por dos perros que murieron al día 36 y 42 post infección y presentaron una calificación de 7 y 8 respectivamente. El promedio de los grupos después del día 60 para el grupo control negativo fue 0, para el grupo control positivo de 6, para el grupo TcVac1 de 4.3 y finalmente para el grupo TcVac2 fue de 4 (Tabla 7). Las alteraciones encontradas también se describen para cada uno de los perros en la Tabla siguiente.

	Control positivo		TcVac1		TcVac2	
	Evaluación	Diagnóstico	Evaluación	Diagnóstico	Evaluación	Diagnóstico
Perro 1	9	Miocarditis	7	Dilatación ventricular	7	Dilatación ventricular
Perro 2	9	Miocarditis	0	Normal	7	Dilatation ventricular izquierda
Perro 3	9	Pericarditis	8	Problemas de repolarización ventricular	0	Normal
Perro 4	1	normal	2	Normal	4	Dilatación ventricular ligera
Perro 5	0	normal	0	Normal	4	Problemas de repolarización
Perro 6	8	Necrosis, lesión coronaria	9	Pericarditis	2	Problemas de repolarización ligeros
Promedio de grupo	6		4.3		4	

Tabla 7. "Evaluación electrocardiográfica por grupos (calificación final y diagnóstico)"

Adicionalmente a los dos perros que murieron, el grupo TcVac1 tiene un perro más con un problema cardíaco crítico el día 60, y los animales restantes tenían corazones electrocardiográficamente normales. Del grupo de TcVac2 dos perros fueron clasificados como estado crítico y de los animales restantes 2 fueron sólo ligeramente afectado y dos eran prácticamente normal. Del grupo de control cuatro perros se encontraban en estado crítico y los dos restantes fueron electrocardiográficamente normales.

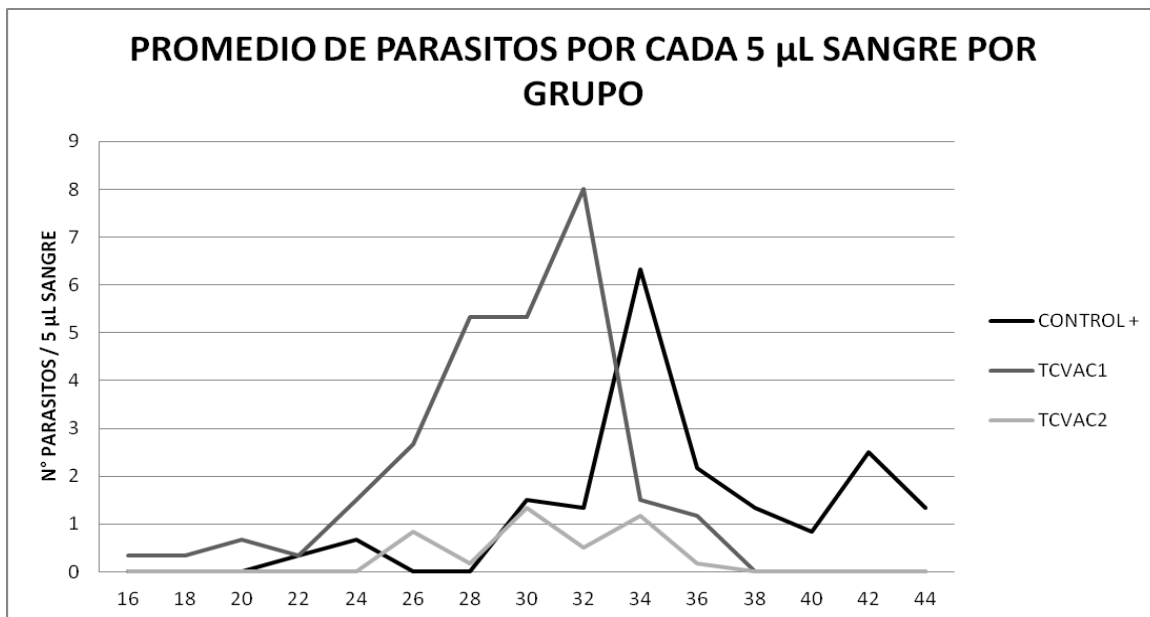
La siguiente gráfica muestra los niveles alcanzados en promedio entre los grupos control positivo, TcVac1 y TcVac2 evidenciando el grado de daño electrocardiográficamente.



Gráfica 3. "Comportamiento de los promedios electrográficos por grupos de perros"

10.3. Parasitemia

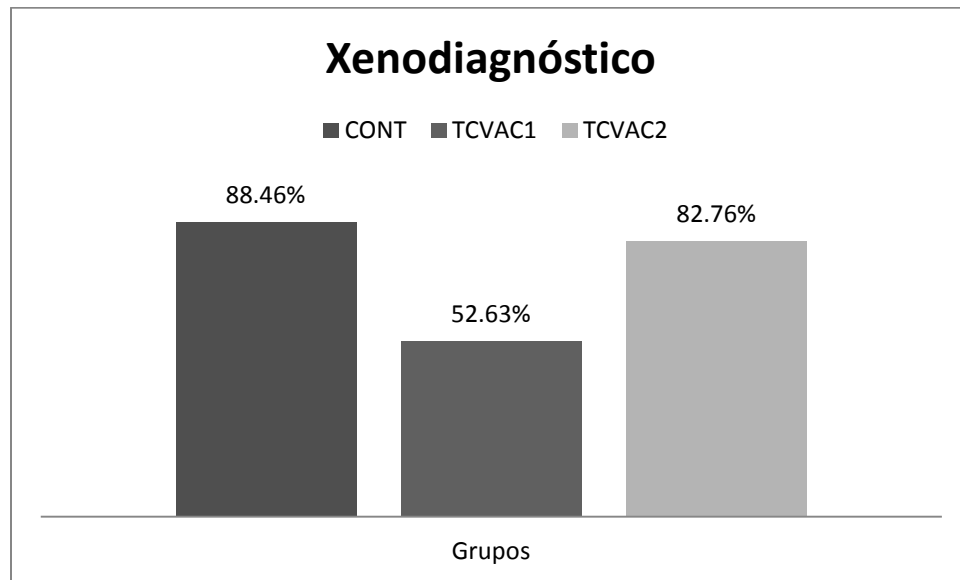
La medición de parasitemia mostró que en todos los perros infectados se pudo detectar cuando menos un parásito, los grupos control positivo y TcVac1 mostraron parasitemias relativamente altas y más prolongadas (22 y 20 días respectivamente) en comparación a las presentadas por el grupo TcVac2 en donde el pico de parasitemia fue más bajo y los días de parasitemia fueron solamente 10 (Gráfica 4).



Gráfica 4. Medición de los promedios de las parasitemias de los grupos

10.4. Xenodiagnóstico

En el xenodiagnóstico la proporción de insectos alimentados al día 60 post-alimentación, se encontró un porcentaje de *Triatoma longipennis* positivas en el grupo control positivo de 88.46 % (23/26) y grupo TcVac1 52.63 % (10/19) y en el grupo TcVac2 de 82.76% (24/29) respectivamente (Gráfica 5). El número entre paréntesis refleja el número de triatominos infectados del total de triatominos alimentados y que sobrevivieron hasta el día del análisis.



Gráfica 5. Porcentaje de triatominos infectados vivos/infectados

10.5. Hallazgos anatomopatológicos e histopatológicos

10.5.1. Anatomopatológico

La mortalidad durante el curso del experimento fue más elevada en el grupo TcVac1 (2/6) mientras que los otros dos grupos no presentaron muertes prematuras, como era de esperarse los animales del grupo control negativo no mostraron alteraciones cardiacas de ningún tipo. Asignamos un valor subjetivo a los hallazgos a la necropsia en una escala de 0 a 10 (donde 0=normal – 10 = la anormalidad más severa) tomando en cuenta los aspectos generales del corazón al ser analizado.

Los animales con mayores afectaciones en fase aguda fueron los del grupo control positivo (4.25) seguido de los grupos TcVac1 y TcVac2 con 3.5 y 3.33 respectivamente, en su fase cónica (365 post infección) todos los perros tenían un corazón en forma ronda aunque los valores en términos generales se comportaron así; el grupo control fue el pero con 3.5, seguido del grupo TcVac2 y finalmente el TcVac1 con 2.41 y 2.08 respectivamente. De manera global el grupo control positivo presento la más alta calificación (más daño) seguida de TcVac2y de TcVac1 respectivamente.

Análisis anatomopatológico			
	Control positivo	TcVac1	TcVac2
Perro 1	4.75	2.25	2.5
Perro 2	2.75	2	4
Perro 3	2.5	2	3.5
Perro 4	5.25	2.75	2.5
Perro 5	3.75	5.75	1.75
Perro 6	4.25	1.25	3
Promedio de grupo	3.87	2.66	2.87
Promedio fase aguda	4.25	3.5	3.33
Promedio fase crónica	3.5	2.08	2.41

Tabla 8. "Calificación final del análisis anatomopatológico (se evaluaron aspectos generales de la condición del corazón)"

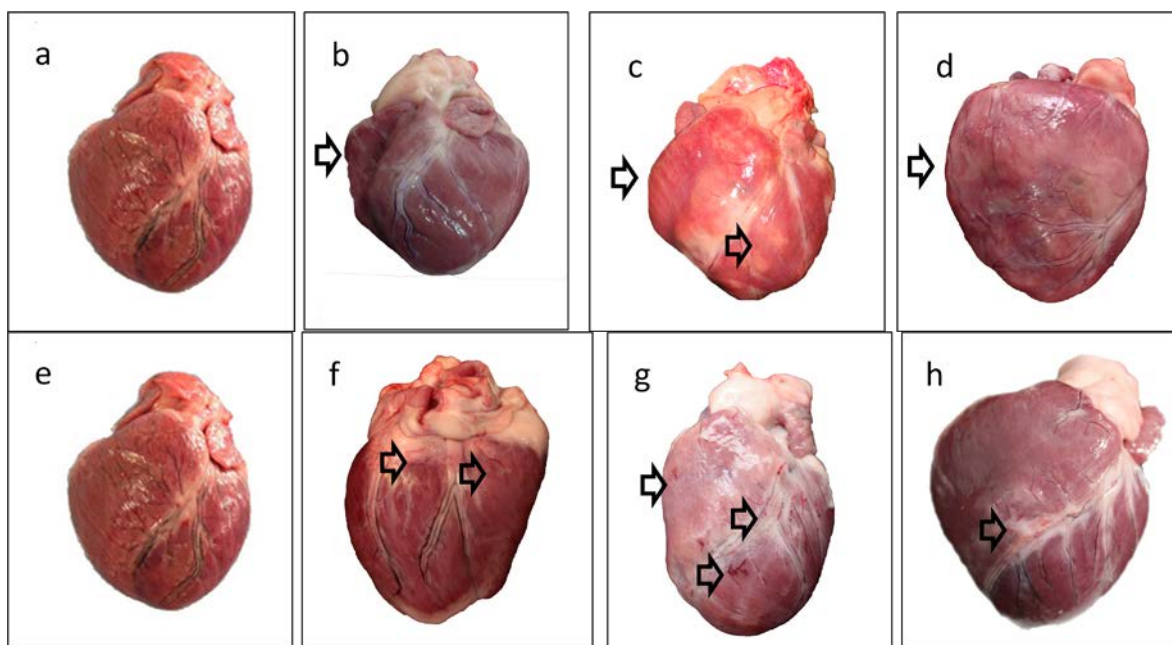


Figura 6. "Aspectos anatomopatológicos de corazones observados en la necropsia"

En la figura se muestra los corazones de perros a) control-, b) control+ c) TcVac1 y c) TcVac2 en fase aguda. La flecha negra indica dilatación del ventrículo derecho y también se puede observa la forma del corazón redonda, en c) la flecha también indica manchas blancuecinas. e) control-, f) control+ g) TcVac1 y h) TcVac2 en fase crónica. Las flechas negras indican hemorragias, en g son más evidentes aunque más localizadas, mientras que en f las hemorragias están más diseminadas, finalmente en h además muestra una pequeña distensión en ventrículo derecho.

10.5.2. Histopatológico

En los estudios histopatológicos del grupo control positivo se observó la presencia en el epicardio infiltración mononuclear moderada con distribución multifocal y zonal, con presencia de pequeñas áreas de hemorragia. En el miocardio se apreció fuerte infiltración multifocal y zonal de células mononucleares, donde prevalecen los macrófagos y linfocitos. También se encontraron múltiples focos de necrosis coagulativa acompañados de infiltración de células mononucleares y en algunos

casos hay pocos focos de necrosis con infiltrado de polimorfonucleares (neutrófilos). En endocardio se aprecia endocarditis mural multifocal, las células que infiltran son fundamentalmente células mononucleares. El grado de infiltración mononuclear, es de ligera a moderada en el ventrículo izquierdo, moderada en el septo interventricular y de moderada a severa en el ventrículo derecho. Fundamentalmente en el ventrículo derecho se apreció plegamiento de moderado a severo en fibras miocárdicas. El corazón de los perros tratados con TcVac1 y TcVac2, mostraron en epicardio infiltración mononuclear moderada con distribución multifocal y zonal, con presencia de áreas de hemorragia. En el miocardio se apreció severa infiltración multifocal y zonal de células mononucleares, donde prevalecen los macrófagos y linfocitos. Se observaron mayor número de focos de necrosis con infiltrado de polimorfonucleares (neutrófilos) y presencia de abundantes *debris celulares*. En endocardio se aprecia endocarditis multifocal, las células que infiltran son fundamentalmente células mononucleares. El grado de infiltración mononuclear es moderado en el ventrículo izquierdo y en el septo, y de moderada a severa en el ventrículo derecho. En el ventrículo derecho se apreció plegamiento leve a moderado de fibras miocárdicas.

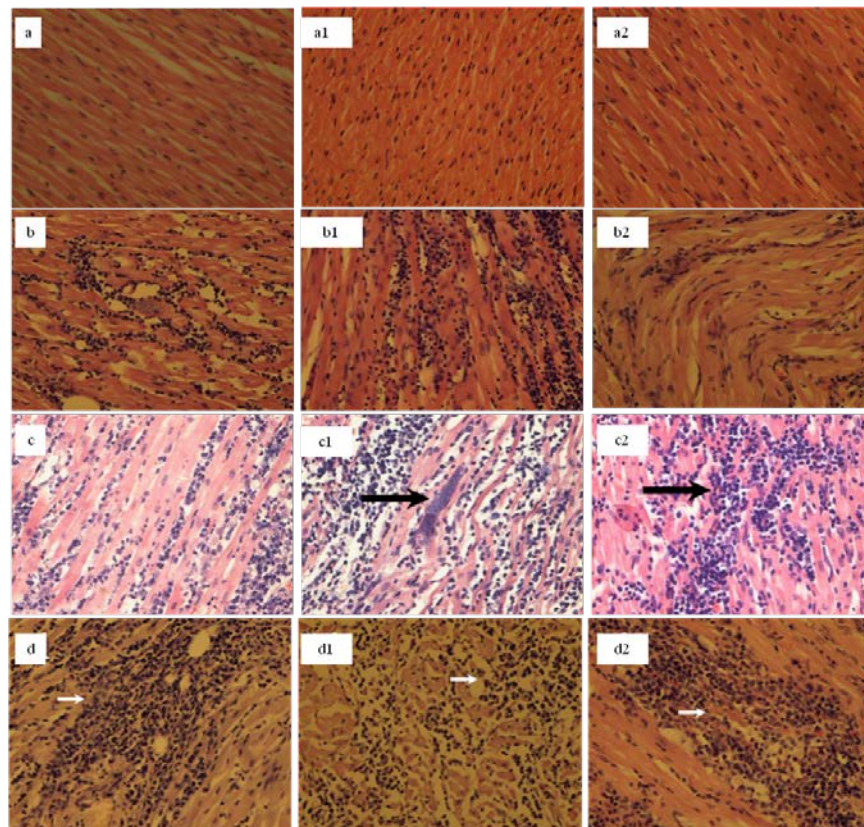


Figura 7. “Hallazgos histopatológicos en fase aguda”

Corte transversal en las tres diferentes cámaras del corazón; a) ventrículo izquierdo Control-, a1) Septo ventricular control-, a2) ventrículo derecho control-; b) ventrículo izquierdo Control+, b1) Septo ventricular control+, b2) ventrículo derecho Control+; c) ventrículo izquierdo de TcVac1, c1) Septo ventricular de TcVac1, c2) ventrículo derecho de TcVac1; d) ventrículo izquierdo de TcVac2, d1) Septo ventricular de TcVac2, d2) ventrículo derecho de TcVac2 . Teñidas con H&E, secciones de 5 µm de diámetro. Las flechas muestran los nidos, necrosis o infiltración, fase aguda.

Después de un año pos- infección en el corazón de los perros control+ seguían observando en epicardio infiltración mononuclear moderada con distribución multizonal. En el miocardio se apreció una moderada infiltración multifocal y zonal de células mononucleares, donde prevalecen los macrófagos y linfocitos. También hay presencia de pocos focos de necrosis activa acompañados de infiltración de células mononucleares. El grado de infiltración mononuclear, es de leve a moderada en el ventrículo izquierdo, leve a moderada en el septo interventricular y de moderada en el ventrículo derecho. Fundamentalmente en el ventrículo derecho se apreció plegamiento leve de fibras miocárdicas. En endocardio se aprecia endocarditis multifocal, las células que infiltran son fundamentalmente células mononucleares.

Por otro lado, en ambos tratamientos TcVac1 y TcVac2, presentaron en epicardio infiltración mononuclear leve con distribución multifocal. En el miocardio se apreció leve infiltración multifocal y zonal de células mononucleares, donde prevalecen los macrófagos y linfocitos, además se encontraron células plasmáticas. Se observaron menor número de focos de necrosis activa con infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos y presencia de detritus celulares. En endocardio se aprecia endocarditis multifocal, las células que infiltran son fundamentalmente células mononucleares. El grado de infiltración mononuclear es leve a moderada en el ventrículo izquierdo, leve en el septo y en el ventrículo derecho.

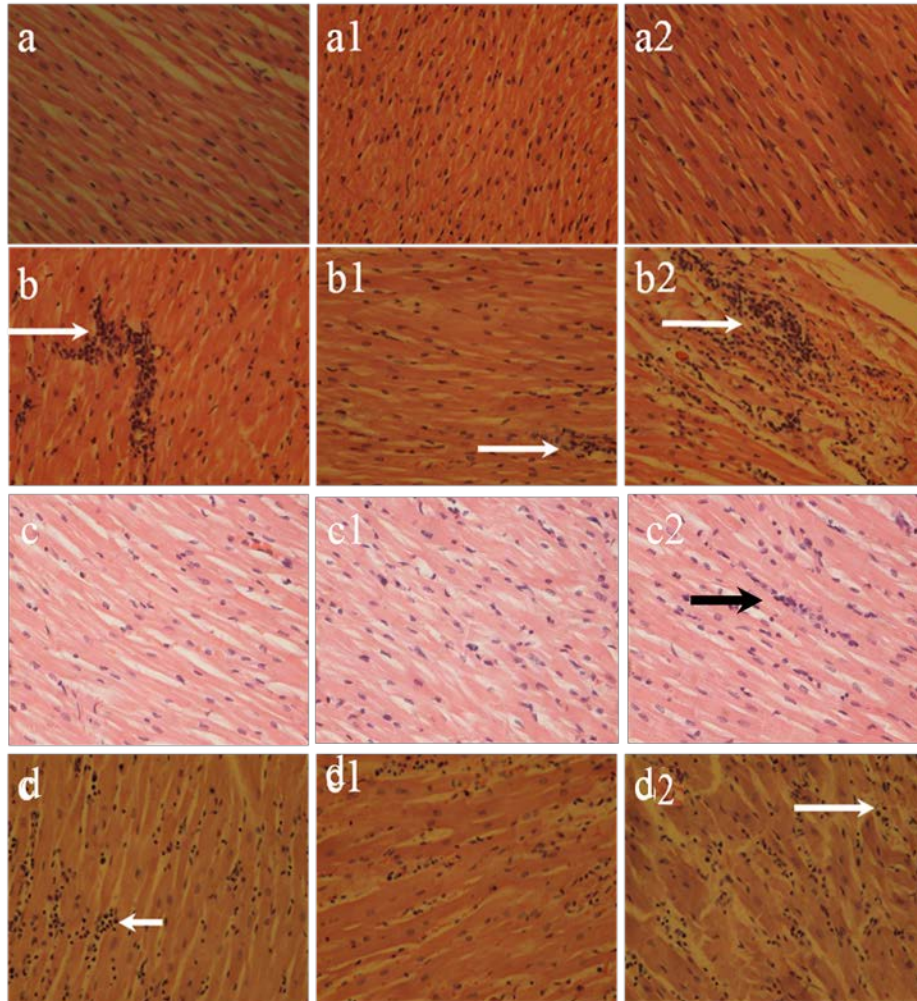


Figura 8. "Hallazgos histopatológicos en fase crónica

Corte transversal en las tres diferentes cámaras del corazón; a) ventrículo izquierdo Control-, a1) Septo ventricular control-, a2) ventrículo derecho control-; b) ventrículo izquierdo Control+, b1) Septo ventricular control+, b2) ventrículo derecho Control+; c) ventrículo izquierdo de TcVac1, c1) Septo ventricular de TcVac1, c2) ventrículo derecho de TcVac1; d) ventrículo izquierdo de TcVac2, d1) Septo ventricular de TcVac2, d2) ventrículo derecho de TcVac2. Teñidas con H&E, secciones de 5 μ m de diámetro. Las flechas blancas muestran la necrosis/infiltración de células mononucleares, fase crónica.

11. ARTÍCULO ENVIADO

ScholarOne Manuscripts

27/01/13 18:57

Veterinary Record

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Jose Antonio Zepeda-Escobar

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Veterinary Record*.

Manuscript ID: vetrec-2013-101568

ANTI-T. cruzi DNA-PRIME/PROTEIN-BOOST VACCINE REDUCES PARASITEMIA,
Title: PARASITE BURDEN AND CARDIAC DAMAGE IN EXPERIMENTALLY INFECTED
DOGS.

Authors: Zepeda-Escobar, Jose Antonio

Date Submitted: 27-Jan-2013

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.10.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Veterinary Record

**ANTI-T. cruzi DNA-PRIME/PROTEIN-BOOST VACCINE
REDUCES PARASITEMIA, PARASITE BURDEN AND CARDIAC
DAMAGE IN EXPERIMENTALLY INFECTED DOGS.**

Journal:	<i>Veterinary Record</i>
Manuscript ID:	vetrec-2013-101568
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	27-Jan-2013
Complete List of Authors:	Zepeda-Escobar, Jose Antonio; CIESA-UAEM,

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 ANTI-T. cruzi DNA-PRIME/PROTEIN-BOOST VACCINE REDUCES
2 PARASITEMIA, PARASITE BURDEN AND CARDIAC DAMAGE IN
3 EXPERIMENTALLY INFECTED DOGS.

4 J. A. Zepeda-Escobar, J. E. Aparicio-Burgos, L. Ochoa García, J. G. Estrada-Franco,
5 A Barbabosa-Pliego, R. Montes de Oca-Jimenez, S. Gupta, M Dhiman, M. Val-
6 Arreola, N. J. Garg, and J. C. Vázquez-Chagoyán.

7 MVZ. J. A. Zepeda-Escobar

8 M.Sc. J. E. Aparicio-Burgos

9 Biol. L. Ochoa García

10 Ph.D. J. G. Estrada-Franco

11 Dr. A Barbabosa-Pliego

12 Dr. R. Montes de Oca-Jimenez

13 Ph.D. J.C. Vázquez-Chagoyán

14 Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Universidad Autónoma de Estado de
15 México, Toluca, México,

16

17 Ph.D. S. Gupta,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

18 Ph.D. M Dhiman,
19 Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch,
20 Galveston, Texas, United States of America,
21
22 Ph.D. N. J. Garg,
23 Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch,
24 Galveston, Texas, United States of America, Department of Pathology, University of
25 Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America, Faculty of the
26 Institute for Human Infections and Immunity, and the Sealy Center for Vaccine
27 Development, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States
28 of America
29
30 Dr. M. Val-Arreola,
31 Cardiology Clinic, Irapuato, México
32 Corresponding author: J.C. Vázquez-Chagoyán. jcvch@yahoo.com (JCVC)
33
34

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

35 Abstract

36 Twenty-one mongrel dogs were immunized with TcVac2 vaccine. Dogs were
37 observed daily for general physical condition, at weekly intervals for clinical
38 condition, and at 2-week intervals for cardiac function, monitored by
39 electrocardiography. Sera samples were obtained before each immunization and at
40 two-week intervals thereafter. Two-weeks after the last immunization, dogs were
41 challenged intraperitoneally with culture-derived *T. cruzi*, Sylvio X10/4 strain (3500
42 trypomastigotes /kg body weight). Four experimental dog groups were formed:
43 Negative control group (no vaccine, no challenge infection; n=3), positive control
44 group (Vector only, challenge infection; n=6), TcVac1 group (DNA prime and DNA
45 boost vaccine plus challenge infection; n=6) and TcVac2 group (DNA prime protein
46 boost plus challenge infection; n=6). Dogs were immunized with DNA (200 µg of
47 each plasmid DNA/dog) and or recombinant protein (rProtein) (200 µg of each
48 rProtein/dog). Sera samples were analyzed for IgM and IgG by using the Chagas
49 diagnostic kits for ELISA, parasitemia was evaluated by microscopy beginning day 5
50 pi, on alternate days up to 50 dpi and at two-week intervals thereafter.
51 Anatomopathologic studies and histopathologic studies of the heart were conducted
52 in all animals after death. DNA-prime/recombinant protein-boost vaccination in
53 experimentally *T. cruzi* infected dogs induces a moderate level of protection because
54 this vaccine is able to reduce parasitemia and cardiac tissue parasite burden, as well
55 as reduce heart tissue damaged evaluated through electrocardiography and

1
2
3
4
5
6 56 postmortem studies.
7
8

9
10 57 **Keywords:** TcVac2, Dna-prime/protein Boost vaccine, dog *T. cruzi*
11

12 58 **Introduction**
13

14
15 59 *Trypanosoma cruzi*, a protozoan of the trypanosomatidae family, is the etiological
16
17 60 agent of Chagas disease, and has been responsible for thousands of human deaths in
18
19 61 Latin American countries in the last decades, despite huge international efforts to
20
21 62 reduce the prevalence through vector control. Unfortunately reemergence of the
22
23 63 disease has been reported in some areas of South America [1–3]. Official data
24
25 64 estimates that more than 10 million people are infected with this parasite and that 25
26
27 65 million people are at risk of infection [1]. This parasite is transmitted by blood
28
29 66 sucking Reduviid, an insect known as kissing bug, endemic of the Americas. Infected
30
31 67 people can be treated reasonably effectively with benznidazole or nifurtimox during
32
33 68 the acute phase of infection, and much less effectively as the infection develops
34
35 69 towards the chronic stage [1]. In the vast majority of patients the acute phase of the
36
37 70 disease goes unperceived by not being recognized, due to the scarcity or absence of
38
39 71 clinical manifestations (immune response depression promoted by the parasites, to
40
41 72 facilitate their invasion and reproduction) [4,5]. Vaccines could help to prevent
42
43 73 infection. Unfortunately no effective vaccine has been developed up to date.
44
45
46
47
48
49
50

51
52 74 In previous studies, our group has identified potential vaccine candidates (TcG1,
53
54 75 TcG2 and TcG4) by computational screening of *T. cruzi* sequence database. These
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

76 are phylogenetically conserved in clinically important strains of *T. cruzi* and
77 expressed in the infective and intracellular stages of the parasite [6]. When delivered
78 as a plasmid DNA (pCDNA3.TcG1, pCDNA3.TcG2 and pCDNA3.TcG4) vaccine in
79 mice, these antigens elicited a significant trypanolytic antibody and Th1 cytokine
80 (IFN- γ) response, a property associated with immune control of *T. cruzi* [7]. Then we
81 tested the efficacy of this multicomponent DNA vaccine in dogs and found that after
82 challenge with a pathogenic strain of *T. cruzi*, also a Th1 type immune response was
83 induced. However the immune response elicited by this vaccine in dogs was non-
84 protective, probably due to an immune cytolytic over response that induced damage
85 to cardiac tissue, after experimental infection with *Sylvio* X10/4 strain [8].

86 Several investigators have reported that a strong lytic antibody response, cytotoxic T
87 lymphocytes activity, and Th1 cytokines are necessary to elicit a protective immune
88 mechanism against *T. cruzi* [9–13]. It has been documented that DNA vaccines are a
89 good option for priming the immune system, however it has been observed that in
90 large animal models, even after several boost doses, that DNA vaccines are unable to
91 trigger a protective humoral response but that if a protein boost is given after DNA
92 prime vaccine, the humoral response is greatly enhanced and protection is sensitively
93 improved [14,15]. TcVac1 is a DNA vaccine, comprised of three antigens
94 expressing plasmids (TcG1, TcG2 and TcG4) plus two genetic adjuvants (GM-CSF
95 and IL12) administered in four repeated doses two weeks apart, and we found the
96 same type of response frequently reported for DNA only vaccines in large animal

1
2
3
4
5
6 97 models. Therefore, we hypothesized that if the vaccine should induce a more balance
7
8 98 Th1-Th2 immune response, to optimize the protective response and prevent
9
10 99 cardiomyocytes immunogenic damage after infection and investigated the protective
11
12 100 efficacy of a multi-component DNA-prime/protein-boost vaccine (TcVac2)
13
14 101 constituted of the selected candidates (TcG1, TcG2 and TcG4) and cytokine (IL-12
15
16 102 and GM-CSF) expression plasmids in a murine model [16]. As expected, TcVac2
17
18 103 induced a strong antigen-specific antibody response (IgG2b>IgG1) and a moderate
19
20 104 level of lymphocyte proliferation in mice. Upon challenge infection with a pathogenic
21
22 105 strain of *T. cruzi*, TcVac2-vaccinated mice expanded the IgG2b/IgG1 antibodies and
23
24 106 elicited a substantial CD8+ T cell response associated with type 1 cytokines (IFN- γ
25
26 107 and TNF- α) that resulted in control of acute parasite burden, and during chronic
27
28 108 phase, antibody response persisted, splenic activation of CD8+ T cells and IFN-
29
30 109 γ /TNF- α cytokines subsided, and IL-4/IL-10 cytokines became dominant in
31
32 110 vaccinated mice. The tissue parasitism, inflammation, and fibrosis in heart and
33
34 111 skeletal muscle of TcVac2-vaccinated chronic mice were undetectable by histological
35
36 112 techniques [16]. To test if TcVac2 elicits an equivalent immune response in a large
37
38 113 animal model we decided immunizing dogs with DNA-prime/Protein-boost strategy,
39
40 114 and to examine the efficacy of this vaccine to elicit antigen-and parasite-specific
41
42 115 antibody and T cell immunity, and determine if vaccination with TcVac2 modulates
43
44 116 the host towards balanced protective type 1 and type 2 immune response upon *T.*
45
46 117 *cruzi* infection. We also examined the efficacy of TcVac2 in controlling acute
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

118 parasitemia and preventing clinical severity of chronic disease.

119 **Materials and Methods**

120 This experiment aimed to study the protective capacity and the immune response
121 elicited by TcVac2 compared to TcVac1.

122 **Animals**

123 Twentyone mongrel dogs (3–4 months old, 11 males and 10 female) were acquired
124 locally and kept at the animal facility at the UAEM Research Center until they were
125 included in experiment, at eight months of age (8–12 kg body weight). Dogs were
126 confirmed free of *T. cruzi* infection by serological evaluation of anti-*T. cruzi*
127 antibodies using an indirect haemagglutination assay (IHA) and enzyme-linked
128 immunosorbent assay (ELISA) [17,18]. Before inclusion in experimental studies,
129 dogs were treated with anti-helminthes and vaccines against regional infectious
130 diseases (canine distemper, parvovirus infection, canine hepatitis, leptospirosis, and
131 rabies). All dogs received water ad libitum, and commercial dog food fed twice a day
132 according to their age and development requirements. Experimental protocols were
133 conducted under the technical specifications for the production, care, and use of lab
134 animals from the Norma Oficial Mexicana [19], and the Council for International
135 Organizations of Medical Science [19,20]. The research protocol was submitted and
136 approved by the Laboratory Animal Care Committee at the Universidad Nacional
137 Autónoma de México.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

138 **Antigen expression plasmid and recombinant proteins**

139 Sequences for TcG1, TcG2 and TcG4 have previously been submitted to Genbank
140 (AY727914, AY727915, and AY727917, respectively). TcG1 is 76% identical to the
141 *Leishmania donovani* 23-kDa cell surface protein. TcG1, TcG2 and TcG4 have been
142 identified in CL Brenner sequence database, and exhibit 99–100% homology to
143 XM_806323 and XM_816508, respectively [7]. Genes encoding TcG1, TcG2 and
144 TcG3 *T. cruzi* antigens were cloned in eukaryotic expression plasmids
145 (pCDNA3.TcG1, pCDNA3.TcG2 and pCDNA3.TcG4) [6] and dog cytokines
146 expression plasmid (IL-12 and GM-CSF) were a kind gift from Dr. Peter Melby [21].
147 For DNA vaccines, all recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH5- α
148 competent cells, grown in LB-broth containing 100 mg/ml ampicillin, and purified by
149 anion exchange chromatography using the Qiagen maxi prep kit (Qiagen,
150 Chatsworth, CA) according to the manufacturer's specifications. Recombinant
151 proteins for vaccination were produced as previously described [16], briefly: cDNAs
152 for TcG1, TcG2, and TcG4 were cloned in pET-22b plasmid (Novagen, Gibbstown,
153 NJ) such that the encoded proteins were in-frame with a C-terminal His5-tag. For the
154 purification of recombinant proteins, plasmids were transformed in BL21 (DE3)
155 pLysS competent cells (Invitrogen, Carlsbad CA) and recombinant proteins purified
156 using the poly-histidine fusion peptide-metal chelation chromatography system
157 (Novagen). After purification, proteins were exchanged out of elution buffer by
158 dialysis, and we validated that LPS contamination in the proteins was, 1.0 EU/ml

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

159 determined by toxin sensor limulus amebocyte lysate (LAL) assay kit (Genscript,
160 USA Inc.). All cloned sequences were confirmed by restriction digestion and
161 sequencing at the Recombinant DNA Core Facility at UTMB.

162 **Immunization and challenge infection**

163 Dogs were observed daily for general physical condition, at weekly intervals for
164 clinical condition, and at 2-week intervals for cardiac function, monitored by
165 electrocardiography. Sera samples were obtained before each immunization and at
166 two-week intervals thereafter. Two-weeks after the last immunization, dogs were
167 challenged with culture-derived *T. cruzi*, *Sylvio* X10/4 strain (3500 trypomastigotes
168 /kg body weight, intraperitoneal). The selected dose of the parasites was sufficient to
169 produce acute parasitemia in most dogs, and symptomatic clinical disease within 6–8
170 weeks post-infection [18]. After challenge infection, in addition to sera samples,
171 blood samples for parasitemia diagnostics were collected beginning day 5 pi, on
172 alternate days up to 50 dpi and at two-week intervals thereafter.

173 Four experimental dog groups were formed: Negative control group (no vaccine, no
174 challenge infection; n=3), positive control group (No vaccine, challenge infection;
175 n=6), TcVac1 group (DNA prime and DNA boost vaccine plus challenge infection;
176 n=6) and TcVac2 group (DNA prime protein boost plus challenge infection; n=6).
177 Dogs were immunized with a total volume of 1 ml of plasmid DNA (200 µg of each
178 plasmid DNA/dog) or recombinant protein (rProtein) (200 µg of each rProtein/dog)

1
2
3
4
5
6 179 divided into intramuscular (0.9 ml) and intradermic (0.1 ml) applications. Each
7
8 180 vaccinated dog had four vaccine doses, either four of DNA (TcVac1) or two of DNA
9
10 181 and two of proteins (TcVac2). In this experiment all DNA vaccines included DNA
11
12 182 adjuvants (IL-12 and GM-CSF expression plasmids) at the same dose as all other
13
14 183 plasmids and rProtein vaccine included 50 micrograms of saponin as adjuvant.
15
16
17

18 184 Parasites.

19
20
21
22 185 Trypanosoma cruzi (Sylvio-X10/4) was purchased from American Tissue Culture
23
24 186 Collection. Trypomastigotes were maintained and propagated by continuous in vitro
25
26 187 passage in NIH3T3 monolayer cells at 37°C, 5% CO₂ in DMEM media (pH 6.8)
27
28 188 supplemented with 2% FBS, 50 µg/mL ampicillin, and 0.1 mg/mL pyruvate
29
30 189 (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY).
31
32
33

34 190 Parasitological measures

35
36
37
38 191 We measured blood parasitemia using hemacytometer counts of 5 µl blood mixed
39
40 192 with equal volume of ACK red blood cell lysis buffer. Xenodiagnostic analysis was
41
42 193 performed as previously described [22–24]. Briefly, stage 4 naive triatomine (T.
43
44 194 pallidipenis) nymphs (6 per dog) were fed on vaccinated and control dogs on day 30
45
46 195 and day 60 pi. Fecal samples were collected from triatomines at day 60 after feeding,
47
48 196 and analyzed by light microscopy to detect epimastigote and metacyclic
49
50 197 trypomastigotes. At least 10 microscopic fields were analyzed for each fecal sample,
51
52 198 and triatomines were considered T. cruzi positive when ≥ 1 parasites were detected.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

199 Serology

200 Blood samples were obtained by venopuncture of the cephalic vein, and immediately
201 processed to separate sera, using standard methods [17,18]. Sera samples (1:100
202 dilution) were analyzed for IgM and IgG by using the Chagas diagnostic kits for
203 ELISA (Laboratorio-Lemos SRL, Buenos Aires, Argentina). The horseradish
204 peroxidase (HRP)-labeled anti-human-IgG in ELISA kit was replaced with HRP-
205 conjugated goat-anti-dog IgM- or IgG-specific secondary antibody (Bethyl
206 Laboratories, ciudad) and antibody response was monitored at 450 nm using an
207 Epoch, microplate reader (Epoch, Biotek) [17,18]. Sera samples from chronically
208 infected dogs with confirmed *T. cruzi* infection and from healthy domestic dogs were
209 used as positive and negative controls, respectively. To analyze the impact of
210 vaccines, as well as parasite challenge on antibody levels, we measured the change of
211 antibody titer from day zero to day of challenge to day of animal death.

212 Electrocardiography

213 Changes in cardiac rhythm and conduction in all dogs was monitored before inclusion
214 in the study, and after challenge infection, at 2-week intervals up to 8-weeks and at
215 monthly intervals thereafter, in surviving dogs. We used electrocardiograph (Stylus,
216 EK-8, USA) setting at 120 V, 60 Hertz, 20 amps, and 25 Watt in all experiments. Six
217 leads of the electrocardiogram were considered at 25 mm/sec at 1-mV, standardized
218 to 1 cm for the present study.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

219 **Necropsy and histological studies**

220 Necropsy was performed the day animals died due to infection or after humanitarian
221 sacrifice at day 60 (acute phase) and day 365-pi (chronic phase). Dogs were sedated
222 with xylazine (1–3 mg/kg body weight) and then euthanized according to the Norma
223 Oficial Mexicana [19,20], using protocols approved by the Laboratory Animal Care
224 Committee at the Universidad Nacional Autonoma de Mexico. A macroscopic and
225 microscopic analysis of affected organs was performed. Postmortem studies were
226 conducted using standard protocols with emphasis on macroscopic findings related to
227 Chagas disease in heart tissue [17]. For histological analysis, tissue samples were
228 fixed in 10% buffered formalin for 24 h, dehydrated in absolute ethanol, cleared in
229 xylene, and embedded in paraffin. Tissue sections (5- μ m thick) were stained with
230 hematoxylin-eosin, and evaluated by light microscopy at 100x and 400x. Tissues
231 were scored 0 to 4 in blind studies, according to the extent of inflammation and tissue
232 damage from normal to total wall involvement [17,18,25].

233 **Statistical analysis**

234 Data are expressed as means + SD, and derived from duplicate experiments (n=6
235 animals/group/experiment) with at least duplicate observations per sample. Results
236 were analyzed for significant differences using ANOVA procedures and Student's t-
237 tests. The level of significance was accepted at *P= 0.05 (vaccinated versus non-
238 vaccinated).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

239 Results

240 Parasitemia

241 Control and TcVac1 groups showed a relatively high level of parasitemia while
242 TcVac2 remains throughout the acute phase of the disease with barely detect
243 parasitemias. Also TcVac2 showed the shortest period of parasitemia (days 26 – 36 pi)
244 while TcVac1 parasitemias lasted from day 16 to 36 and the control group from day
245 22 to 44 (Table 1A).

246 ELISA

247 The development of antibody response induced by the vaccines and infection was
248 determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). We measured the
249 change in immunoglobulins every other week from day zero (previous to
250 immunization) to the day of death either caused by infection or euthanasia. All dogs
251 were seronegative before vaccination was initiated. The *T. cruzi*-specific IgM
252 response was not detected in sera of the animals from any group during the
253 immunization period. After challenge discrete changes in IgM were observed in all
254 challenged groups. IgM antibodies is shown in Figure 1, no differences among groups
255 were observed. Negative control, as expected, had no antibody level changes
256 throughout the experiment. No changes in total IgG antibody levels we observed in
257 any group in the vaccination period. Total IgG levels increased considerably after
258 challenge infection in the three groups, however no differences were observed among

1
2
3
4
5
6 259 groups (Figure 1).
7
8

9 **260 Electrocardiography**

10
11
12 261 Normal electrocardiographic readings were noted in all dogs included in the study,
13
14
15 262 before and after immunization. Electrocardiograms were graded with a subjective
16
17 263 value (0 = normal – 10 = severe abnormality). After challenge infection,
18
19 264 vaccinated/infected and non-vaccinated/ infected dogs exhibited no cardiac
20
21
22 265 alterations up to 30 dpi, except for two dogs from group TcVac1 who died on 36 and
23
24 266 42 dpi and who had developed cardiac conditions graded as 7 and 8 respectively.
25
26
27 267 Average grading for groups at day 60 was; for negative control group 0, for TcVac2
28
29 268 group 4, for TcVac1 group 4.3 and for control group 6 (Table 1B). Included among
30
31 269 electrocardiographic alterations were seen reduced P-R interval, reduced or increased
32
33
34 270 R wave voltage, axis rotated to the right, S-T segment line elevation from the
35
36 271 isoelectric line (0.2 mV), long QT segment, J wave elevation, and sinus tachycardia
37
38 272 with presumed diagnostic of myocarditis, pericarditis, and high degree of
39
40
41 273 myocardiocyte necrosis. Two vaccinated/infected dogs died on days 36 and 42 pi,
42
43 274 respectively, due to high electrical conductance problems and arrhythmia.
44
45
46 275 Additionally to the two death dogs, TcVac1 group has one more dog with a critical
47
48 276 heart condition by day 60, and the remaining animals had electrocardiographically
49
50 277 normal hearts. From group TcVac2 two dogs were graded as critical condition and
51
52 278 from the remaining animals 2 were only slightly affected and two were practically
53
54
55 279 normal. Of control group four dogs were in critical condition and the two remaining
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

280 animals were electrocardiographically normal.

281 **Necropsy and histological studies**

282 Mortality was highest for TcVac1 group (2/6) while no animals died from the other
283 groups. As expected, animals from the negative control group showed normal hearts
284 at necropsy. In infected animals anatomic-pathological analysis of the heart,
285 performed at day 60 pi, showed dilated cardiomyopathy (bi-ventricular dilation) and
286 focal, zonal and diffused myocarditis with different degrees of intensity in vaccinated
287 dogs as well as in dogs injected with vector alone. We gave histopathology and
288 necropsies a subjective value (0 = normal – 10 = most severe abnormalities) to each
289 heart considering its general aspect. Most affected animals in histopathology were
290 those from the vector alone group (4.6) followed by TcVac2 (3.7) and the least
291 affected group was TcVac1 group (2.8) (Table 1B and Figures 2A and 2B).
292 Anatomopathological evaluation showed that animals from the vector only averaged
293 the worst condition (4.25) while vaccinated dogs had 3.5, and 3.3 average values for
294 TcVac2 and TcVac1 groups, respectively (Table 1B and figure 3). Amastigote nests
295 were more frequently found in animals from the control group than in the other two
296 groups, whose parasite load was half the values found in the animals from the control
297 group (Table 1B and figure 3).

298 At one-year post-challenge infection, all dogs had round shaped hearts. But the
299 general aspect value of the hearts was worst for the TcVac1 (2.6) and control groups

1
2
3
4
5
6 300 (2.6), and the least affected hearts were those of the group TcVac2 (2.4). Main
7
8 301 histopathological in heart tissue at one year of infection were mononuclear cell
9
10 302 infiltrates, necrosis and amastigotes nest. Infiltrations affected more severely to
11
12 303 TcVac1 (2.6) and Control (2.6) groups and the least affected was group TcVac2 (2.4).
13
14 304 No differences were found among infected groups in necrotic cardiomyocytes.
15
16
17

18 305 Discussion

19
20
21
22 306 Trypanosoma cruzi, the causative etiologic agent of Chagas disease, is endemic of
23
24 307 Latin America and southern regions of the United States. Official data estimates that
25
26 308 more than 10 million people are infected with this parasite and that 25 million people
27
28 309 are at risk of infection Treatment and prevention of this disease has been very
29
30 310 difficult because on one hand therapeutic drugs are not completely safe and are not
31
32 311 completely effective, there are not effective vaccines, and pesticides, who have
33
34 312 played an important role in vector control, have not been able to completely eradicate
35
36 313 the vector from endemic areas and there are reports of re-emergency of triatomines in
37
38 314 areas that were though to be under control [1]. Chagas disease prevalence is higher in
39
40 315 pauperized populations, where dogs are one of the most important reservoirs for
41
42 316 human infection in the domestic cycle. Dogs are naturally infected because they prey
43
44 317 on and are preyed by infected triatomines and therefore maintain active the parasite
45
46 318 [26]. It has been reported that a reduction in prevalence of infected dogs
47
48 319 significantly reduces the risk of human infection [27]. Therefore, it is important to
49
50 320 search for additional methods to prevent infection and to block parasite transmission.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

321 Vaccines could be important tools to accomplish this target, and therefore the aim of
322 the present study was to test a vaccine candidate in a dog model to find out if it is
323 possible to prevent active infection in experimentally infected dogs and if it is
324 possible to block parasite transmission.

325 During the last two decades there has been a huge effort in the development of a
326 vaccine aiming to prevent *T. cruzi* infection (referencias de vacunas contra *T. cruzi*),
327 however even if promising results have been reported there are still no vaccines
328 commercially available, because no vaccine has been found to induce sterile
329 immunity. Our group has cloned in expression vectors a set of *T. cruzi* genes (TcG1,
330 TcG2 and TcG4) that have been testing as vaccine candidates, first as recombinant
331 protein and later as DNA vaccine. TcG1, TcG2 and TcG4 encoded antigens are
332 expressed in plasma membrane of the mammalian stages of *T. cruzi* (trypomastigote
333 and amastigote) and elicited significant levels of anti-parasite lytic antibody response
334 in mice. A dominant IgG2b/IgG1 antibody response was maintained after a challenge
335 infection and was associated with 50 to 90% control of the acute-phase tissue parasite
336 burden and an almost undetectable level of tissue parasites during the chronic phase,
337 as determined by a sensitive *T. cruzi* 18S rRNA gene-specific real-time PCR
338 approach [6,7]. Next we tested a DNA vaccine (TcVac1) constituted of antigen-
339 encoding plasmids (pCDNA3.TcG1, pCDNA3.TcG2 and pCDNA3.TcG4) and IL-
340 12- and GM-CSF-expression plasmids, as described in the previous study [7]. In that
341 study we reported TcVac1 elicited parasite- and antigen-specific IgM and IgG

1
2
3
4
5
6 342 (IgG2.IgG1) responses. Upon challenge infection, TcVac1-vaccinated dogs, as
7
8 343 compared to non-vaccinated controls dogs, responded to *T. cruzi* with a rapid
9
10 344 expansion of antibody response, moderately enhanced CD8+ T cell proliferation and
11
12 345 IFN- γ production, and suppression of phagocytes' activity evidenced by decreased
13
14 346 myeloperoxidase and nitrite levels. Subsequently, vaccinated dogs controlled the
15
16 347 acute parasitemia by day 37 pi (44 dpi in non-vaccinated dogs), and exhibited a
17
18 348 moderate decline in infectivity to triatomines. TcVac1-immunized dogs did not
19
20 349 control the myocardial parasite burden and electrocardiographic and histopathologic
21
22 350 cardiac alterations that are the hallmarks of acute Chagas disease. During the chronic
23
24 351 stage, TcVac1- vaccinated dogs exhibited a moderate decline in cardiac alterations
25
26 352 determined by EKG and anatomo-/histo-pathological analysis while chronically-
27
28 353 infected/non-vaccinated dogs continued to exhibit severe EKG alterations [8].
29
30 354 However, TcVac1 was not able to produce sterile immunity, and therefore further
31
32 355 studies were considered necessary. TcVac1 was designed as DNA-prime/DNA-boost
33
34 356 vaccine.

35
36
37
38
39
40
41
42 357 The DNA delivery system, used in that study, is known to drive a low level of antigen
43
44 358 expression. Several investigators have reported that needle delivery of DNA vaccines
45
46 359 in muscle induce low immune response in large animals and humans, even when
47
48 360 1000-fold higher doses of DNA than those proved to be effective in rodents were
49
50 361 given [28]. Other DNA vaccine delivery systems such as gene gun (biolistic gun)
51
52 362 [29,30], adenovirus or vaccinia virus delivery vectors [31], replicating attenuated
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

363 strains of intracellular microorganisms, such as Salmonella [32] have shown
364 promising results in eliciting antigen expression. Additionally, heterologous DNA-
365 prime/protein-boost approaches are noted to be more effective in eliciting stronger,
366 long-term immunity against intracellular pathogens. DNA vaccine elicits a robust T
367 cell response that is able to prime antigen-specific memory B cells, which can be
368 boosted by a protein in order to improve the protective immune response [14,15,33–
369 35]. Therefore, in the following studies our group focused on this system and
370 performed a protocol with this approach in mice model. TcVac2 (pCDNA3.TcG1,
371 pCDNA3.TcG2 and pCDNA3.TcG4 and IL- 12- and GMCSF-expression plasmids /
372 TcG1, TcG2 and TcG4 recombinant proteins plus saponin as adjuvant) induced a
373 strong antigen-specific antibody response (IgG2b/IgG1) and a moderate level of
374 lymphocyte proliferation. Upon challenge infection, TcVac2-vaccinated mice
375 expanded the IgG2b/IgG1 antibodies and elicited a substantial CD8+ T cell response
376 associated with type 1 cytokines (IFN- γ and TNF- α) that resulted in control of acute
377 parasite burden. During chronic phase, antibody response persisted, splenic activation
378 of CD8+ T cells and IFN- γ /TNF- α cytokines subsided, and IL-4/IL-10 cytokines
379 became dominant in vaccinated mice. The tissue parasitism, inflammation, and
380 fibrosis in heart and skeletal muscle of TcVac2-vaccinated chronic mice were
381 undetectable by histological techniques. In comparison, mice injected with vector or
382 cytokines only responded to *T. cruzi* by elicitation of a mixed (type 1/type 2)
383 antibody, T cell and cytokine response, and exhibited persistent parasite burden and

1
2
3
4
5
6 384 immunopathology in the myocardium [16].
7
8

9 385 In the present study we studied TcVac2 vaccine strategy in a canine model. We found
10
11 386 that TcVac2 induced a low level of IgG antibodies in the immunization period and
12
13 387 that after challenge infection this antibody increased rapidly but it was not different
14
15 388 than the control groups (TcVac1 and Vector only). However, here we report a
16
17 389 reduction in the lapse of parasitemia as well as a significant reduction in parasite
18
19 390 burden in blood and heart tissue, and a reduction in heart tissue damage in TcVac2
20
21 391 immunized infected animals. The type of immune response elicited may explain these
22
23 392 results. The IgG antibody isotypes have been reported to affect the level of protection
24
25 393 induced by the immune system during T cruzi infection in dogs. Guedes et al. (2008)
26
27 394 reported that in experimentally infected dogs that animals presenting cardiomegaly
28
29 395 showed a lower or absent levels of IgG1 during the chronic phase of infection in
30
31 396 contrast to those that did not showed an increase in heart weight. In mice models,
32
33 397 Dumonteil et al., (2004) reported that after vaccination with a therapeutic DNA
34
35 398 vaccine, reorientation and/or potentiation of the immune response from a non-
36
37 399 protective Th2 response to a protective Th1 response could be responsible for an
38
39 400 improved survival of experimentally infected animals and Gupta and Garg (2010)
40
41 401 reported that IgG2b/IgG1 ratio >1 (Th1 type response), when testing TcVac2 vaccine
42
43 402 in mice, was associated to the control of the parasite burden and the level of damage
44
45 403 in cardiac tissue during the acute phase of infection in mice. Gupta and Garg also
46
47 404 found that control animals had a more balanced Th1/Th2 immune response that
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

405 resulted non-protective. However, it is necessary to consider that the Th1 response
406 can also be harmful if it is persistent, since Soares et al. (2001) found in murine
407 model that IL-4 knockout animals had a strong Th1 biased immune response that
408 resulted in the control of acute *T. cruzi* infection parasite burden, but induced an
409 exacerbated inflammation in their hearts. Here we report that TcVac1 (DNA-
410 prime/DNA-boost) immunized and infected dogs had an exacerbated mononuclear
411 infiltration in infected dogs, which is likely associated to an extremely biased Th1
412 type immune response.

413 In agreement with the observed lower parasitemia and lower heart parasite load in
414 TcVac2 immunized animals in comparison with control animals, we observed that the
415 hearts of TcVac2 immunized animals had fewer heart electric conductivity problems
416 and less infection associated damage of heart tissue. Other studies have found similar
417 results. Rodriguez-Morales et al., (2012) reported that immunizing with pBCSP
418 plasmid avoided heart rate increases in both stages of the infection and prevented
419 severe heart conduction abnormalities such as myocardial infarction, second-degree
420 AV block or left BBB.

421 We conclude that DNA-prime/recombinant protein-boost vaccination in
422 experimentally *T. cruzi* infected dogs induces a moderate level of protection because
423 this vaccine is able to reduce parasitemia and cardiac tissue parasite burden, as well
424 as reduce heart tissue damaged evaluated through electrocardiography and
425 postmortem studies. Further studies should be conducted in order to more accurately

1
2
3
4
5
6 426 determine the type of immune response elicited in dogs by the TcVac2 immunization
7
8 427 protocol.

9
10
11 428 **References**

- 12
13
14 429 APARICIO-BURGOS, J. E., OCHOA-GARCÍA, L., ZEPEDA-ESCOBAR, J. A.,
15 430 GUPTA, S., DHIMAN, M., MARTÍNEZ, J. S., DE OCA-JIMÉNEZ, R. M.,
16 431 ARREOLA, M. V., BARBABOSA-PLIEGO, A., & VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C.
17 432 (2011) Testing the Efficacy of a Multi-Component DNA-Prime/DNA-Boost
18 433 Vaccine against Trypanosoma cruzi Infection in Dogs. *PLoS neglected*
19 434 *tropical diseases* 5, e1050.
20
21 435
22 436 BARBABOSA-PLIEGO, A., DÍAZ-ALBITER, H. M., OCHOA-GARCÍA, L.,
23 437 APARICIO-BURGOS, E., LÓPEZ-HEYDECK, S. M., VELÁSQUEZ-ORDOÑEZ, V.,
24 438 FAJARDO-MUÑOZ, R. C., DÍAZ-GONZÁLEZ, S., DE OCA-JIMENEZ, R. M., &
25 439 BARBOSA-MIRELES, M. (2009) Trypanosoma cruzi circulating in the
26 440 southern region of the State of Mexico (Zumpahuacan) are pathogenic: a
27 441 dog model. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 81, 390-
28 442 395.
29
30 443
31 444 BARBABOSA-PLIEGO, A., GIL, P. C., HERNÁNDEZ, D. O., APARICIO-BURGOS, J.
32 445 E., DE OCA-JIMÉNEZ, R. M., MARTÍNEZ-CASTAÑEDA, J. S., OCHOA-GARCÍA,
33 446 L., GUZMÁN-BRACHO, C., ESTRADA-FRANCO, J. G., & GARG, N. J. (2011)
34 447 Prevalence of Trypanosoma cruzi in dogs (Canis familiaris) and
35 448 triatomines during 2008 in a sanitary region of the State of Mexico, Mexico.
36 449 *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 151-156.
37
38 450
39 451 BASSO, B., CASTRO, I., INTROINI, V., GIL, P., TRUYENS, C., & MORETTI, E.
40 452 (2007) Vaccination with Trypanosoma rangeli reduces the infectiousness
41 453 of dogs experimentally infected with Trypanosoma cruzi. *Vaccine* 25, 3855-
42 454 3858.
43
44 455
45 456 BHATIA, V. & GARG, N. J. (2008) Previously unrecognized vaccine candidates
46 457 control Trypanosoma cruzi infection and immunopathology in mice.
47 458 *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 1158-1164.
48
49 459
50 460 BHATIA, V., SINHA, M., LUXON, B., & GARG, N. (2004) Utility of the
51 461 Trypanosoma cruzi sequence database for identification of potential
52 462 vaccine candidates by in silico and in vitro screening. *Infection and*
53 463 *immunity* 72, 6245-6254.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 464
465 CAZORLA, S. I., BECKER, P. D., FRANK, F. M., EBENSEN, T., SARTORI, M. J.,
466 CORRAL, R. S., MALCHIODI, E. L., & GUZMÁN, C. A. (2008) Oral vaccination
467 with *Salmonella enterica* as a cruzipain-DNA delivery system confers
468 protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*
469 *76*, 324-333.
- 470
471 DELGADO, S., NEYRA, R. C., MACHACA, V. R. Q., JUÁREZ, J. A., CHU, L. C.,
472 VERASTEGUI, M. R., APAZA, G. M. M., BOC+ÍNGEL, C. D., TUSTIN, A. W., &
473 STERLING, C. R. (2011) A history of Chagas disease transmission, control,
474 and re-emergence in peri-rural La Joya, Peru. *PLoS neglected tropical*
475 *diseases 5*, e970.
- 476
477 DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (2001) Norma Oficial
478 Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones técnicas para la*
479 *producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio 22*.
- 480
481 DÍAZ-SUÁREZ, O. (2009) [Chagas disease: re-emergent or neglected].
482 *Investigacion clinica 50*, 415.
- 483
484 ENDMANN, A., BADEN, M., WEISERMANN, E., KAPP, K., SCHROFF, M.,
485 KLEUSS, C., WITTIG, B., & JUHLS, C. (2010) Immune response induced by a
486 linear DNA vector: Influence of dose, formulation and route of injection.
487 *Vaccine 28*, 3642-3649.
- 488
489 FRANCHIN, G., PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L., SCHENKMAN, S., & RODRIGUES,
490 M. M. (1997) Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic
491 acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi*
492 trypomastigotes reduces infection in mice. *Infection and immunity 65*,
493 2548-2554.
- 494
495 GARG, N., POPOV, V. L., & PAPACONSTANTINO, J. (2003) Profiling gene
496 transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative
497 phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts:
498 implications in chagasic myocarditis development. *Biochimica et*
499 *Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 1638*, 106-120.
- 500
501 GARG, N. & TARLETON, R. L. (2002) Genetic immunization elicits antigen-
502 specific protective immune responses and decreases disease severity in
503 *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity 70*, 5547-5555.
- 504
505 GILBERT, S. C., MOORTHY, V. S., ANDREWS, L., PATHAN, A. A., MCCONKEY, S.
J., VUOLA, J. M., KEATING, S. M., BERTHOUD, T., WEBSTER, D., & MCSHANE,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 506 H. (2006) Synergistic DNA–MVA prime–boost vaccination regimes for
507 malaria and tuberculosis. *Vaccine* 24, 4554–4561.
- 508
- 509 GUPTA, S. & GARG, N. J. (2010) Prophylactic efficacy of TcVac2 against
510 *Trypanosoma cruzi* in mice. *PLoS neglected tropical diseases* 4, e797.
- 511
- 512 GURTLER, R. E., CECERE, M. C., CASTANERA, M. B., CANALE, D., LAURICELLA,
513 M. A., CHUIT, R., COHEN, J. E., & SEGURA, E. L. (1996) Probability of
514 infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans* fed on
515 infected humans and dogs in northwest Argentina. *American Journal of*
516 *Tropical Medicine and Hygiene* 55, 24–31.
- 517
- 518 GURTLER, R. E., CECERE, M. C., LAURICELLA, M. A., CARDINAL, M. V.,
519 KITRON, U., & COHEN, J. E. (2007) Domestic dogs and cats as sources of
520 *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*
521 134, 69–82.
- 522
- 523 GURTLER, R. E., COHEN, J. E., CECERE, M. C., & CHUIT, R. (1997) Shifting Host
524 Choices of the Vector of Chagas Disease, *Triatoma infestans*, in Relation to
525 the Availability of Host in Houses in North-West Argentina. *Journal of*
526 *applied ecology* 699–715.
- 527
- 528 KRAUTZ, G. M., KISSINGER, J. C., & KRETTLI, A. U. (2000) The Targets of the
529 Lytic Antibody Response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*
530 16, 31–34.
- 531
- 532 MEXICANA, N. O. (1995) NOM-033-ZOO-1995. *Sacrificio humanitario de los*
533 *animales domésticos y silvestres*.
- 534
- 535 MIYAHIRA, Y., TAKASHIMA, Y., KOBAYASHI, S., MATSUMOTO, Y., TAKEUCHI,
536 T., OHYANAGI-HARA, M., YOSHIDA, A., OHWADA, A., AKIBA, H., & YAGITA,
537 H. (2005) Immune responses against a single CD8+ T-cell epitope induced
538 by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi*
539 infection. *Infection and immunity* 73, 7356–7365.
- 540
- 541 MOORE, A. C. & HILL, A. V. S. (2004) Progress in DNA–based heterologous
542 prime–boost immunization strategies for malaria. *Immunological reviews*
543 199, 126–143.
- 544
- 545 PAL, R., WANG, S., KALYANARAMAN, V. S., NAIR, B. C., WHITNEY, S., KEEN,
546 T., HOCKER, L., HUDACIK, L., ROSE, N., & MBOUDJEKA, I. (2006)
547 Immunization of rhesus macaques with a polyvalent DNA prime/protein

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 548 boost human immunodeficiency virus type 1 vaccine elicits protective
549 antibody response against simian human immunodeficiency virus of R5
550 phenotype. *Virology* 348, 341-353.
- 551
552 PEREIRA-CHIOCCOLA, V., COSTA, F., RIBEIRAO, M., SOARES, I. S., ARENA, F.,
553 SCHENKMAN, S., & RODRIGUES, M. M. (1999) Comparison of antibody and
554 protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited
555 by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or
556 recombinant protein. *Parasite immunology* 21, 103-110.
- 557
558 PITTELLA JE (1993) Central nervous system involvement in Chagas' disease.
559 An updating. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35, 111-116.
- 560
561 PORTELA-LINDOSO, A. A. B. & SHIKANAI-YASUDA, M. A. (2003) Chronic
562 Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain
563 reaction. *Revista de Saúde Pública* 37, 107-115.
- 564
565 PRATA, A. (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.
566 *The Lancet infectious diseases* 1, 92-100.
- 567
568 RIBEIRAO, M., LÚCIA, V., FERGUSON, P. C., RÉNIA, L., FRAGATA FILHO, A. A.,
569 & SCHENKMAN, S. (2012) Chagasic patients develop a type 1 immune
570 response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite immunology* 22,
571 49-53.
- 572
573 SAKAI, T., HISAEDA, H., NAKANO, Y., ISHIKAWA, H., MAEKAWA, Y., ISHII, K.,
574 NITTA, Y., MIYAZAKI, J., & HIMENO, K. (2008) Gene gun-mediated delivery
575 of an interleukin-12 expression plasmid protects against infections with
576 the intracellular protozoan parasites *Leishmania major* and *Trypanosoma*
577 *cruzi* in mice. *Immunology* 99, 615-624.
- 578
579 SILDARRIAGA, O. A., PEREZ, L. E., TRAVI, B. L., & MELBY, P. C. (2006)
580 Selective enhancement of the type 1 cytokine response by expression of a
581 canine interleukin (IL)-12 fused heterodimeric DNA. *Veterinary*
582 *immunology and immunopathology* 110, 377-388.
- 583
584 SCHEERLINCK, J. P. Y., CASEY, G., MCWATERS, P., KELLY, J., WOOLLARD, D.,
585 LIGHTOWLERS, M. W., TENNENT, J. M., & CHAPLIN, P. J. (2001) The
586 immune response to a DNA vaccine can be modulated by co-delivery of
587 cytokine genes using a DNA prime-protein boost strategy. *Vaccine* 19,
588 4053-4060.
- 589

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

590 SEPULVEDA, P., HONTEBEYRIE, M., LIEGEARD, P., MASCILLI, A., & NORRIS,
591 K. A. (2000) DNA-based immunization with *Trypanosoma cruzi*
592 complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and
593 confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and*
594 *immunity* 68, 4986-4991.

595 WEINBERG, M., WATERMAN, S., LUCAS, C. Á., FALCON, V. C., MORALES, P. K.,
596 LOPEZ, L. A., PETER, C., GUTIÉRREZ, A. E., GONZALEZ, E. R., & FLISSER, A.
597 (2003) The US-Mexico border infectious disease surveillance project:
598 Establishing binational border surveillance. *Emerging infectious diseases* 9,
599 97.
600

601
602 WORLD ORGANISATION HEALTH (2012) Chagas disease (American
603 trypanosomiasis) Media Center.
604

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

605 **Table 1A. Blood Parasitemia.** Parasite counts were determined reading 1000
606 microscopic fields at 40X, in 5 µl of fresh blood, every other day from day 5 until day
607 50 p.i. Each + = 1-2 trypomastigotes.

608

609

610

611 **Table 1B: Numeric scale of electrocardiograms, histological and morphological**
612 **analysis of infected dogs with or without previous immunization.** Values
613 represent the condition that each dog had at the time of analysis in a subjective scale
614 0-10 where 0=normal and 10=most severe abnormality. Numbers with in each
615 treatment (Vector only, TcVac1, TcVac2) are ordered from left to right as indicated
616 in the top of the table. Dogs 1-3 either died as consequence of infection (day 36* or
617 42[†]) or were killed at 60 post infection and dogs 4-6 were killed 1 year post infection.
618 Electrocardiograms represent the last value taken before death and were estimated by
619 the degree of electric conductivity abnormalities associated to cardiac diseases.
620 Morphological evaluations were performed during necropsy the day of death and
621 considered the general aspect of the heart (presence of white spotting, hemorrhages,
622 dilatation of chambers and organ consistency and shape). Histological evaluation was
623 estimated after microscopic analysis of 50 fields (400 X) from 5µm thick heart tissue
624 section slides, stained with Hematoxylin-Eosine. Slides were prepared from the wall
625 of each chamber and the septum from each animal. Parameters considered to assign

1
2
3
4
5
6 626 the values, were the average of the degree of necrosis or fibrosis, mononuclear
7
8 627 infiltration and number of amastigotes nests found in evaluated fields from each dog
9
10 628 at the time of death.

11
12
13 629

14
15 630

16
17
18 631 **Figure 1. IgG and IgM antibody levels after experimental challenge infection.**

19 632 Dogs were vaccinated with vector only, TcVac1 or TcVac2, and sera were collected

20
21 633 two weeks until day 60 pi (only post infection results are shown). An ELISA was

22
23 634 performed to monitor the sera levels (1:50 dilution) of parasite-specific IgM and IgG.

24
25 635 The induced antigen-specific antibody response in sera collected after infection with

26
27 636 live pathogenic strain of *T. cruzi* (Sylvio X10/4), was determined using recombinant

28
29 637 antigens. Data are presented as mean \pm SD (*p,0.05, vaccinated versus non-

30
31 638 vaccinated, n = 6 per experiment).

32
33
34
35
36
37 639

38
39
40 640

41
42 641 **Figure 2a. Histological analysis of hearts 60 days post infection.** Dogs were

43
44 642 vaccinated, and challenged with *T. cruzi*. Heart tissue sections (5- μ M) from left

45
46 643 ventricle, septum, and right ventricle were obtained at 60 days post- infection (acute

47
48 644 phase), and stained with hematoxylin-eosin. Shown are representative micrographs of

49
50 645 negative control (a), Vector only (b) and TcVac2 (c). Columns of images from left to

51
52 646 right show sections of the walls of right ventricle, left ventricle and septum. Arrows

53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

647 show amastigote nests, lymphocyte infiltration, and cardiomyocytes destruction or
648 necrosis.

649

650

651 **Figure 2B. Histological analysis of hearts one year post post infection.**

652 Dogs were vaccinated, and challenged with *T. cruzi*. Heart tissue sections (5- μ M)
653 from left ventricle, septum, and right ventricle were obtained one year post-infection
654 (Chronic phase), and stained with hematoxylin-eosin. Shown are representative
655 micrographs of negative control (a), Vector only (b) and TcVac2 (c). Columns of
656 images rom left to right show sections of the walls of right ventricle, left ventricle and
657 septum. In Vector only arrows show focal lymphocyte infiltration, In TcVac2 arrows
658 show diffuse lymphocyte infiltration.

659

660

661 **Figure 3. Morphological evaluation of infected dog hearts at 60 days post**

662 **infection.** Dogs were vaccinated and infected with *T. cruzi* as above. Shown are
663 representative morphologic alterations of the heart during the acute infection phase
664 (60 dpi) in dogs from negative control (a), Vector only (b), TcVac21(c) and TcVac2
665 (d). Images of normal heart are shown for comparison. Arrows show right ventricle
666 wall thinning characteristic of ventricle dilation (in a, b, c and g), pale striated

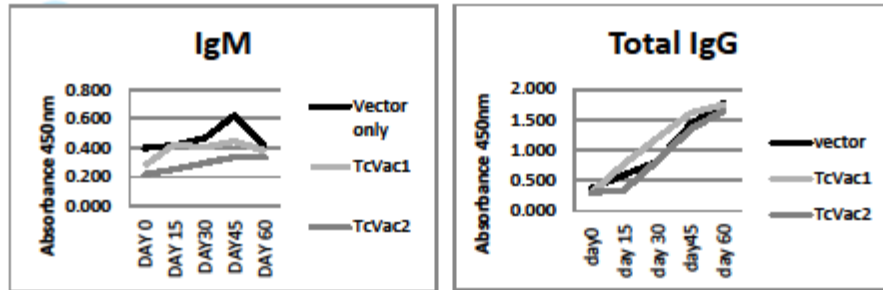
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

667 epicardium characteristic of necrosis produced after inflammatory response to
668 infection (in c and d), hemorrhages (in f, g and h)
669

Confidential: For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2a

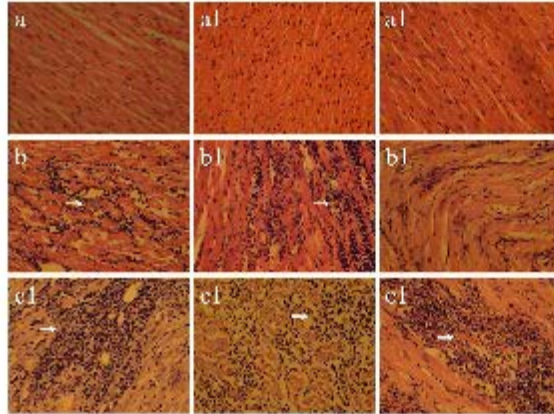
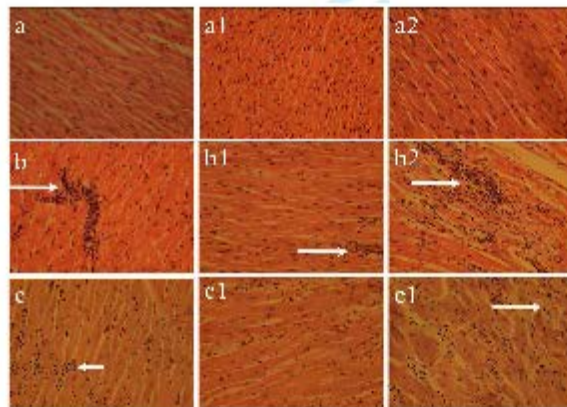
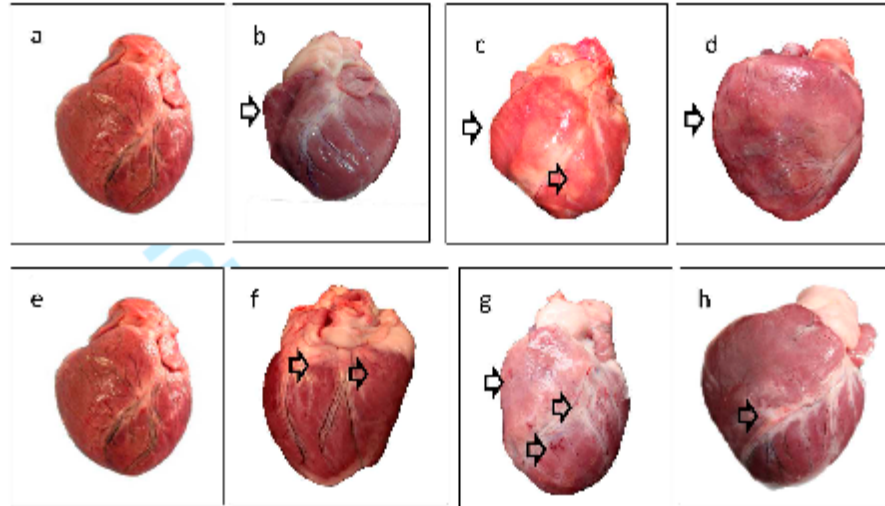


Figure 2B



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1 A

DAYS POST INFECCION	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
TCVAC1	+	+	+	+	+	++	+++	+++	++++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
TCVAC2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Control positivo	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+++	++	+	+	++	+	-	-	-
Control negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1B

Histopathological / Morphological / Electrocardiographical evaluations									
	Vector only			TcVac1			TcVac2		
Dog 1	4.6	4.8	9.0	2.0*	2.3*	7.0*	3.3	2.5	7.0
Dog 2	5.3	2.8	9.0	4.0	2.0	0.0	4.0	4.0	4.0
Dog 3	2.6	2.5	9.0	2.6*	2.0*	8.0*	4.0	3.5	7.0
Dog 4	4.0	5.3	1.0	3.3	2.8	2.0	2.0	2.5	4.0
Dog 5	2.6	3.8	0.0	4.6	5.8	0.0	2.0	1.8	0.0
Dog 6	2.6	4.3	8.0	4.0	1.3	9.0	3.3	3.0	0.0
Group average	3.6	3.9	6.0	3.4	2.7	4.3	3.1	2.9	4.0
Acute average	4.6	4.3	9.0	4.2	3.5	5.0	3.7	3.3	6.0
Chronic average	2.6	3.5	3.0	2.6	1.8	3.6	2.4	2.4	2.0

12. DISCUSIÓN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es endémico para Latinoamérica y zonas de la región sur de Estados Unidos. Datos oficiales estimas que hay 10 millones de personas infectadas y 25 millones estarían en riesgo de contraer la enfermedad. El tratamiento y la prevención de esta enfermedad han sido muy difíciles, debido por un lado a que los fármacos utilizados para tratar la enfermedad no son ni del todo seguros ni del todo eficaces, no hay vacuna efectiva existente al momento y tampoco pesticidas que jueguen un rol importante en el control del vector; No ha sido completamente erradicado el vector de áreas endémicas y existen reportes de re-emergencia de triatomíneos en áreas que se encontraban ya en control (World Organisation Health 2012). La prevalencia de la enfermedad de Chagas es alta en poblaciones empobrecidas, donde los perros son uno de los más importantes reservorios dentro del ciclo domestico en la infección humana. Los perros son naturalmente infectados debido por un lado a que los triatomíneos se alimentan de ellos y por otro lado a que ellos consumen triatomíneos potencialmente infectados y de esa manera mantienen activo al parasito (Gurtler et al. 2007). Está bien documentada la reducción en la prevalencia de perros minimiza el riesgo de la infección humana(Gurtler et al. 1997). Además es importante la búsqueda de métodos adicionales para prevenir la infección y bloquear la transmisión parasitaria, las vacunas pueden ser una herramienta importante para completar esta meta, adicionalmente en el presente estudio se probaron candidatos vacunales en modelo canino para encontrar si es posible prevenir la infección activa en perros experimentalmente desafiados con el parasito y de ser así es posible bloquear la transmisión vectorial.

Durante las últimas décadas ha habido grandes esfuerzos en el desarrollo de vacunas para prevenir la infección de *T. cruzi* (Bhatia, Wen, Zacks, & Garg 2009;Bhatia & Garg 2008;Cazorla, Frank, & Malchiodi 2009;Donnelly, Wahren, & Liu 2005;Dumonteil 2009;Garg & Bhatia 2005), aunque los resultados son prometedores no existen al momento vacunas comercialmente disponibles ya que no se ha podido inducir una respuesta inmune con la inocuidad necesaria. Nuestro grupo de investigación ha clonado en vectores de expresión un conjunto de genes de importancia clínica presentes de manera conservada en los diferentes formas celulares infectantes en hospedero mamífero (tripomastigote y amastigote) de *T. cruzi* (TcG1, TcG2, TcG4) los cuales han sido probados como candidatos a vacuna primeramente como proteínas recombinantes y después como vacunas de ADN. Los antígenos TcG1, TcG2 y TcG4 han estimulado respuestas inmunes con niveles significativos de anticuerpos líticos anti-*T. cruzi* en ratones. La respuesta dominante de anticuerpos fue IgG2b/IgG1 la cual fue mantenida después de la infección (desafío) y fue asociada con el control de la carga parasitaria en tejido durante la fase aguda en 50 a 90% y niveles casi indetectables de parásitos en tejidos durante la fase crónica determinado por la prueba de PCR en tiempo real con el gen 18s rRNA específico para *T. cruzi* (Bhatia, Sinha, Luxon, & Garg 2004;Bhatia & Garg 2008). El siguiente paso fue probar la vacuna de ADN (TcVac1) constituida de plásmidos que codifican antígenos (pCDNA3.TcG1, pCDNA3.TcG2 y pCDNA3.TcG4) y IL-12-γ-GMCSF, como se describe en el estudio anterior (Bhatia & Garg 2008). En ese estudio se informó que TcVac1 provoca respuestas para parásitos y antígenos específicos de IgM e IgG

(IgG2.IgG1). Tras la infección de prueba, perros vacunados TcVac1, en comparación con los no vacunados (perros controles), respondió a *T. cruzi* con una rápida expansión de la respuesta de anticuerpos, moderadamente mayor producción linfocitos T CD8 + y la proliferación de IFN- γ y la supresión de la actividad de los fagocitos evidenciada por disminución de mieloperoxidasa y los niveles de nitrito. Posteriormente, los perros vacunados pudieron controlar la parasitemia aguda en el día 37 pi (44 dpi en perros no vacunados) y mostraron una disminución moderada en la infectividad de triatomíneos. Los perros inmunizados con TcVac1 no controlaron la carga parasitaria de miocardio y las alteraciones cardíacas, tanto electrocardiográficas como histopatológicas que son el sello distintivo de la enfermedad de Chagas aguda. Durante la fase crónica, los perros vacunados TcVac1 mostraron una disminución moderada en alteraciones cardíacas determinadas por electrocardiograma y análisis anatómico e histopatológico mientras que los perros crónicamente infectados y no vacunados mostraron graves alteraciones ECG (Aparicio-Burgos, Ochoa-García, Zepeda-Escobar, Gupta, Dhiman, Martínez, de Oca-Jiménez, Arreola, Barbabosa-Pliego, & Vázquez-Chagoyán 2011). Sin embargo, TcVac1 no era capaz de producir inmunidad inocua, y por lo tanto estudios adicionales se consideraron necesarios. TcVac1 fue diseñado como vacuna DNA-prime/DNA-boost. El sistema de entrega de ADN, que se utiliza en ese estudio, se sabe que produce un bajo nivel de expresión de antígeno. Varios investigadores han informado de que la inyección de vacunas de ADN en el músculo induce baja respuesta inmune en grandes animales y en los seres humanos, incluso con 1000 veces las dosis más altas de lo que se han reportado que funciona en roedores (Endmann et al. 2010).

Otros sistemas de administración de vacunas de ADN, tales como gene gun (pistola biolística) (Sakai et al. 2008; Weinberg et al. 2003), adenovirus o vectores de virus vaccinia (Miyahira et al. 2005b), cepas atenuadas de microorganismos, tales como *Salmonella* (Cazorla, Becker, Frank, Ebensen, Sartori, Corral, Malchiodi, & Guzmán 2008) han demostrado resultados prometedores en la obtención de antígeno expresión. Además, enfoques de ADN heterólogo como sensibilización y proteína recombinante como refuerzo han mostrado ser más eficaz en la obtención de una respuesta más fuerte y con una inmunidad a largo plazo contra patógenos intracelulares. Las vacunas de ADN provoca una respuesta agresiva de linfocitos T que es capaz de sensibilizar a linfocitos B de memoria a antígenos específicos al cual puede ser reforzado por una proteína recombinante con el fin de mejorar la respuesta inmunitaria protectora (Gilbert et al. 2006; Moore and Hill 2004; Pal et al. 2006; Scheerlinck et al. 2001; Sepulveda, Hontebeyrie, Liegeard, Mascilli, & Norris 2000). Por lo tanto, los siguientes estudios de nuestro grupo de investigación se centraron en este sistema y realizó un protocolo con este enfoque en un modelo de ratones. TcVac2 plásmidos de expresión de (pCDNA3.TcG1, pCDNA3.TcG2 y pCDNA3.TcG4 y 12-IL – GMCSF/proteínas recombinantes TCG1, TcG2 y TcG4 más saponina como adyuvante) indujo una fuerte respuesta de anticuerpos antígeno específica (IgG2b/IgG1) y un nivel moderado de proliferación de linfocitos. Tras la infección de prueba, ratones vacunados TcVac2 ampliaron los anticuerpos IgG2b/IgG1 y provocaron una sustancial respuesta de linfocitos T CD8+ asociadas a citocinas tipo 1 (IFN- γ y TNF- α -) que dieron como resultado el control de la carga parasitaria aguda. Durante la fase crónica, la respuesta de anticuerpos persistieron, disminuyó la activación esplénica de células T CD8 + y citocinas IFN- γ / TNF- α , mientras que las citocinas IL-4/IL-10 se

convirtieron en dominante en ratones vacunados. Parásitos en tejidos, inflamación y fibrosis en corazón y músculo esquelético de ratones vacunados con TcVac2 en fases crónicas eran indetectables por técnicas histológicas. En comparación, los ratones inyectados sólo con el vector o citocinas respondieron ante la infección por *T. cruzi* produciendo una respuesta mixta de anticuerpos (tipo 1/tipo 2) y exhibieron una carga parasitaria persistente e inmunopatología en el miocardio (Gupta & Garg 2010).

En el presente trabajo se estudió TcVac2 como estrategia de vacuna en un modelo canino. Se encontró que TcVac2 indujo un nivel bajo de anticuerpos de IgG en el periodo de inmunización y que después de la infección por inoculación del parásito este inmunoglobulina aumentó rápidamente, pero no era diferente de los grupos de control (TcVac1 y control positivo). Sin embargo, los datos muestran una reducción en el periodo de la parasitemia, así como una reducción significativa de la carga de parásitos en la sangre y en el corazón, además de una reducción en el daño al tejido cardíaco en animales inmunizados con TcVac2 e infectados. El tipo de respuesta inmunitaria provocada pueden explicar estos resultados. Los isotipos de anticuerpos IgG se ha informado que afectan el nivel de protección inducida por el sistema inmune durante la infección por *T. cruzi* en perros. Guedes et al. (2008) informaron que en perros infectados experimentalmente, los animales que presentaron cardiomegalia mostraron niveles más bajos o ausentes de IgG1 durante la fase crónica de la infección en contraste con aquellos que no mostraron un aumento en el tamaño del corazón. En modelo ratón, Dumonteil et al., (2004) informaron que después de la vacunación con una vacuna terapéutica de ADN, la reorientación y / o potenciación de la respuesta inmune de una respuesta no protectora Th2 a una respuesta protectora Th1 podría ser responsable de una mejora de la supervivencia de los animales infectados experimentalmente y Gupta y Garg (2010) informaron que la relación IgG2b/IgG1 > 1 (Th1 respuesta de tipo), cuando se prueba la vacuna TcVac2 en ratones, se asoció con el control de la carga parasitaria y el nivel de daño en el tejido cardíaco durante la fase aguda de la infección en ratones. Gupta y Garg también encontraron que los animales control tuvieron una respuesta inmune Th1/Th2 más equilibrada que como resultado no protegió a los ratones. Sin embargo, es necesario considerar que la respuesta Th1 también pueden ser perjudicial si es persistente, ya Soares et al. (2001) encontraron en modelo murino que los animales knockout IL-4 tenía una fuerte respuesta inmune sesgada a Th1 que dio como resultado el control de carga parasitaria en la infección aguda de *T. cruzi*, pero indujo una inflamación exacerbada en sus corazones. Con nuestro equipo de investigación mostramos que TcVac1 (ADN sensibilización / DNA refuerzo) en perros inmunizados e infectados tenían un infiltrado mononuclear exacerbado, que probablemente se asocia a un extremadamente sesgada respuesta inmune tipo Th1.

De acuerdo con la menor parasitemia observada y menor carga de parásitos del corazón en animales inmunizados con TcVac2 en comparación con animales del grupo control, se observó que los corazones de los animales inmunizados con TcVac2 tenían menos problemas de conductividad eléctrica de corazón y menos daño asociado infección del tejido cardíaco. Otros estudios han encontrado resultados similares. Rodríguez-Morales et al., (2012) reportaron que la inmunización con plásmidos PbCSP evitaron un aumento frecuencia cardíaca en ambas etapas de la infección y

evitaron graves alteraciones de la conducción eléctrica del corazón, como infarto de miocardio, el bloqueo atrio-ventricular de segundo grado o el bloqueo completo de rama izquierda.

13. CONCLUSIONES

Llegamos a la conclusión de que la vacunación con en perros con TcVac2 (sensibilización de ADN y refuerzo de proteína recombinante) e infectados experimentalmente con T. cruzi induce un nivel moderado de protección, ya que esta vacuna es capaz de reducir la parasitemia y la carga parasitaria en el tejido cardiaco, así como reducir el dañado en el tejido cardiaco evaluado a través de electrocardiografía y estudios post mortem. Los estudios adicionales deben llevarse a cabo con el fin de determinar con mayor precisión el tipo de respuesta inmune provocada en los perros por la TcVac2 inmunización protocolo.

14. REFERENCIAS

- Aparicio-Burgos, J.E., Ochoa-García, L., Zepeda-Escobar, J.A., Gupta, S., Dhiman, M., Martínez, J.S., de Oca-Jiménez, R.M., Arreola, M.V., Barbabosa-Pliego, A., & Vázquez-Chagoyán, J.C. 2011. Testing the Efficacy of a Multi-Component DNA-Prime/DNA-Boost Vaccine against *Trypanosoma cruzi* Infection in Dogs. *PLoS neglected tropical diseases*, 5, (5) e1050
- Araújo, A.F.S., de Alencar, B.C.G., Vasconcelos, J.R.C., Hiyane, M.I., Marinho, C.R.F., Penido, M.L.O., Boscardin, S.B., Hoft, D.F., Gazzinelli, R.T., & Rodrigues, M.M. 2005. CD8+-T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infection and immunity*, 73, (9) 6017-6025
- Basso, B., Castro, I., Introini, V., Gil, P., Truyens, C., & Moretti, E. 2007. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, 25, (19) 3855-3858
- Bhatia, V. & Garg, N.J. 2008. Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15, (8) 1158-1164
- 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. *Infection and immunity*, 72, (11) 6245-6254
- Bhatia, V., Wen, J.J., Zacks, M.A., & Garg, N.J. 2009. American trypanosomiasis and perspectives on vaccine development. *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases Academic Press NY* 1407-1434
- Boscardin, S.B., Kinoshita, S.S., Fujimura, A.E., & Rodrigues, M.M. 2003. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infection and immunity*, 71, (5) 2744-2757
- Briceño-León, R. & Galván, J.M. 2007. The social determinants of Chagas disease and the transformations of Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*
- Cardoni, R.L., Antunez, M.I., & Abrami, A.A. 1999. Respuesta TH1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *MEDICINA-BUENOS AIRES*-, 59, 84-90
- Carrada-Bravo, T. 2004a. *Trypanosoma cruzi*. *Rev Mex Patol Clin*, 51, (4) 205-219
- Carrada-Bravo, T. 2004b. *Trypanosoma cruzi*. *Rev Mex Patol Clin*, 51, (4) 205-219
- Cazorla, S.I., Becker, P.D., Frank, F.M., Ebensen, T., Sartori, M.J., Corral, R.S., Malchiodi, E.L., & Guzmán, C.A. 2008. Oral vaccination with *Salmonella enterica* as a cruzipain-DNA delivery system confers protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, 76, (1) 324-333

Cazorla, S.I., Frank, F.M., & Malchiodi, E.L. 2009. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection

5. *Expert.Rev Vaccines.*, 8, (7) 921-935 available from: PM:19538117

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

Chou, B., Hisaeda, H., Shen, J., Duan, X., Imai, T., Tu, L., Murata, S., Tanaka, K., & Himeno, K. 2008. Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. *Microbes and infection*, 10, (3) 241-250

Claser, C., Espíndola, N.M., Sasso, G., Vaz, A.J., Boscardin, S.B., & Rodrigues, M.M. 2007. Immunologically relevant strain polymorphism in the Amastigote Surface Protein 2 of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and infection*, 9, (8) 1011-1019

COSTA, F., Franchin, G., Pereira-Chioccola, V.L., RIBEIRAO, M., Schenkman, S., & Rodrigues, M.M. 1998. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*, 16, (8) 768-774

Cruz-Reyes, A. & Pickering-Lopez, J. M. Sobre la enfermedad de Chagas in Mexico, con un enfoque biológico geográfico y socioeconómico. 2005.

Ref Type: Generic

de Alencar, B.C.G., Araújo, A.F.S., Penido, M.L.O., Gazzinelli, R.T., & Rodrigues, M.M. 2007. Cross-priming of long lived protective CD8+ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection: Importance of a TLR9 agonist and CD4+ T cells. *Vaccine*, 25, (32) 6018-6027

de Jogna Prat, S.A. 1997. Clínica de Enfermedades Infecciosas. *Scientific, American*

Diario Oficial de la Federación 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*, 22,

Díaz-Limay, E., Escalante, H., & Jara, C.A. 2004. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad-Perú. *Parasitología latinoamericana*, 59, (3-4) 153-158

Docampo, R. 2001. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Current pharmaceutical design*, 7, (12) 1157-1164

Donnelly, J.J., Wahren, B., & Liu, M.A. 2005. DNA vaccines: progress and challenges. *The Journal of Immunology*, 175, (2) 633-639

Dumonteil, E. 1999. Update on Chagas' disease in Mexico. *salud pública de méxico*, 41, (4) 322-327

Dumonteil, E. 2007. DNA vaccines against protozoan parasites: advances and challenges. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007,

- Dumonteil, E. 2009. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, (6) 1075-1082
- Dumonteil, E., Escobedo-Ortegon, J., Reyes-Rodriguez, N., Arjona-Torres, A., & Ramirez-Sierra, M.J. 2004. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infection and immunity*, 72, (1) 46-53
- Duthie, M.S., Kahn, M., Zakayan, A., White, M., & Kahn, S.J. 2007. Parasite-induced chronic inflammation is not exacerbated by immunotherapy before or during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, (8) 1005-1012
- Eickhoff, C.S., Giddings, O.K., Yoshida, N., & Hoft, D.F. 2010. Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, (5) 687-691
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., & Blandin, G. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science Signalling*, 309, (5733) 409
- Endmann, A., Baden, M., Weisermann, E., Kapp, K., Schroff, M., Kleuss, C., Wittig, B., & Juhls, C. 2010. Immune response induced by a linear DNA vector: Influence of dose, formulation and route of injection. *Vaccine*, 28, (21) 3642-3649
- Espinoza-Gómez, F., Maldonado-Rodríguez, A., Coll-Cárdenas, R., Hernández-Suárez, C.M., & Fernández-Salas, I. 2002. Presence of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and risk of transmission of Chagas disease in Colima, Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, (1) 25-30
- Fontanella, G.H., De Vusser, K., Laroy, W., Daurelio, L., Nocito, A.L., Revelli, S., & Contreras, R. 2008. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: A vaccine candidate. *Vaccine*, 26, (19) 2322-2334
- Fralish, B.H. & Tarleton, R.L. 2003. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 21, (21) 3070-3080
- Frank, F.M., Petray, P.B., Cazorla, S.I., Muñoz, M.C., Corral, R.S., & Malchiodi, E.L. 2003. Use of a purified *Trypanosoma cruzi* antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. *Vaccine*, 22, (1) 77-86
- Garcia, G.A., Arnaiz, M.R., Esteva, M.I., Laucella, S.A., Garavaglia, P.A., Ibarra, S.E., & Ruiz, A.M. 2008. Evaluation of immune responses raised against Tc13 antigens of *Trypanosoma cruzi* in the outcome of murine experimental infection. *Parasitology*, 135, (3) 347
- Garg, N. & Bhatia, V. 2005. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert review of vaccines*, 4, (6) 867-880
- Garg, N. & Tarleton, R. L. 1998, Elicitation of protective cellular and humoral immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection using DNA vaccines can be augmented with cytokines., *In Proceedings 10th International Congress of Immunology*.

- Garg, N. & Tarleton, R.L. 2002. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*, 70, (10) 5547-5555
- Giddings, O.K., Eickhoff, C.S., Sullivan, N.L., & Hoft, D.F. 2010. Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infection and immunity*, 78, (3) 1333-1338
- Gilbert, S.C., Moorthy, V.S., Andrews, L., Pathan, A.A., McConkey, S.J., Vuola, J.M., Keating, S.M., Berthoud, T., Webster, D., & McShane, H. 2006. Synergistic DNA–MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine*, 24, (21) 4554-4561
- Godínez, G.M. 2012. Tripanosomiasis americana. enfermedad de Chagas. enfermedad de Chagas-Cruz. enfermedad de Chagas-Mazza: historia de un epónimo. *Medicina Interna de México*, 28, (2) 182
- Gupta, S. & Garg, N.J. 2010. Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in mice. *PLoS neglected tropical diseases*, 4, (8) e797
- Gurtler, R.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Cardinal, M.V., Kitron, U., & Cohen, J.E. 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134, (01) 69-82
- Gurtler, R.E., Cohen, J.E., Cecere, M.C., & Chuit, R. 1997. Shifting Host Choices of the Vector of Chagas Disease, *Triatoma Infestans*, in Relation to the Availability of Host in Houses in North-West Argentina. *Journal of applied ecology* 699-715
- Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in parasitology*, 17, (8) 372-376
- Haolla, F.A., Claser, C., de Alencar, B.C.G., Tzelepis, F., de Vasconcelos, J.R., de Oliveira, G., Silvério, J.C., Machado, A.V., Lannes-Vieira, J., & Bruna-Romero, O. 2009. Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 27, (41) 5644-5653
- Harth, G., Mills, A.A., Lin, T., & Araujo, F.G. 2006. *Trypanosoma cruzi* glycoprotein of Mr 56000: characterization and assessment of its potential to protect against fatal parasite infections. *Molecular microbiology*, 11, (2) 261-271
- Hoft, D.F., Eickhoff, C.S., Giddings, O.K., Vasconcelos, J.R.C., & Rodrigues, M.M. 2007. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* immunity involving CD8⁺ CTL and B cell-mediated cross-priming. *The Journal of Immunology*, 179, (10) 6889-6900
- Huygen, K. 2005. Plasmid DNA vaccination. *Microbes and infection*, 7, (5) 932-938
- Katae, M., Miyahira, Y., Takeda, K., Matsuda, H., Yagita, H., Okumura, K., Takeuchi, T., Kamiyama, T., Ohwada, A., & Fukuchi, Y. 2002. Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infection and immunity*, 70, (9) 4833-4840

Laderach, D., Cerban, F., Motran, C., Vottero De Cima, E., & Gea, S. 1996. Trypanosoma cruzi: The major cysteinyl proteinase (cruzipain) is a relevant immunogen of parasite acidic antigens (FIII). *International journal for parasitology*, 26, (11) 1249-1254

Limon-Flores, A.Y., Cervera-Cetina, R., Tzec-Arjona, J.L., Ek-Macias, L., Sánchez-Burgos, G., Ramirez-Sierra, M.J., Cruz-Chan, J.V., VanWynsberghe, N.R., & Dumonteil, E. 2010. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of Trypanosoma cruzi infection in mice: Role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine*, 28, (46) 7414-7419

López-Ordóñez, T., Panzera, F., Tun-Ku, E., Ferrandis, I., & Ramsey, J.M. 2009. Genomic and proteomic contributions for Chagas disease control. *salud pública de méxico*, 51, s410-s423

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

Machado, A.V., Cardoso, J.E., Claser, C., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., & Bruna-Romero, O. 2006. Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Human gene therapy*, 17, (9) 898-908

Martin, D.L., Weatherly, D.B., Laucella, S.A., Cabinian, M.A., Crim, M.T., Sullivan, S., Heiges, M., Craven, S.H., Rosenberg, C.S., & Collins, M.H. 2006. CD8+ T-Cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS pathogens*, 2, (8) e77

Martínez-Ibarra, J.A., Bárcenas-Ortega, N.M., Noguera-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R., Lino Rodríguez, M., Magallón-Gastélum, E., López-Martínez, V., & Romero-Nápoles, J. 2001. Role of two Triatoma (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) species in the transmission of Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) to man in the west coast of Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, (2) 141-144

Menezes, H. The use of adjuvants in the vaccination of mice with lyophilized "Trypanosoma cruzi" Hospital. 68, 1341-1346. 1965.
Ref Type: Generic

Michailowsky, V., Luhrs, K., Rocha, M.O.C., Fouts, D., Gazzinelli, R.T., & Manning, J.E. 2003. Humoral and cellular immune responses to Trypanosoma cruzi-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infection and immunity*, 71, (6) 3165-3171

Miller, M.J., Wrightsman, R.A., & Manning, J.E. 1996. Trypanosoma cruzi: Protective Immunity in Mice Immunized with Paraflagellar Rod Proteins Is Associated with a T-Helper Type 1 Response. *Experimental parasitology*, 84, (2) 156-167

Mitelman J, H.G.L.A.T.M. & Giménez L, M.G. 2012. CHAGAS Y DISCAPACIDAD. *Intramed*

Mitelman JE, G. L. C. O. L. A. M. R. P. Enfermedad de Chagas-Mazza en las grandes ciudades. 2012. *Intramed* (http://www.intramed.net/sitios/libro_chagas/).
Ref Type: Generic

Miyahira, Y., Akiba, H., Katae, M., Kubota, K., Kobayashi, S., Takeuchi, T., García-Sastre, A., Fukuchi, Y., Okumura, K., & Yagita, H. 2003. Cutting Edge: A Potent Adjuvant Effect of Ligand to Receptor Activator of NF- κ B Gene for Inducing Antigen-Specific CD8+ T Cell Response by DNA and Viral Vector Vaccination. *The Journal of Immunology*, 171, (12) 6344-6348

Miyahira, Y., Takashima, Y., Kobayashi, S., Matsumoto, Y., Takeuchi, T., Ohyanagi-Hara, M., Yoshida, A., Ohwada, A., Akiba, H., & Yagita, H. 2005a. Immune responses against a single CD8+-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*, 73, (11) 7356-7365

Miyahira, Y., Takashima, Y., Kobayashi, S., Matsumoto, Y., Takeuchi, T., Ohyanagi-Hara, M., Yoshida, A., Ohwada, A., Akiba, H., & Yagita, H. 2005b. Immune responses against a single CD8+-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection
69. *Infection and immunity*, 73, (11) 7356-7365

Moncayo, Á. & Silveira, A.C. 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 17-30

Moore, A.C. & Hill, A.V.S. 2004. Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunological reviews*, 199, (1) 126-143

Morell, M., Thomas, M.C., Caballero, T., Alonso, C., & López, M.C. 2006. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 24, (49) 7046-7055

Mota-Sánchez, J. 2009. DNA Vaccines: Induction of the immune response. *salud pública de méxico*, 51, s463-s469

Náquira Velarde, C., Huapaya, P., Espinoza Blanco, Y., & Vega Chirinos, S. 2001. Enfermedad de chagas; Chagas disease. *Módulos técnicos.Serie de documentos monográficos*, 12,

Ouaissi, A., Guilvard, E., Delneste, Y., Caron, G., Magistrelli, G., Herbault, N., Thieblemont, N., & Jeannin, P. 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *The Journal of Immunology*, 168, (12) 6366-6374

Pal, R., Wang, S., Kalyanaraman, V.S., Nair, B.C., Whitney, S., Keen, T., Hocker, L., Hudacik, L., Rose, N., & Mboudjeka, I. 2006. Immunization of rhesus macaques with a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 vaccine elicits protective antibody response against simian human immunodeficiency virus of R5 phenotype. *Virology*, 348, (2) 341-353

Pereira, V.R.A., Lorena, V.M.B., Nakazawa, M., Luna, C.F., Silva, E.D., Ferreira, A.G.P., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Soares, M.B.P., & Coutinho, E.M. 2005. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology research*, 96, (3) 154-161

Planelles, L., Thomas, M.C., Alonso, C., & López, M.C. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infection and immunity*, 69, (10) 6558-6563

Quijano-Hernandez, I.A., Bolio-González, M.E., Rodríguez-Buenfil, J.C., Ramirez-Sierra, M.J., & Dumonteil, E. 2008. Therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, (1) 343-346

Ramsey, J.M. & Schofield, C.J. 2003. Control of Chagas disease vectors. *salud pública de méxico*, 45, (2) 123-128

Roffe., Souza, A.L.S., Caetano, B.C., Machado, P.P., Barcelos, L.S., Russo, R.C., Santiago, H.C., Souza, D.G., Pinho, V., & Tanowitz, H.B. 2006. A DNA vaccine encoding CCL4/MIP-1 enhances myocarditis in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes and infection*, 8, (12) 2745-2755

Sakai, T., Hisaeda, H., Nakano, Y., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Ishii, K., Nitta, Y., Miyazaki, J., & Himeno, K. 2008. Gene gun-mediated delivery of an interleukin-12 expression plasmid protects against infections with the intracellular protozoan parasites *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* in mice. *Immunology*, 99, (4) 615-624

Salazar-Schettino, P.M. & Marin, R.A. 2006. *Manual para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi* México, UNAM.

Sanchez-Burgos, G., Mezquita-Vega, G., Escobedo-Ortegon, J., Ramirez-Sierra, M.J., Arjona-Torres, A., Rodrigues, M.M., Ouaisi, A., & Dumonteil, E. 2007. Comparative efficacy of DNA vaccines encoding various *Trypanosoma cruzi* antigens. *FEMS Microbiol Med Immunol*, 50, 333-341

Santori, F., Paranhos-Bacalla, G.S., Silveira, F.D.A., Yamauchi, L.M., Araya, J.E., & Yoshida, N. 1996. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. *Infection and immunity*, 64, (4) 1093-1099

Scheerlinck, J.P.Y., Casey, G., McWaters, P., Kelly, J., Woollard, D., Lightowers, M.W., Tennent, J.M., & Chaplin, P.J. 2001. The immune response to a DNA vaccine can be modulated by co-delivery of cytokine genes using a DNA prime-protein boost strategy. *Vaccine*, 19, (28) 4053-4060

Schmunis, G.A. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 75-86

Schnapp, A.R., Eickhoff, C.S., Sizemore, D., Curtiss III, R., & Hoft, D.F. 2002. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infection and immunity*, 70, (9) 5065-5074

Scott, M.T., Neal, R.A., & Woods, N.C. 1985. Immunization of marmosets with *Trypanosoma cruzi* cell surface glycoprotein (GP90). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79, (4) 451-454

Sepulveda, P., Hontebeyrie, M., Liegeard, P., Mascilli, A., & Norris, K.A. 2000. DNA-based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic

antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*, 68, (9) 4986-4991

Silveira, E.L.V., Claser, C., Haolla, F.A.B., Zanella, L.G., & Rodrigues, M.M. 2008. Novel protective antigens expressed by *Trypanosoma cruzi* amastigotes provide immunity to mice highly susceptible to Chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15, (8) 1292-1300

Singh, M. & O'Hagan, D.T. 2002. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical research*, 19, (6) 715-728

Tanowitz, H.B., Kirchhoff, L.V., Simon, D., Morris, S.A., Weiss, L.M., & Wittner, M. 1992. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 5, (4) 400-419

Tekiel, V., Alba-Soto, C.D., González Cappa, S.M., Postan, M., & Sánchez, D.O. 2009. Identification of novel vaccine candidates for Chagas disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library. *Vaccine*, 27, (9) 1323-1332

TOSO, M., VIAL, U., & GALANTI, N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile*, 139, (2) 258-266

Tzelepis, F., de Alencar, B.C.G., Penido, M.L.O., Claser, C., Machado, A.V., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R.T., & Rodrigues, M.M. 2008. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *The Journal of Immunology*, 180, (3) 1737-1748

Urbina, J.A. 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta tropica*, 115, (1) 55-68

Vasconcelos, J.R., Hiyane, M.I., Marinho, C.R.F., Claser, C., Machado, A.M.V., Gazzinelli, R.T., Bruñaa-Romero, O., Alvarez, J.M., Boscardin, S.B., & Rodrigues, M.M. 2004. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Human gene therapy*, 15, (9) 878-886

Vasconcelos, J.R.C., Boscardin, S.B., Hiyane, M.I., Kinoshita, S.S., Fujimura, A.E., & Rodrigues, M.M. 2003. A DNA-priming protein-boosting regimen significantly improves type 1 immune response but not protective immunity to *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain. *Immunology and cell biology*, 81, (2) 121-129

Vázquez-Chagoyán, J.C., Gupta, S., & Jain Garg, N. 2011. 6 Vaccine Development Against *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. *Advances in parasitology*, 75, 121

Vega Chirinos, S. & Náquira Velarde, C. 2006. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Trypanosomiosis americana (enfermedades de chagas). *Serie de normas técnicas: Ministerio de Salud-INS* (26)

Warren, T.L. & Weiner, G.J. 2000. Uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vaccine development. *Current opinion in hematology*, 7, (3) 168-173

Weinberg, M., Waterman, S., Lucas, C.Á., Falcon, V.C., Morales, P.K., Lopez, L.A., Peter, C., Gutiérrez, A.E., Gonzalez, E.R., & Flisser, A. 2003. The US-Mexico border infectious disease surveillance project: Establishing binational border surveillance. *Emerging infectious diseases*, 9, (1) 97

Wizel, B., Garg, N., & Tarleton, R.L. 1998. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*, 66, (11) 5073-5081

World Bank. *World Development Report*. 216-218. 1993. *Oxford University Press*.
Ref Type: Generic

World Organization Health. Chagas disease: Control and elimination. 2008.
Ref Type: Generic

World Organization Health. Chagas disease: control and elimination. 2010.
Ref Type: Generic

World Organization Health. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. 2012. Media Center.
Ref Type: Generic

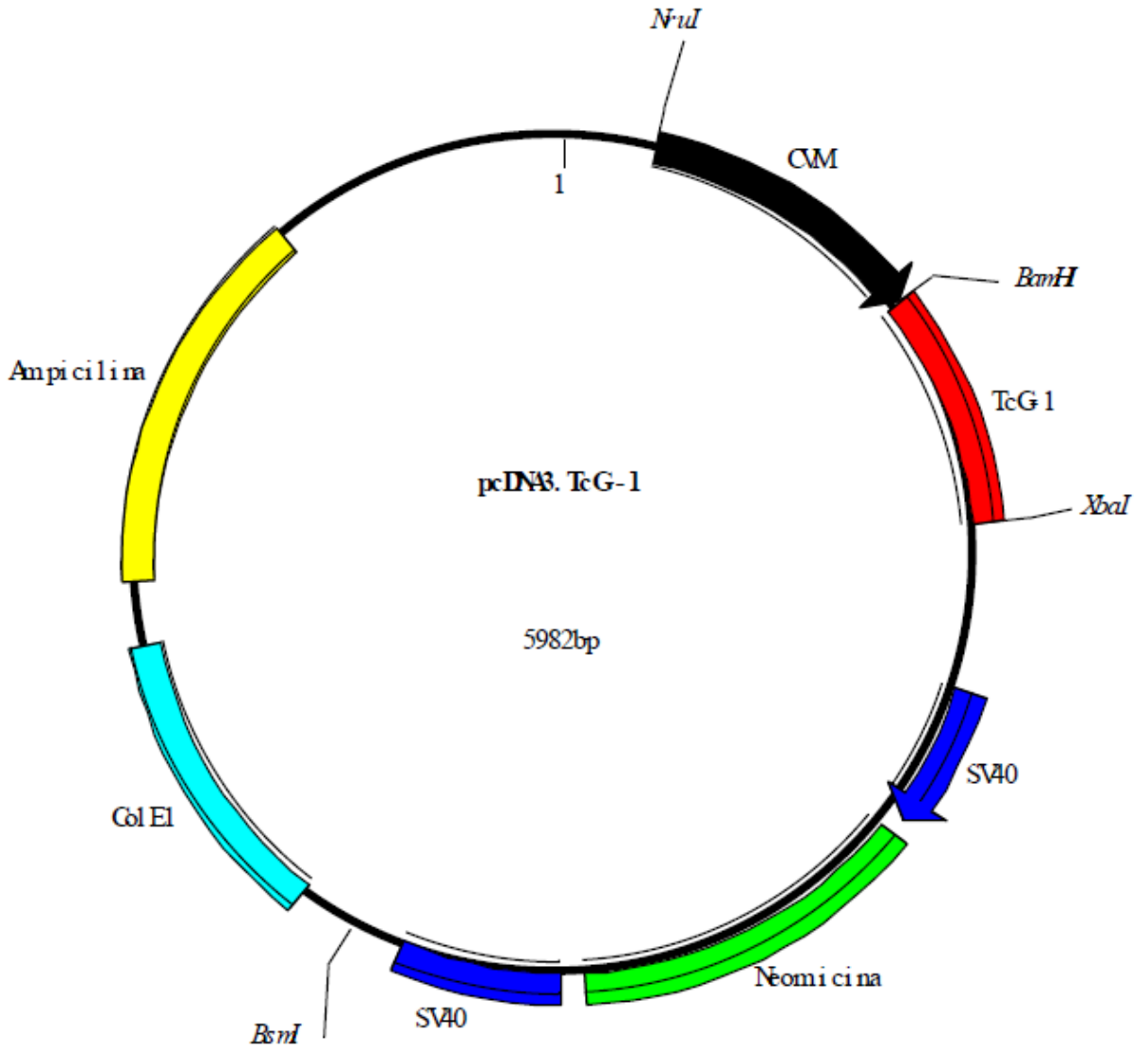
Wrightsman, R.A., Luhrs, K.A., Fouts, D., & Manning, J.E. 2002. Paraflagellar rod protein-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes target *Trypanosoma cruzi*-infected host cells. *Parasite immunology*, 24, (8) 401-412

Wrightsman, R.A. & Manning, J.E. 2000. Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, 18, (14) 1419-1427

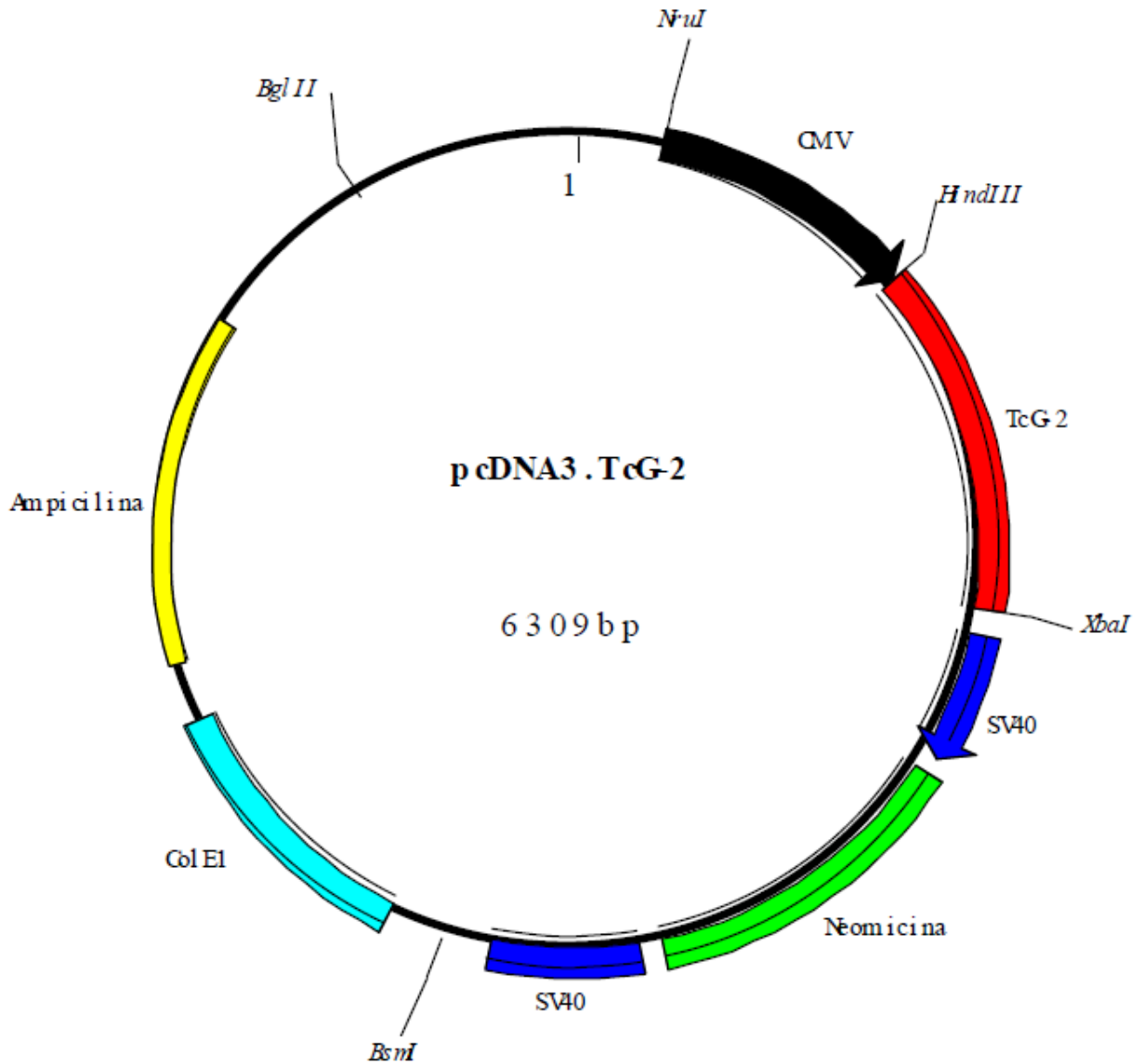
Zapata-Estrella, H., Hummel-Newell, C., Sanchez-Burgos, G., Escobedo-Ortegon, J., Ramirez-Sierra, M.J., Arjona-Torres, A., & Dumonteil, E. 2006. Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunology letters*, 103, (2) 186-191

Zárate, L.G. & Zárate, R.J. 1985. A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of México. *International journal of entomology*, 27, (1-2) 102-127

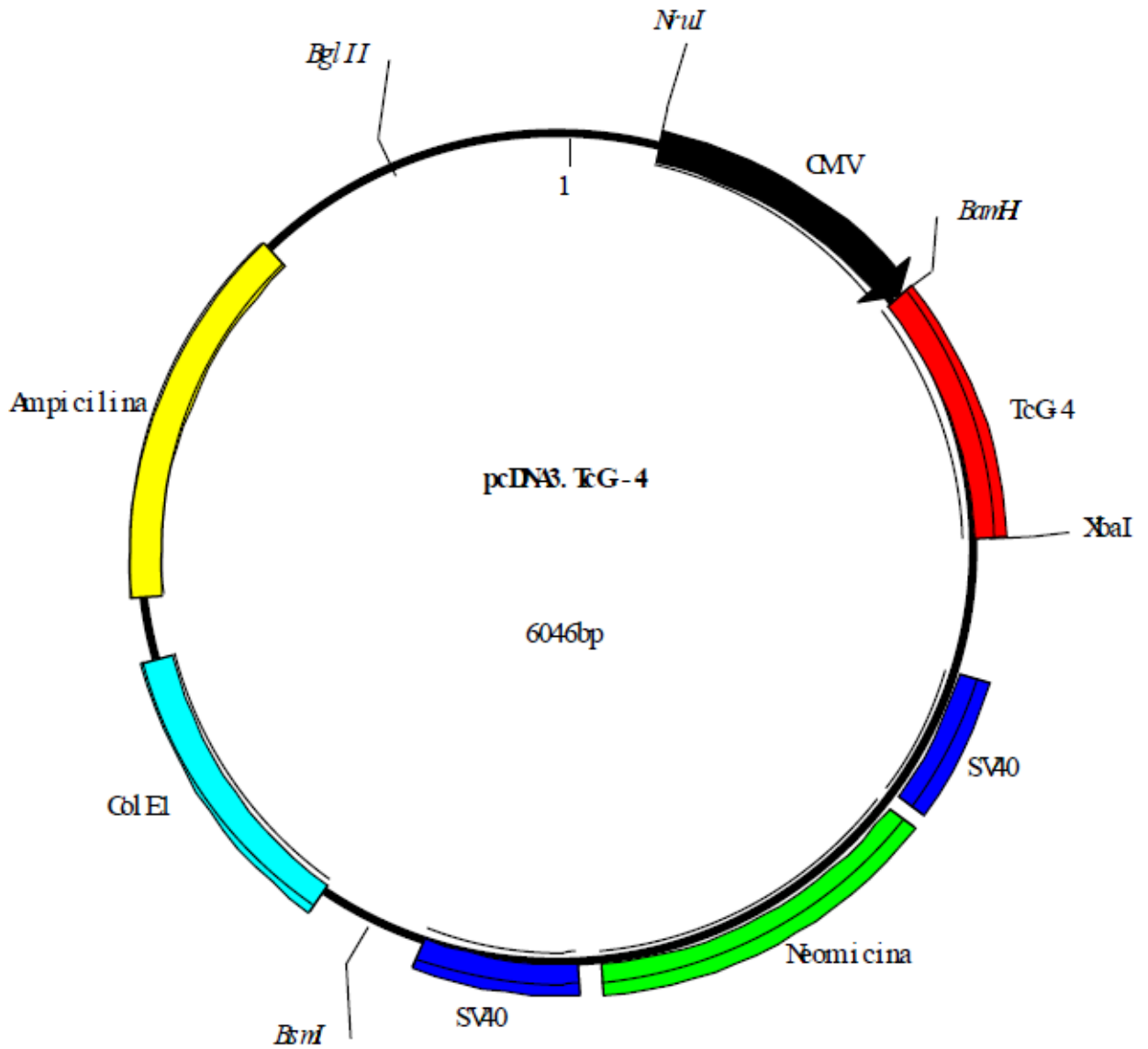
15. ANEXOS



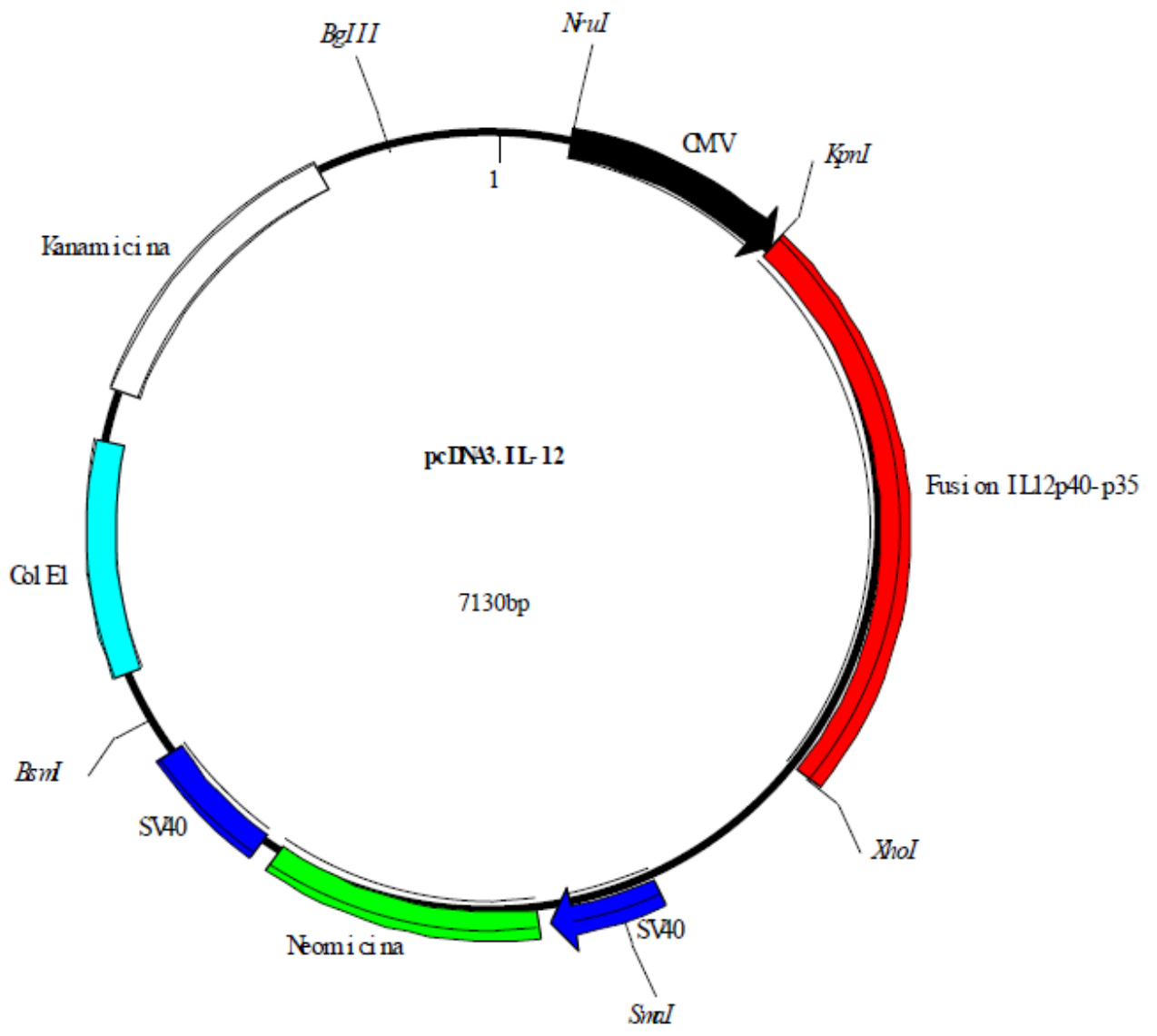
Anexo 1. Mapa del plásmido pcDNA3.TcG-1, en donde se clono en el sitio de restricción *Bam* HI/*Xba* I, el gen TcG-1 de 499 bp y con número de acceso del GenBank AY727914. Diseñado on el programa DNAMAN versión 3.0 (Lynnon BioSoft. Copyright©). 1 pcDNA3. TcG-1 5982bp CVM TcG-1 Ampicilina Col E1 Neomicina SV40 SV40BamHI Xbal BsmI NruI 81



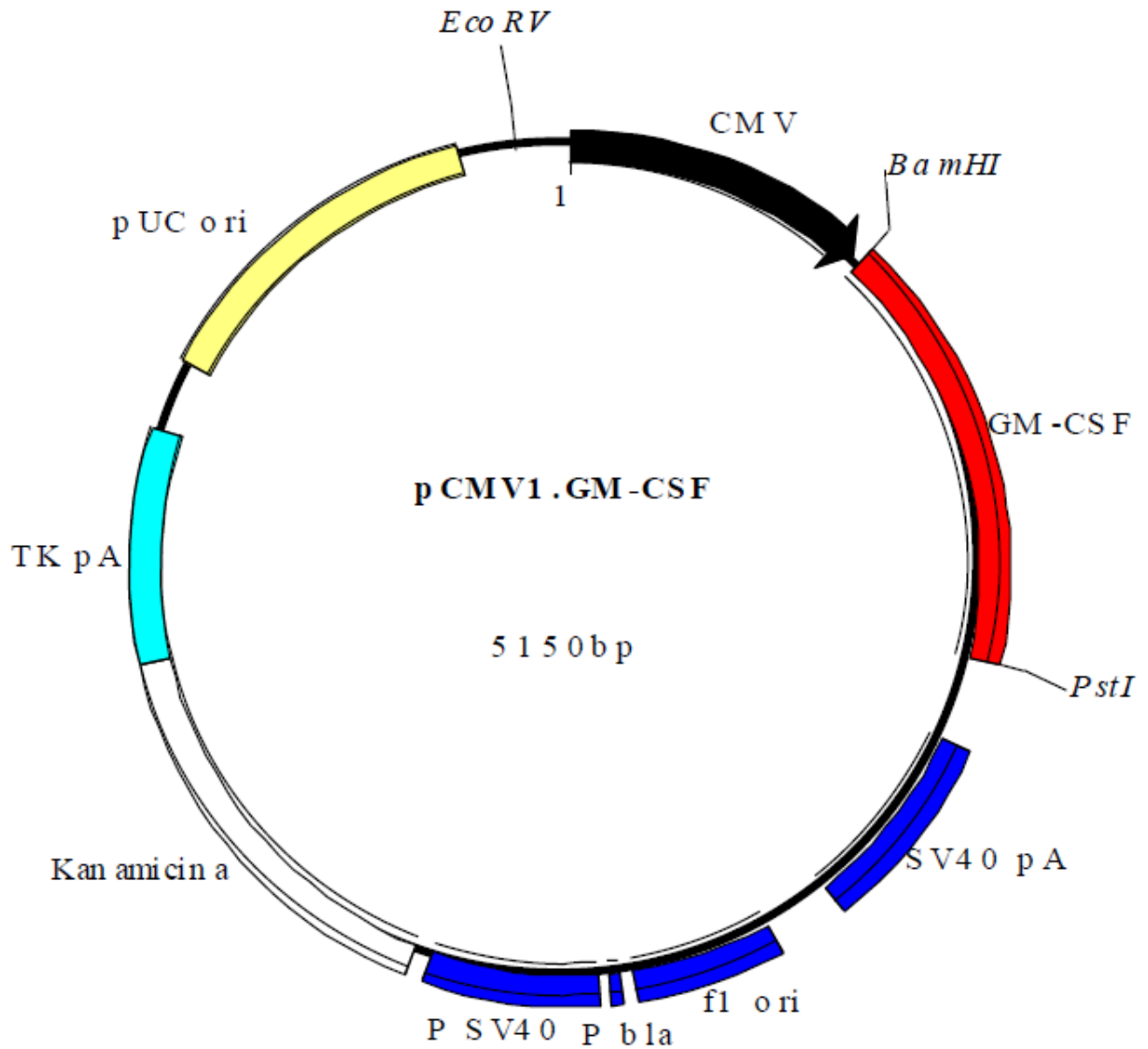
Anexo 2. Mapa del plásmido pcDNA3.TcG-2, donde se clono en el sitio de restricción *Hind III/Xba I*, el gen TcG-2 de 662 bp y con número de acceso del GenBank AY727915. Diseñado con el programa DNAMAN versión 3.0 (Lynnon BioSoft. Copyright©). 1 p cDNA3 .TcG-2 6309 bp CMV TcG- 2 SV40 Neomicina Ampicilina Col E1 SV40 NruI HindI II XbaI Bgl I I BsmI 82



Anexo 3. Mapa del plásmido pcDNA3.TcG-4, donde se clono en el sitio de restricción *Bam* HI/*Xba* I, el gen TcG-4 de 276 bp y con número de acceso del GenBank AY727917. Diseñado con el programa DNAMAN versión 3.0 (Lynnon BioSoft. Copyright©). 1 pcDNA3. TcG-4 6046bp ColE1 SV40 Ampicilina Neomicina CMV TcG-4 BamHI XbaI NruI Bgl I I BsmI 83



Anexo 4. Mapa del plásmido pcDNA3.IL-12, donde se clono en el sitio de restricción *Kpn I*/*Xho I*, los genes fusionados la subunidad p40 de 1015 pb (N° de acceso GenBank U49100) y la subunidad p35 de 665 pb (N° de acceso GenBank U49085). Diseñado con el programa DNAMAN versión 3.0 (Lynnon BioSoft. Copyright©). 1 pcDNA3. IL- 12 7130bp CMV SV40 Fusión IL12p40-p35 SV40 Neomicina Col E1 Kanamicina NruI KpnI XhoI Bgl I I BsmI SmaI 85



Anexo 5. Mapa del plásmido pCMV1.GM-CSF, donde se clono en el sitio de restricción *Bam* *HI*/*Pst* *I*, el gen GM-CSF de 850 bp y con número de acceso del GenBank S49738.1. Diseñado con el programa DNAMAN versión 3.0 (Lynnon BioSoft. Copyright©). 1 p CMV1 .GM-CSF 5150 bp CM V GM -CS FSV 40 p A f1 o ri P b la P S V4 0 Kanamicina TK p Ap UC o ri Ba mHI Pst I Eco RV