



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
INMUNOGÉNICA DE UN EXTRACTO ANTIGÉNICO
TOTAL LIPOSOMAL DE *Trypanosoma cruzi* EN
RATONES CD-1”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA
SALUD**

Presenta:

BIÓLOGA ABIGAIL GARCÍA CASTRO

Director de Tesis

DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

Codirector de Tesis

DR. JOSÉ LUIS IMBERT PALAFOX

San Agustín Tlaxiaca Hgo., Agosto de 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine
Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

6 AGO 2019



29/julio/2019

AAM/MCBS/083/2019

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

García Castro Abigail

Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico al jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Evaluación de la capacidad inmunogénica de un extracto antigénico total liposomal de Trypanosoma cruzi en ratones CD-1" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE	Dr. José Luis Imbert Palafox
PRIMER VOCAL	Dr. Marco Antonio Becerra Flores
SECRETARIO	M. en C Carmen Balderas Delgadillo
SUPLENTE	Dra. Eva María Molina Trinidad
SUPLENTE	Dr. José Ramón Montejano Rodríguez

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
DIRECTOR

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera
Pachuca-Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,
México, C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext: 4306
medicina@uaeh.edu.mx

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 794237.

DEDICATORIAS

A mi familia:

No hay forma de explicar cuan agradecida estoy con mis padres, que me dieron todo e hicieron de mí la persona que soy y que sin su apoyo no habría llegado hasta donde estoy y sé que con ustedes llegaré a ser mucho más.

A mi hermano, amigo de toda la vida, la persona que me quiere sin pedir nada a cambio, siempre estaremos juntos, te apoyo y me apoyas, te quiero mucho.

A mi amor, tú el que me has acompañado desde hace 9 años, tú el que me escuchas, me guías y me entiendes, tú que me acompañaste por estos dos años llenos de retos y me diste los ánimos y las palabras que necesitaba para seguir y no rendirme, siempre tú.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Doctor Marco Antonio Becerril Flores por haberme abierto nuevamente las puertas del laboratorio para dirigir un proyecto con tanta ambición y dedicación, siempre estaré agradecida con usted no solamente por la excelente dirección de este trabajo sino por el apoyo personal, la paciencia y todas las enseñanzas que me ha dado, y que sé que siempre me servirán para tener éxito en mi formación académica.

Al Doctor José Luis Imbert Palafox por su apoyo y amplia colaboración en este trabajo y por siempre atender mis dudas, le agradezco por las múltiples sugerencias y consideraciones durante el desarrollo de la investigación ayudándome a mejorar como estudiante e investigadora.

A todo mi comité tutorial Dra. Eva María Molina Trinidad, Dr. José Ramón Montejano Rodríguez, Dra. Carmen Balderas Delgadillo, les agradezco profundamente su tiempo y participación durante estos dos años en la realización del proyecto y que sin su aportación esta investigación no sería la misma.

Al Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez y la Dra. Jeannette Izquierdo Vega por guiarnos durante todo el proceso escritura de tesis y todo el trámite que conlleva realizar un posgrado.

A mis nuevas amistades que estuvieron conmigo y que juntas nos apoyamos durante todo este proceso a Gloria Camacho Bernal, Alejandra Salinas Peña y Elienaí Joaquín Damas, que nuestra amistad perdure por muchos años.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. ANTECEDENTES	15
2.1. Generalidades	17
2.1.1. Enfermedad de Chagas.....	17
2.1.1.1. Epidemiología.....	18
2.1.1.2. Características de <i>Trypanosoma cruzi</i> y ciclo biológico.....	19
2.1.1.3. Vías de transmisión.....	22
2.1.1.4. Patogénesis.....	22
2.1.1.5. Factores de resistencia o susceptibilidad de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
2.1.1.6. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas	23
2.1.1.7. Respuesta inmune a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
2.1.1.7.1. Antigenicidad.....	23
2.1.1.7.2. Respuesta celular.....	24
2.1.1.7.3. Respuesta humoral	24
2.1.2. Liposomas.....	24
2.1.2.1. Definición.....	24
2.1.2.2. Clasificación de liposomas.....	25
2.1.2.3. Uso de liposomas como vehículo de vacunas	25
2.1.3. Antígenos	25
2.1.3.1. Tipos de antígenos	26
2.2. Antecedentes del problema.....	26
2.2.1. Enfoque nanotecnológico contra enfermedades no atendidas.....	26

2.2.2. Uso de liposomas contra la enfermedad de Chagas y otras enfermedades infecciosas	27
2.3. Planteamiento del problema	28
III.-JUSTIFICACIÓN	29
IV.- HIPÓTESIS.....	29
V.- OBJETIVOS.....	30
5.1.-Objetivo general.....	30
5.2.- Objetivos específicos	30
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS.	31
6.1. Tipo de Estudio.....	31
6.2. Diagrama del diseño experimental	31
6.3. Métodos	32
6.3.1. Obtención y purificación del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
6.3.1.1. Principio.....	32
6.3.1.2. Procedimiento	32
6.3.2. Obtención del extracto antigénico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
6.3.2.1. Principio.....	32
6.3.2.2. Procedimiento	33
6.3.3. Medición de la concentración de proteínas por el método de Bradford.....	33
6.3.3.1. Principio.....	33
6.3.3.2. Procedimiento	33
6.3.4. Elaboración de liposomas.....	34
6.3.4.1. Principio	34
6.3.4.2. Procedimiento	35
6.3.5. Encapsulación del extracto antigénico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
6.3.5.1. Principio.....	35

6.3.5.2. Procedimiento	35
6.3.6. Inoculación de ratones CD-1	35
6.3.6.1. Principio.....	36
6.3.6.2. Procedimiento	36
6.3.7. Evaluación de la inmunización en ratones CD-1	36
6.3.7.1. Principio.....	37
6.3.7.2. Procedimiento	37
6.3.8. Medición de la presencia de <i>Trypanosoma cruzi</i> a ratones inmunizados	38
6.3.8.1. Principio.....	39
6.3.8.2. Procedimiento	39
6.4. Análisis estadístico	40
VII. RESULTADOS	41
7.1. Obtención y medición de proteínas del extracto antigénico.....	41
7.2. Obtención de liposomas.	42
7.3. Encapsulación del extracto antigénico total y soluble de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
7.5. Evaluación de la inmunización en ratones CD-1	44
7.5.1. Prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
7.5.2. Determinación de parasitemia en ratones CD-1	46
7.5.3. Cuantificación de macrófagos activados	51
7.5.4. Presencia de nidos de amastigotes en corazón	53
VIII.- DISCUSIÓN.....	56
VIII.- CONCLUSIÓN	60
X.- RECOMENDACIONES.....	61
XI.- REFERENCIAS	62
XII.- ANEXOS	70

12.1. Curva patrón para medición de proteínas.....	70
12.2. Preparación de medio LIT (infusión de hígado y triptosa).	70
12.3. Proceso de preparación para cortes histológicos de corazón.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas de desarrollo de <i>Trypanosoma cruzi</i> encontrados en el intestino y el recto de <i>Triatoma infestans</i>	20
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3. Método y zona de conteo en cámara de Neubauer.	39
Figura 4. Liposomas vistos a microscopio óptico 10x.	42
Figura 5. Liposomas con antígeno teñido encapsulado. 10x.	43
Figura 6. Liposomas sin antígeno 10x.	43
Figura 7. Promedio del título de anticuerpos presentes en ratones macho control e inmunizados.	44
Figura 8. Promedio del título de anticuerpos presentes en ratones hembra control e inmunizadas.	45
Figura 9. Niveles de parasitemia en ratones macho control e inmunizados.	47
Figura 10. Niveles de parasitemia en ratones hembra control e inmunizados.	48
Figura 11. Porcentaje de mortalidad en ratones macho control y ratones macho inmunizados.	49
Figura 12. Porcentaje de mortalidad en ratones hembra control y ratones hembra inmunizados.	50
Figura 13. Macrófagos y parásitos presentes en líquido peritoneal de ratón 100x.	51
Figura 14. Conteo de macrófagos y parásitos totales cuantificados en 20 campos.	52
Figura 15. Nidos de amastigotes en corazón 40x.	54
Figura 16. Tejido de corazón sin nidos de amastigotes, muestra negativa (-) 40x.	54
Figura 17. Nidos de amastigotes, se observa poca cantidad, muestra positiva (+) 40x.	54
Figura 18. Nidos de amastigotes, muestra positiva (++) 40x.	55
Figura 19. Nidos de amastigotes en alta cantidad, muestra positiva (+++) 100x.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diluciones para medición de concentración de proteínas presentes en los antígenos.	34
Tabla 2. Concentración de proteínas obtenida por el método de Bradford.	41
Tabla 3. Nidos de amastigotes en corazón.	53
Tabla 4. Diluciones para curva patrón para medición de proteínas.	70
Tabla 5. Reactivos para la elaboración de medio LIT.....	70
Tabla 6. Tinción Hematoxilina-Eosina para cortes de 3 micras.....	72

ABREVIATURAS

Ag Antígeno

HAI Hemaglutinación indirecta

IgG Inmunoglobulina G

LIT Infusión de hígado y triptosa

mL Mililitros

μL Microlitros

°C Grados Celcius

mg Miligramos

min Minutos

pH Potencial de hidrógeno

rpm Revoluciones por minuto

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o también conocida como Tripanosomiasis Americana (por su restricción en la zona continental de América), es una infección parasitaria causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* aislado por primera vez en Brasil por el médico investigador Carlos Chagas en 1909. El aislamiento fue producido de las heces de insectos hematófagos llamados triatominos, los cuales son los principales vectores de la infección en mamíferos. En el 2017 la Organización Mundial de la Salud reporta que el número de personas infectadas es de 6 a 7 millones, de las cuales en promedio mueren 50,000 y se estima que alrededor de 100 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad. De 30 a 40% de los pacientes infectados desarrollan una enfermedad crónica que comúnmente resultan en cardiomiopatías y disfunciones del tracto gastrointestinal. Considerando la importancia que la enfermedad conlleva, se han realizado distintas investigaciones en busca de una mejor alternativa para el control y cura de la enfermedad, entre ellas la búsqueda de fármacos y vacunas. En este contexto se ha probado el uso de nanocarriers, entre ellos liposomas, como vehículo para la administración de vacunas, capaces de producir una respuesta contra un antígeno, activando el sistema inmune y asegurando la protección contra futuras infecciones. Dicho vehículo se ha probado en enfermedades parasitarias como Malaria y Leishmaniasis. En el presente estudio se evaluará el efecto producido por un extracto antigénico de *Trypanosoma cruzi* a base de liposomas en ratones machos CD-1.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, vacuna, liposomas, antígeno, inmunización.

ABSTRACT

Chagas disease, is also known as American Trypanosomiasis (for its restriction in continental America zone), is a parasitic infection caused by the hemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi*, isolated for the first time in Brazil by the researcher Carlos Chagas in 1909. The isolation was produced from the feces of hematophagous insects called triatomines, which are the main vectors of infection in mammals. In 2004 the World Health Organization reports that the number of people infected is 6 to 7 million, of whom an average of 50,000 die and an estimated 100 million people are at risk of contracting the disease. From 30 to 40% of infected patients develop a chronic disease that commonly results in cardiomyopathies and dysfunctions of the gastrointestinal tract. Considering the importance of the disease, several investigations have been carried out in search of a better alternative for the control and cure of the disease, including the search for drugs and vaccines. In this context, the use of nanocarriers, including liposomes, has been proven as a vehicle for the administration of vaccines, capable of producing a response against an antigen, activating the immune system and ensuring protection against future infections. Such vehicle has been tried in parasitic diseases like Malaria and Leishmaniasis. In the present study we will evaluate the effect produced by a *Trypanosoma cruzi* antigenic extract based on liposomes using adult male CD-1 mice.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, vaccine, liposomes, antigen, immunization.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas solía ser una enfermedad endémica desde el norte de México hasta Argentina, actualmente debido a las continuas migraciones, la enfermedad afecta a varios países del mundo. El parásito tiene un complejo ciclo de vida, pues infecta diferentes especies, e invade una variedad de células, incluyendo células musculares, del corazón y del tracto gastrointestinal, en el huésped vertebrado. En ausencia de una vacuna, el control de vectores y el tratamiento de los pacientes son las únicas herramientas para controlar la enfermedad, ya que desafortunadamente, los únicos fármacos disponibles para la enfermedad de Chagas, el Nifurtimox y el Benznidazol, son relativamente tóxicos para los pacientes adultos y requieren una administración prolongada.

A pesar de que la enfermedad está ampliamente distribuida, aún no se ha encontrado una medida eficaz para contrarrestar la enfermedad, como podría ser una vacuna. El poder realizarla, implica combatir con la gran cantidad de mecanismos que el parásito tiene para evadir la respuesta inmune, escapando de las células fagocíticas y evitando los sistemas de citotoxicidad intracelular, también se desconocen los antígenos presentes en el parásito, los cuales participan en el desarrollo de la autoinmunidad.

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes técnicas en el uso de nanopartículas que son utilizadas para contrarrestar la infección de *Trypanosoma cruzi*, siendo los liposomas, estructuras vesiculares constituidas por una o más capas fosfolipídicas, uno de los vehículos de administración más prometedores debido a sus características que permiten el fácil acceso de los liposomas a la zonas deseada.

A pesar de que las pruebas antes mencionadas, el uso de los modelos en la administración de fármacos y otras sustancias mediante liposomas, han obtenido buenos resultados, también se han observado algunas desventajas como: residuos de solventes o detergentes utilizados en las técnicas de purificación y preparación de liposomas presentes en la membrana de dichas vesículas, la vida media de los liposomas en la sangre es limitada y la falta de eficacia en la encapsulación de productos hidrosolubles, que impide la diversificación de dichos elementos.

Aunque las investigaciones siguen avanzando, es importante la mejora de las técnicas de selección y purificación, así como la naturaleza de la sustancia elegida para encapsular. El estudio de estas propiedades y características nos pueden asegurar éxito en la administración de antígenos mediante liposomas como una forma de combatir la enfermedad de Chagas.

II. ANTECEDENTES

Antecedentes históricos

Desde 1909, cuando Carlos Chagas anunció sus descubrimientos en Brasil, sobre evidencias clínicas del agente causal y los vectores de la enfermedad, se iniciaron las investigaciones en América Latina. Un año antes de la descripción del agente causal y la enfermedad, el Doctor Chagas estudió un caso particular, del cual se sospechaba paludismo y fue donde por primera vez se observaron tripanosomas móviles en la sangre periférica de un humano en América (1).

En 1913 se desarrolló la primera técnica utilizada para el diagnóstico de la enfermedad, la cual consiste en la reacción de fijación de complemento (RFC) (2), que más tarde, fue usada como estudios de diagnóstico serológico, serodiagnóstico y estudios seroepidemiológicos. En ese mismo año Brumpt, descubrió y describió el mecanismo natural con el que actúa el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que consiste en la picadura y entrada del parásito al torrente sanguíneo por medio de las heces del triatomino vector (3).

En México en 1928, en Las Choapas-Veracruz, se reportó por primera vez la presencia de triatominos en nuestro país, correspondiendo a la especie *Triatoma dimidiata* unos de los transmisores más importantes (4), aunque hay un reporte que aparentemente registra su presencia ya desde 1899 por Champion, sin embargo no es claro (5), Hasta 1940 Mazzoti anunció los dos primeros casos humanos de una infección con *Trypanosoma cruzi*, específicamente en Tejomulco-Oaxaca, México (6). El Doctor Luis Mazzoti Galindo, ha sido uno de los Chagólogos más destacados en México, observó la infección natural de *Trypanosoma cruzi* en distintas especies de triatomino, describiendo su distribución geográfica en México, destacando especies como: *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma rubida*, también se le adjudica el descubrimiento de múltiples especies (7,8).

Entre 1949 y 1959 se describen varios casos de la enfermedad de Chagas en Yucatán y Sonora, descubrimientos realizados por Palomo-Erosa y Palencia & Montaña respectivamente (9,10). En 1976, Ortega y col. Confirman un alto porcentaje de diagnósticos positivos en León Brindis, Chiapas, con un total de 76.7%, observando una infestación *Rhodnius prolixus* en viviendas humanas (11). Por la década de los 80's Reyes y col., (12) realizan estudios sobre la cardiopatía crónica afectada por el parásito y es donde Tay y col. igualmente describen una de las patologías más comunes que ocurren durante la etapa crónica de la enfermedad, describiendo el primer caso de megacolon en nuestro país (13).

Después de 90 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, se propusieron cuatro periodos de evolución sobre los casos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad; a) Primeros estudios sobre la enfermedad de Chagas en Lassance (Municipio brasileño localizado en el norte del estado de Minas Gerais), en donde se describió la infección y los vectores, b) Periodo de incertidumbre y reportes de casos aislados, en esta etapa la tripanosomiasis fue reconocida en varios países latinoamericanos, c) Periodo de consolidación de los conocimientos y de reconocimiento de la enfermedad de Chagas como una extensa entidad endémica rural, en este periodo se describió la cardiopatía chagásica principal causa de muerte en la enfermedad de Chagas y por último d) período de ampliación de los conocimientos sobre la enfermedad (14).

Algunos países de Latinoamérica como Uruguay, Brasil y Chile, están avanzando en el control de la enfermedad de Chagas, mediante medidas nacionales que se enfocan en el control de los triatomos que existen en las poblaciones rurales, también en el tamizaje de la sangre de transfusión, así como en el apoyo terapéutico para los casos infectados de *T. cruzi*. Uruguay, Chile y la mayor parte del sur de Brasil, ya están certificados por la OPS (Organización Panamericana de la Salud), como libres de la transmisión de la enfermedad de Chagas. Por otro lado en los países de Perú, Ecuador y México, se encuentran en las fases iniciales de la planeación de las campañas de control de la enfermedad (15).

2.1 Generalidades

2.1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, es una zoonosis causada por *T. cruzi*, un protozooario hemoflagelado transmitido a vertebrados susceptibles por hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae. Fue reportada por primera vez en 1909 por Carlos Chagas, este investigador descubre la enfermedad en el estado brasileño Minas Gerais y describe los hechos etiológicos, clínicos, epidemiológicos y parasitológicos que le conciernen. Está restringida al área continental de América, por lo que se denomina también tripanosomiasis Americana (16).

La enfermedad de Chagas presenta tres fases, aguda, intermedia y crónica.

Fase aguda: En esta etapa se pueden encontrar parásitos después de 14 a 28 días y hasta 6 meses, a partir de la infección. Se caracteriza por una intensa multiplicación parasitaria. Es más visible en menores de 6 años, la mortalidad en esta etapa es muy baja. Es común que en esta etapa se produzca una lesión inflamatoria en la puerta de entrada del parásito y se le conoce con el nombre de chagoma, cuando se compromete el párpado se le llama signo de Romaña-Mazza, se caracteriza por la inflamación indolora de ambos párpados, con presencia de pápulas rojizas y edema (17,18)

La fase aguda puede durar hasta 60 días y se caracteriza por malestar general, fiebre continua, dolores musculares, epistaxis, escalofrío, hepatoesplenomegalia y esplenomegalia, además de que el individuo también llega a presentar astenia y adinamia, anorexia, vómitos, diarrea, postración y cefalea (19), generalmente esta fase pasa desapercibida debido a que los síntomas suelen muy leves.

Fase intermedia: Este período que va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica es llamado latente o indeterminado con una duración media de hasta 20 años. En esta fase el paciente es asintomático a pesar de las complicaciones que se inician en el corazón y el tubo digestivo. Puede haber manifestaciones electrocardiográficas, en ocasiones muy inespecíficas (20).

Fase crónica: Esta fase se caracteriza por lesiones típicas del corazón o tubo digestivo, durante esta etapa la patología más importante es la cardiopatía chagásica, es muy frecuente la muerte súbita sin haber desarrollado insuficiencia cardíaca, se presenta hasta 10 años o más después de la fase aguda. Las manifestaciones clínicas del corazón dependen de la extensión de las lesiones de este órgano y son frecuentes las palpitaciones, los mareos, náuseas, diarrea, dolor pectoral, síncope y edema (20).

2.1.1.1 Epidemiología

Esta enfermedad es una infección zoonótica y afecta tanto a animales domésticos y salvajes como al hombre (21). La enfermedad de Chagas es transmitida por insectos hematófagos nocturnos, que pertenecen al Orden Hemíptera y corresponde a tres géneros de la Familia Reduviidae, conocidos como reduvidos o triatominos. El nombre de las especies por las que son popularmente conocidas varían en los diferentes países y según la región en la que se encuentre, algunos de los nombres son: “chinchas besuconas, vinchucas, pitos, barbeiros, “chupos”, entre otros. Estos insectos suelen habitar en las grietas de las casas rurales, saliendo de noche para alimentarse, en la cual el hombre es víctima (22). Las vías de transmisión hacia el hombre pueden ser: el insecto transmisor infectado, transfusión de sangre contaminada, transmisión congénita.

Otros mecanismos de transmisión menos frecuentes son los trasplantes de órganos procedentes de donantes parasitados, accidentes de laboratorios, por lactancia materna o por vía oral (ingestión de carne semicruda o sangre de animales parasitados y de bebidas contaminadas con materia fecal de triatominos) (23).

2.1.1.2 Características de *Trypanosoma cruzi* y ciclo biológico

El parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* es un protozoario que pertenece al:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subfilum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Subgénero: *Schizotrypanum*

Especie: *Trypanosoma cruzi*

Su nombre taxonómico completo es: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (24–26).

Este protozoario existe en al menos tres formas morfológicamente distintas (Figura 1): tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos, los cuales se caracterizan por ser la forma infectante dentro del ciclo; los epimastigotes, que se encuentran principalmente en el insecto vector y en los cultivos donde se mantienen a los parásitos; y los amastigotes que se encuentran dentro de la célula infectada de cualquier mamíferos (17,27).

El tripomastigote presenta una forma alargada, fusiforme y presenta una membrana ondulante bordeada por un flagelo que se inicia en el cinetoplasto y sale del parásito por su extremo anterior, su tamaño aproximado es de 20 μm de longitud, posee un núcleo grande cerca de la parte central de su cuerpo (28).

Los epimastigotes presentan un cinetoplasto y al igual que el tripomastigote tiene una longitud aproximada de 20 μm , presenta un flagelo libre, es en ésta etapa donde el parásito se multiplica asexualmente en el intestino medio del vector (29). Los amastigotes presentan una forma redonda u ovoide, mide aproximadamente de 1.5 a 4 micras, el cinetoplasto posee una forma de bastón o esférico, se reproduce por fisión binaria, formando nidos en el interior de las células.

El tamaño notoriamente grande de este parásito permite diferenciarlo del resto de las demás especies de tripanosomas (28).

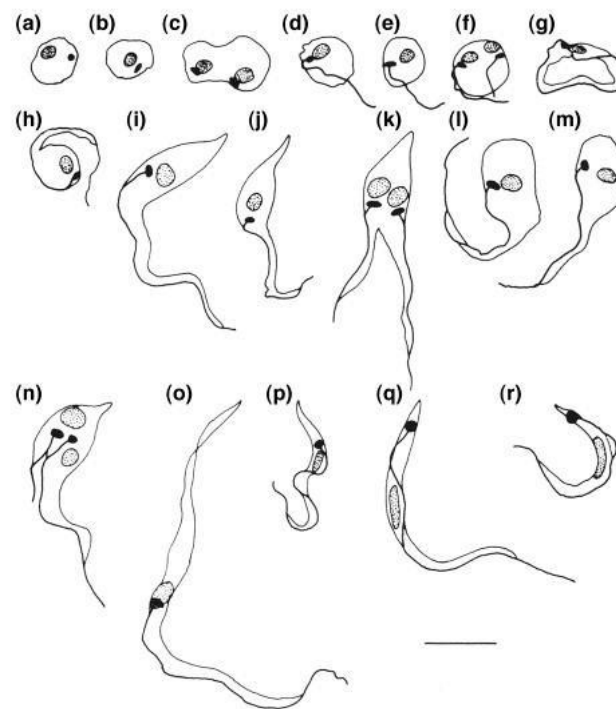


Figura 1. Formas de desarrollo de *Trypanosoma cruzi* encontrados en el intestino y el recto de *Triatoma infestans*. Amastigotes (a-c) y Esferomastigotes (d-f) con cinetoplasto redondo (a, d) y con cinetoplasto horizontal (b, e), etapas de división (c, f); Fases intermedias de Esferomastigotes y Epimastigotes, de forma circular (g) o forma enrollada (h); Epimastigotes de forma larga (i) corto (j) o en fase de división (k); formas intermedias entre Esferomastigotes (o Epimastigotes) y Tripomastigotes con un centro posterior y un cinetoplasto lado (l) o al lado posterior del núcleo (m); formas intermedias entre Epimastigotes y Tripomastigotes, incluyendo divisiones diferentes (n) y las etapas largas y delgadas (o) o corto (con un cinetoplasto al lado o detrás del núcleo, pero no subterminal) (p); Tripomastigotes con un cinetoplasto subterminal largo (q) o corto (r) (30).

Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo inicia cuando un vector se infecta al chupar la sangre del hombre o mamíferos con tripomastigotes sanguíneos (Figura 2). En el intestino de los insectos los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes y en el recto sufren otra transformación a tripomastigotes metacíclicos, la forma infectante para el huésped vertebrado los cuales finalmente son eliminados por las heces de la chinche (31). Y la misma persona al rascarse se introduce el parásito; los parásitos entran a las células susceptibles, transformándose en amastigotes, se replican intracelularmente y formando nidos, éstos son liberados a la circulación sanguínea y se convierten en tripomastigotes. Éstos entran a otras células para repetir el ciclo o son ingeridos por el insecto vector (32). En esta etapa se asegura la transmisión de la enfermedad debido a la elevada parasitemia.

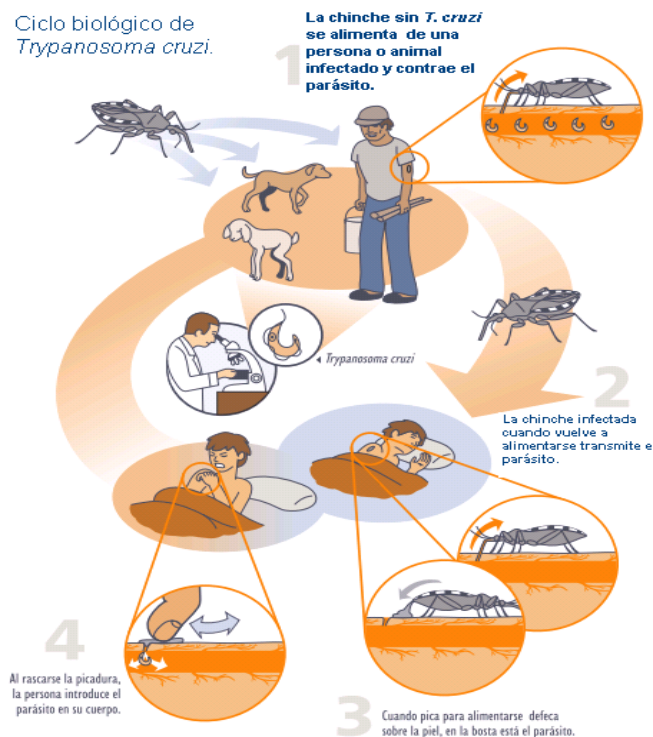


Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (33).

2.1.1.3 Vías de transmisión

Transmisión por transfusión sanguínea

Actualmente la transmisión por transfusión sanguínea es la segunda causa de infección por *T. cruzi*, después de la transmisión vectorial. La enfermedad de Chagas, es potencialmente transmisible por transfusión sanguínea, por lo que debe ser estudiada principalmente en zonas endémicas donde existan donadores infectados (34).

Transmisión congénita

Se trata de una de las vías más importantes, junto a la vectorial y comienza a adquirir mayor relevancia precisamente en las regiones endémicas donde está presente la enfermedad (35). Este tipo de transmisión se da cuando ocurre el paso intrauterino de *T. cruzi* al embrión, aunque los parásitos también pueden pasar a través de la leche materna al recién nacido (36).

Transmisión accidental

Ocurre en laboratorios u hospitales, y se da por el manejo inadecuado del material biológico contaminado por parte de los mismos investigadores, o del personal colaborador y auxiliar. Por ejemplo: manejo de triatominos, cultivos, animales de experimentación infectados, manejos de sangre de pacientes, entre otros.

2.1.1.4 Patogénesis

Los daños producidos por el parásito son muy variados, ocasionan una invasión en gran cantidad de tejidos y órganos como el corazón, cerebro, hígado, bazo, músculos, etc. Entre las patologías más comunes se encuentran: la producción de la miocarditis chagásica, megacolon y megaesófago. Por la evidencia de las lesiones, Meira de Oliveira, propone la teoría inflamatoria y la teoría alérgica, en donde explica que las lesiones se deben a fenómenos de inmunoalergia, causados por el producto de los desechos de los parásitos (37).

2.1.1.5 Factores de resistencia o susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi*.

Se han realizado distintas investigaciones para explicar si existe un grado de resistencia presente en mamíferos, Hoft y col. realizan un experimento donde observan que cepas endogámicas de ratones presentan respuestas inmunes diferentes y contradictorias, demostrando que existen cepas muy resistentes y cepas altamente susceptibles, lo que sugiere que existe una actividad genética presente involucrada en la resistencia del hospedero, hasta ahora, con diversos modelos experimentales, no se conocen con certeza los factores involucrados en la resistencia o susceptibilidad a la infección con este parásito (38).

2.1.1.6 Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas

Actualmente se cuenta con dos medicamentos para el tratamiento de esta parasitosis. Nifurtimox y Benznidazol. Los medicamentos tripanocidas están indicados en la infección aguda del niño y del adulto, en la infección congénita y en la crónica reciente. Hasta el momento no existe un fármaco del todo efectivo e inocuo para el paciente contra la enfermedad, dado que los medicamentos, no son por completo eficaces en todas las fases de la enfermedad o producen grandes efectos colaterales (24).

2.1.1.7 Respuesta inmune a la infección por *Trypanosoma cruzi*.

2.1.1.7.1 Antigenicidad

Se han realizado distintos estudios para detectar las diferencias antigénicas presentes en *Trypanosoma cruzi*, demostrando en algunas cepas, la presencia de antígenos específicos en la superficie del parásito, además de comprobar la presencia de glucoproteínas presentes en todas las cepas. Los antígenos codificados por genes clonados de *T. cruzi* son reconocidos específicamente por sueros de diferentes pacientes con enfermedad aguda o crónica, pero no se ha logrado aún tipificar las cepas de *T. cruzi* sobre la base de las características antigénicas (39).

2.1.1.7.2 *Respuesta celular*

La respuesta celular requiere de distintos mecanismos, uno de ellos es la producción de potentes anticuerpos para combatir las formas extracelulares e intracelulares del parásito. En los estadios iniciales, es importante la inmunología innata a través de sus moduladores celulares y moleculares, por ejemplo las citosinas (CK) juegan un papel muy importante en el momento de la infección, ya que su actividad, determina la duración de distintas vías inmunológicas (40). Esta respuesta mantiene un balance entre la actividad hospedero-parásito, donde varios tipos de células actúan contra los tripomastigotes cubiertos de anticuerpos que pueden presentar gran variedad de formas, ayudando a combatir la parasitemia (41).

2.1.1.7.3 *Respuesta humoral*

Se caracteriza por ser una respuesta a varios antígenos del parásito que dependen del estadio y de la fase de la infección, ya sea aguda o crónica (42). Se sabe que los tripomastigotes metacíclicos poseen moléculas de invasión celular, por lo que la inmunidad inducida en un estadio, no es garantizada para la siguiente generación de tripomastigotes. Algunos epítomos del parásito pueden desarrollar una reacción cruzada con sus antígenos propios, desarrollando un proceso autoinmune (43).

2.1.2 *Liposomas*

2.1.2.1 *Definición*

Los liposomas son vesículas microscópicas compuestas de una doble capa de lípidos que encierran un interior acuoso, están compuestas principalmente de fosfolípidos (44). Estas vesículas se utilizan para estudiar el comportamiento de las membranas biológicas, debido a la similitud que poseen en su estructura, composición y funciones (45).

2.1.2.2 Clasificación de liposomas

Para la clasificación de liposomas se toma en cuenta su tamaño y el número de bicapas que conforman la pared liposomal: vesículas unilamelares pequeñas (SUV), grandes vesículas unilamelares (LUV), gigantes vesículas unilamelares (GUV), vesícula multivesicular (MVV), vesículas multilamelares (MLV), vesículas oligomelares.(OLV) (46).

Dependiendo de las aplicaciones dadas a los liposomas y las modificaciones que se realizan en su estructura, presentan la siguiente clasificación: Liposomas convencionales, de circulación prolongada, catiónicos e inmunoliposomas (47).

2.1.2.3 Uso de liposomas como vehículo de vacunas

Uno de los campos con mayor interés en el ámbito biomédico y biofarmacéutico, es el desarrollo de vacunas ya sea para la prevención o control de enfermedades infecciosas, así como el diseño de vacunas contra el cáncer o Alzheimer (48).

Existen distintas estrategias que permiten la elaboración de vacunas, pero los liposomas son los vehículos más prometedores, debido a su estabilidad, incompatibilidad y capacidad de incorporar moléculas inmunogénicas (49). La encapsulación de fármacos o sustancias dentro de los liposomas permite una mejor dosificación y una aplicación puntual sin recurrir a la invasión, debido a que los liposomas llegan específicamente al punto deseado del organismo (50).

2.1.3 Antígenos

Los antígenos se pueden definir como aquella molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria que reacciona de manera específica con un anticuerpo (51).

2.1.3.1 Tipos de antígenos

Un antígeno puede ser una proteína, polisacárido, lípido o ácido nucleico o una combinación de éstos, puede ser soluble o insoluble simple o complejo, y poseer determinantes antigénicos diferentes (51).

- Según su origen los antígenos se clasifican en naturales, artificiales (naturales modificados) y sintéticos (generados en laboratorio).
- Por su función se clasifican en Inmunógenos (inducen una respuesta inmune), Hapteno (Se une a un carrier) y Tolerógeno (producen una tolerancia inmunológica).

Los antígenos completos son capaces de producir una respuesta inmune y de unirse específicamente a anticuerpos y receptores de los linfocitos B y T generados (52).

2.2 Antecedentes del problema.

2.2.1 Enfoque nanotecnológico contra enfermedades no atendidas

Existen nuevas alternativas que propician un avance contra enfermedades no atendidas, específicamente hablando de la enfermedad de Chagas, en donde el uso de nanocarriers o nanotransportadores se ha visto como una técnica prometedora, debido a su baja toxicidad, eficacia y biodisponibilidad mejorada en los fármacos, ya que la liberación de dichos componentes es prolongada y se necesitan menos aplicaciones: Algunos ejemplos de algunos nanocarriers utilizados contra la enfermedad de Chagas son: liposomas de estearilamina, nanoesferas de poliaquil cianocrilato (PACA), proteoliposomas, nanoesferas cargadas con alopurinol (ALL-NS) liposomas convencionales y sensibles al pH (53).

2.2.2 *Uso de liposomas contra la enfermedad de Chagas y otras enfermedades infecciosas.*

A pesar de las distintas medidas de control y prevención, la enfermedad sigue presente ya que año con año se detectan nuevos casos positivos, afortunadamente las investigaciones siguen avanzando en busca de nuevas técnicas de control, un ejemplo de ello es la búsqueda de vacunas, como en el estudio de Morilla y col. (2005) en el cual realizaron un modelo experimental para la administración de un fármaco tripanocida usando liposomas de colesterol como vía de administración, dando como resultado la reducción del número de tripomastigotes sanguíneos y demostrando la existencia de sistemas para la entrega selectiva de fármacos al citoplasma de células fagocíticas (54).

Se ha demostrado que el uso de liposomas como portadores de antígenos apropiados para la generación de anticuerpos, así como vehículos eficaces para péptidos y proteínas, aumenta la inmunogenicidad del huésped (55).

Mesa y col., han demostrado que los proteoliposomas (proteínas implantadas en liposomas), pueden actuar como un coadyuvante para la inducción de linfocitos Th1 activando células dentríticas y demostrando que los liposomas portadores de albúmina de huevo promueven la producción del INF- γ que depende del contenido de fosfatidilserina en las vesículas (56). También se ha observado como los liposomas de colesterol pueden inducir a una protección contra la infección de promastigotes (57).

Otro ejemplo sobre el uso de liposomas en enfermedades infecciosas, es el modelo realizado por Ghosh, en donde se corrige la presentación de antígenos por medio de liposomas que contienen colesterol, todo esto con intención de combatir la Leishmaniasis visceral, demostrando que el colesterol liposomal puede estimular el sistema inmune innato y reactivar la función de los macrófagos, pues niveles aumentados de especies de oxígeno reactivas (ROS) e intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI), junto con citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), corroboran la muerte de parásitos intracelulares, lo que sugiere que la captación de colesterol está asociado con la apoptosis de macrófagos infectados (58).

2.3. Planteamiento del problema

La enfermedad de Chagas representa un grave problema de salud en todo el continente Americano, ya que existen alrededor de 6 a 7 millones de personas infectadas, y se estima que 100 millones de ellas están en peligro de contraer la enfermedad (59). En los últimos años, se han implementado programas que buscan la detección de la enfermedad por transfusión sanguínea, en determinados bancos de sangre. También, existen programas de fumigación y uso de insecticidas en las zonas endémicas y áreas de transmisión vectorial para disminuir la sobrevivencia de triatomíneos transmisores, pero estas zonas no han disminuido (60). Otras estrategias de prevención actuales, son difíciles y costosas, como la implementación de programas para el mejoramiento de viviendas, monitoreo de personas infectadas y el uso de insecticidas contra el triatómino vector, son algunos ejemplos. Aunque hoy en día no existen vacunas contra la enfermedad de Chagas, la necesidad de la aplicación de una vacuna, que surgió hace unas décadas, a base de inoculación de ADN, antígenos completos o antígenos específicos, no han producido resultados eficaces.

Otro método de control y prevención contra la transmisión de *Trypanosoma cruzi*, incluye el uso de nanotecnologías, utilizando diferentes nanocarriers que funcionan como medio de administración de distintos fármacos (55), en este contexto se ha observado que la eficacia depende de los tipos de nanocarriers utilizados y de los antígenos administrados (47). Uno de los métodos más comunes es el uso de liposomas para diseño de vacunas, ya que existen estudios que aseguran que el uso de liposomas de colesterol promueve la activación de macrófagos facilitando la muerte intracelular de algunos parásitos (58), también se han probado distintos modelos utilizando liposomas de distinta naturaleza, conteniendo diferentes antígenos. El proyecto plantea la administración de un extracto antigénico completo y un extracto soluble mediante el uso de liposomas, dicho modelo no ha sido probado contra la infección *Trypanosoma cruzi*, destacando la importancia del planteamiento de una nueva técnica para la erradicación de la enfermedad.

III.-JUSTIFICACIÓN

La tripanosomiasis americana es una infección mortal, con alta morbilidad, donde afecta principalmente el continente americano, México es considerado como un país endémico de esta enfermedad, según datos de la OMS actualmente existen 1.1 millones de personas infectadas en nuestro país. La gente que habita en las zonas donde existen los triatominos se encuentra en alto riesgo. Las estrategias para erradicar la enfermedad, se basan en la eliminación del insecto mediante el uso de insecticidas, provocando intoxicaciones en la población, daños a la naturaleza y hasta aumentos en la resistencia de los triatominos sobre el insecticida, sin olvidar los gastos económicos que se generan con el uso de este método.

Los intentos de vacunas que actualmente se han realizado no funcionan, son difíciles de realizar y representan un alto costo. El crear una vacuna a base de liposomas aumentará la respuesta inmune celular contra la enfermedad y permitirá disminuir la infección sin el uso de insecticidas y otros métodos tóxicos, como la medicación de Benznidazol y Nifurtimox, por lo tanto habrá más control de la transmisión de *T. cruzi* y como consecuencia habrá menos personas infectadas, que como se sabe presentan problemas cardíacos, que conducen al ausentismo en los lugares laborales o escuelas e incluso habrá menos inversión en la atención médica, compra de medicamentos, atención hospitalaria y sobre todo la erradicación total de la enfermedad. La fácil administración y la rapidez en la elaboración de la vacuna a base de liposomas, representa un menor costo en comparación con otros modelos estudiados, probando así un nuevo método para el control y eliminación de la enfermedad de Chagas.

IV.- HIPÓTESIS

El uso de liposomas como vía de administración de extracto antigénico de *Trypanosoma cruzi*, propiciará la producción de anticuerpos y la activación de macrófagos que actuarán contra el parásito en ratones CD-1.

V.- OBJETIVOS

5.1.-Objetivo general

Evaluar un inmunógeno a base de un extracto antigénico liposomal de *T. cruzi* en ratones CD-1, como propuesta de vacuna para la enfermedad de Chagas.

5.2.- Objetivos específicos

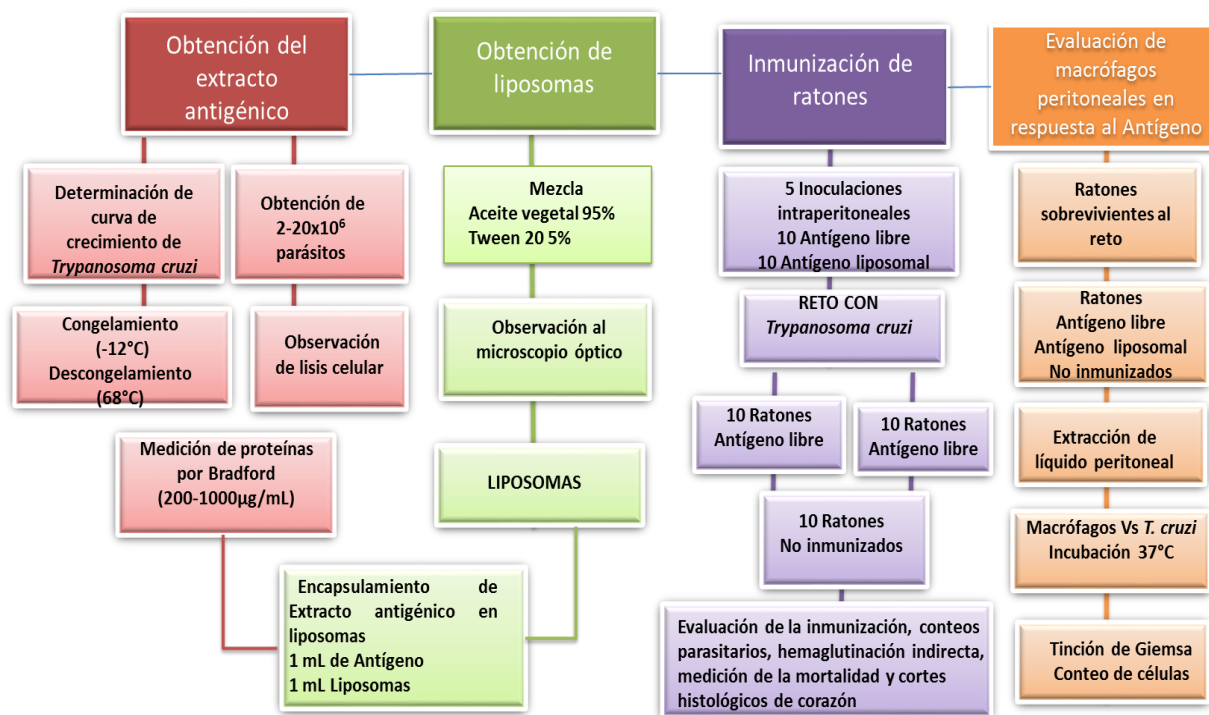
1. Obtener el extracto antigénico total de *Trypanosoma cruzi* a partir de medios de cultivo de medio LIT.
2. Elaborar liposomas para la encapsulación del extracto antigénico de *Trypanosoma cruzi*.
3. Evaluar la inmunización a *T. cruzi* en ratones CD-1, mediante la técnica de hemaglutinación indirecta.
4. Inducir la activación de macrófagos peritoneales de ratones CD-1 inmunes a *Trypanosoma cruzi*, realizando ensayos de infección con *Trypanosoma cruzi* en modelos *in vitro*.
5. Determinar el efecto de la inmunización contra *Trypanosoma cruzi* por medio de la infección con una cepa virulenta a partir de conteos parasitológicos y cortes histológicos de corazón.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Tipo de Estudio

El presente estudio se trata de una investigación básica de tipo experimental.

6.2 Diagrama del diseño experimental



6.3 Métodos

6.3.1 Obtención y purificación del parásito *Trypanosoma cruzi*

El parásito *Trypanosoma cruzi* se cultiva en el laboratorio anexo a Histología del Instituto de Ciencias de la Salud, fue aislado de la chinche *Triatoma barberi* por el Doctor Marco Antonio Becerril Flores.

6.3.1.1 Principio

En el laboratorio se mantiene viable el parásito en medio LIT (Infusión de hígado y triptosa), el cual es el más adecuado para pruebas inmunológicas y bioquímicas pues permite el control del crecimiento de la población de parásitos, se sabe que es importante la relación que tiene el crecimiento de tripomastigotes en el medio de cultivo con el aumento de la concentración de la hemina, uno de los ingredientes principales en la elaboración de medio LIT (61).

6.3.1.2 Procedimiento

El parásito fue conservado en tubos de vidrio de 13x10 con 5 mL de medio LIT (ver anexos) e incubado a 28°C realizando pases cada 15 a 21 días, logrando el máximo desarrollo en su crecimiento. La manipulación se hizo en un gabinete de bioseguridad tipo II/AB, para mantener condiciones de total esterilidad.

6.3.2 Obtención del extracto antigénico de *Trypanosoma cruzi*

El extracto antigénico se obtuvo a partir de *Trypanosoma cruzi*, con la finalidad de ser encapsulado en liposomas y administrarse vía intraperitoneal a ratones CD-1.

6.3.2.1 Principio

La aplicación de antígeno liposomal de *T. cruzi* permitirá la producción de anticuerpos activando el sistema inmune, el cual actuarán contra el parásito obteniendo así ratones CD-1 inmunizados, que posteriormente serán infectados con el parásito y se observará como actúan los antígenos contra la enfermedad de Chagas.

6.3.2.2 Procedimiento

El antígeno de *T. cruzi* se obtuvo por congelación y descongelación. Se obtuvieron cultivos con un número de parásitos de 2 a 20×10^6 /mL, los cuales se lavaron 3 veces con PBS 1 M a pH 7.2 y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga marca Hemle, posteriormente se resuspendieron en un tubo de vidrio de 13x10 en un volumen final de 5 mL, se sometieron a una temperatura de -12°C por 24 h en un congelador marca Mabe, después de la congelación se colocaron a una temperatura de 78°C durante 5 min para propiciar la destrucción de los parásitos, después de comprobar la lisis celular con microscopio óptico marca Zeiss, se tomó una alícuota para determinar la concentración proteínica del antígeno a través de la técnica de Bradford y se almacenó a -12°C antes de su uso.

6.3.3 Medición de la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Se midió la concentración de proteínas presentes en el extracto antigénico, para evaluar la relación de la producción de una respuesta inmune con la cantidad de proteínas provenientes de *Trypanosoma cruzi* administrados a los grupos de ratones.

6.3.3.1 Principio

La técnica de Bradford es una técnica colorimétrica que utiliza el colorante Azul brillante de Comassie G-250 y se basa en la conversión de la forma leuco del colorante, que va de un marrón-naranja a un color intenso azul cuando los grupos aniónicos del colorante interaccionan con los grupos amino de las proteínas. La reacción se mide a una absorbancia de 595nm.

6.3.3.2 Procedimiento

Para poder realizar las mediciones de proteínas se elaboró una curva patrón utilizando albúmina sérica bovina y realizando diluciones seriadas partiendo de una concentración de 1mg/mL. En microtubos de 1.5 mL se realizaron las diluciones como se muestra en la tabla 1 (ver anexos) cada dilución se realizó por triplicado.

Después de realizar la curva patrón se realizaron las mediciones de los cuatro antígenos, cada uno por duplicado, a partir de diluciones 1/10, 1/20 y 1/40. Mismas diluciones se realizaron como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Diluciones para medición de concentración de proteínas presentes en los antígenos.

Dilución	1/10	1/20	1/40
H₂O µl	900	950	975
Antígeno µl	100	50	25
Bradford mL	1000	1000	1000
Vol. Final	2 mL	2 mL	2 mL

6.3.4 Elaboración de liposomas

Se realizó una mezcla de distintos componentes para obtener liposomas estables, los cuales fueron utilizados para la inoculación del extracto antigénico de *T. cruzi*.

Los componentes que se utilizaron para la elaboración de liposomas se obtuvieron a partir de 95% de aceite vegetal, compuesto principalmente por aceite de girasol, soya, canola, cártamo y 5% de detergente Tween 20 para lograr estabilidad en las vesículas.

6.3.4.1 Principio

Los factores de una vacuna no solo dependen del antígeno, también de la forma de su administración. En los últimos años los liposomas se han utilizado como una vía para la aplicación de vacunas ya que permiten la llegada de sustancias en una dosis determinada, las dosis son liberadas en forma controlada, también se puede controlar la presentación de antígenos, además de las características que presentan en su estructura que le permiten atravesar la membrana celular ayudando a incorporarse al retículo endotelial fácilmente (62).

6.3.4.2 Procedimiento

En un tubo de vidrio se agregaron 950 μ L de aceite vegetal más 50 μ L de Tween 20, posteriormente se agitó la mezcla vigorosamente por 15 segundos hasta conseguir una dispersión homogénea y se tomó una muestra para observar las vesículas formadas. Por último se dejaron 10 min a temperatura ambiente para permitir la estabilización de los liposomas.

6.3.5 Encapsulación del extracto antigénico de *Trypanosoma cruzi*

Para lograr que el extracto antigénico logre la inmunización contra *Trypanosoma cruzi* es necesario que la administración sea exitosa, para ello se eligió el método de microencapsulación por liposomas.

6.3.5.1 Principio

Para la adición del antígeno, es necesario añadir energía para la formación de las bicapas lipídicas, en dicho proceso los liposomas atrapan moléculas como drogas o antígenos que están presentes en el medio acuoso. También diversas moléculas como ácidos nucleicos y proteínas pueden ser adsorbidas en la superficie de las membranas liposomales a través de interacciones electrostáticas (63). Los liposomas pueden fusionarse con las membranas celulares de los macrófagos, permitiendo la entrada de proteínas al citoplasma, donde estas proteínas son procesadas y presentadas por las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Tipo-1 MHC-I, activando una respuesta celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺ (64).

6.3.5.2 Procedimiento

En un tubo de vidrio se agregó 1 mL de liposomas (ver 6.3.4) más 1 mL de la concentración del extracto antigénico (ver 6.3.2) y fueron mezclados hasta conseguir una dispersión homogénea. Enseguida se realizó la inoculación intraperitoneal a los lotes de ratones mencionados a continuación.

6.3.6 Inoculación de ratones CD-1

Los experimentos se realizaron en tres lotes de diez ratones CD-1 adultos, con el fin de evaluar tanto la eficacia del antígeno, como la vía de administración utilizada.

6.3.6.1 Principio

Es muy importante realizar los experimentos con un diseño factorial, que nos permita observar el efecto de cada una de las variables independientes respecto a otra variable dependiente (65). Por eso el diseño experimental está planteado de manera en que se pueda medir la eficacia del antígeno y el uso de los liposomas realizando modelos por separado y modelos donde las variables se unen, como se muestra en el procedimiento.

6.3.6.2 Procedimiento

Con una jeringa para insulina de 300 U, se realizaron 5 inoculaciones intraperitoneales de la siguiente forma

- 300 μ L de antígeno libre cada 15 días a diez ratones CD-1 (5 machos y 5 hembras).
- 300 μ L de antígeno liposomal cada 15 días a diez ratones CD-1 (5 machos y 5 hembras).
- Una inoculación de $< 1 \times 10^4$ parásitos a diez ratones CD-1 (5 machos y 5 hembras) como grupo control.

Después de haber realizado la inmunización con las cinco inoculaciones correspondientes, se realizó el reto de infección con $> 1 \times 10^4$ de parásitos de *T. cruzi*, para observar el efecto que *T. cruzi* tendría ante la presencia de anticuerpos producidos durante la inmunización.

6.3.7 Evaluación de la inmunización en ratones CD-1

La inmunización en los ratones se evaluó tomando en cuenta si los animales sobrevivían al reto de la infección de *T. cruzi* y desarrollaba una respuesta inmune observada por la presencia de anticuerpos y por la presencia de macrófagos aumentados en cantidad y disminución o ausencia de parásitos dentro de ellos. La presencia de anticuerpos se investigó mediante la técnica de hemaglutinación indirecta; la protección de los ratones a la infección de *T. cruzi* se determinó midiendo la parasitemia a lo largo del tiempo en que se midió; igualmente la respuesta inmune protectora se determinó midiendo la cantidad de macrófagos peritoneales y parásitos. De la misma forma se determinó la protección a la infección por la ausencia o disminución de parásitos formando nidos de amastigotes en el corazón de los ratones infectados con *T. cruzi* al detectarlos por cortes histológicos.

6.3.7.1 Principio

Evaluar la inmunización nos permite observar si la vacunación logra una respuesta inmune, tanto humoral como celular, que evite la infección contra *Trypanosoma cruzi*. La hemaglutinación indirecta se basa en la propiedad de algunos anticuerpos anti- *T. cruzi* de aglutinarse en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con antígenos específicos de *T. cruzi*.

La activación de macrófagos se refiere al reconocimiento y destrucción de antígenos, en este caso *Trypanosoma cruzi*, por parte de las células presentes en el sistema inmune innato cuando éstas ya fueron expuestas ante la infección, por lo tanto dicho reconocimiento promueve la eliminación de agentes extraños en el organismo, por lo tanto un aumento de macrófagos produce alta probabilidad de que el parásito sea fagocitado y eliminado.

6.3.7.2 Procedimiento

Extracción de plasma a ratones.

Se extrajeron plasmas a 20 ratones inmunizados y a 10 ratones no inmunizados antes del reto y en los días 0 y 45 posteriores del mismo.

Con un soporte universal se sostuvo un dispositivo de inmovilización y se introdujo el ratón sin anestesiarse, se calentó la cola durante 5 minutos mediante una lámpara, se le realizó una limpieza de cola con etanol al 70% y se realizó un corte perpendicular de 2 mm con tijeras de disección aplicando un poco de presión para favorecer el sangrado, posteriormente la sangre se colectó en microtubos con 10 µL de heparina para evitar la coagulación, el procedimiento se terminó cuando se colectaron más de 100 µL de sangre, se aplica hemostasia a la cola del ratón y se devolvió a su jaula. Por último, para separar el plasma, la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se conservó a -12°C hasta su uso.

Prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

En una placa de 96 pozos con fondo en U, se colocó una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a usar, se tomó una alícuota de 25 μ L de cada suero de ratón y se colocó en el primer pozo mezclando con micropipeta mediante carga y descarga por lo menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra. Se realizaron diluciones seriadas a partir del primer pozo (dilución 1/2), pasando la micropipeta al pozo siguiente (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la dilución 1/64, por último se descartaron los últimos 25 μ L. Por último se mezclaron aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta, se dejó en reposo, a resguardo de vibraciones, durante 90 minutos y se leyó la placa a partir de los primeros 90 minutos.

Cuantificación de macrófagos activados

Se obtuvo 1 mL de líquido peritoneal de cada ratón sobreviviente a la infección, para lo cual se realizó un corte longitudinal en la zona del peritoneo y con una jeringa se inyectaron 3 mL de solución fisiológica, posteriormente se masajeó para provocar el despegue de células macrofágicas. Después se recuperó la solución inyectada en el área peritoneal aspirando cuidadosamente el líquido inyectado con jeringa, hasta obtener 1 mL. A cada mililitro obtenido se le agregaron 1×10^5 de parásitos y se incubó 30 min a 37°C, finalmente se tomó una muestra de 10 μ L, se extendió sobre un portaobjetos y se realizó una tinción de Giemsa para el conteo de macrófagos y parásitos en microscopio óptico a 100x.

6.3.8 Medición de la presencia de *Trypanosoma cruzi* a ratones inmunizados

Con la finalidad de comprobar si el antígeno de *Trypanosoma cruzi* es capaz de dañar al parásito se realizó una inoculación de 1×10^5 tripomastigotes, los cuales fueron contados durante 45 días en cámara de Neubauer.

6.3.8.1 Principio

Después de la vacunación el sistema inmune desencadenará sustancias que combatirán la enfermedad, para comprobar si dicha vacuna funciona se procede a una infección de la enfermedad de Chagas, la cual se realizará con la inoculación de tripomastigotes.

Los nidos de amastigotes en corazón se producen en la etapa crónica de la infección, demostrando la progresión de la infección presentando alteraciones cardiacas, digestivas, neurológicas o combinadas. Determinar la presencia o ausencia de nidos de amastigotes en corazón de ratones inmunizados demostrará la eficacia del antígeno contra *T. cruzi*.

6.3.8.2 Procedimiento

- Inoculación. Al término de 5 inoculaciones a ratones con Antígeno libre y Antígeno liposomal, se realizó una inoculación intraperitoneal de 1×10^5 tripomastigotes en los ratones CD-1, dicha infección tuvo una duración mínima de 45 días.
- Parasitemia. Se tomaron muestras de sangre y se realizaron conteos de parásitos 2 veces a la semana, sobre una cámara de Neubauer en microscopio óptico a 40x durante 45 días. En una placa de 96 pozos, se colocaron 40 μ L de cloruro de amonio para favorecer la lisis de los eritrocitos y se agregaron 10 μ L de sangre de ratón, se dejó reposar la muestra por 10 min y se tomaron 10 μ L para realizar el conteo celular.

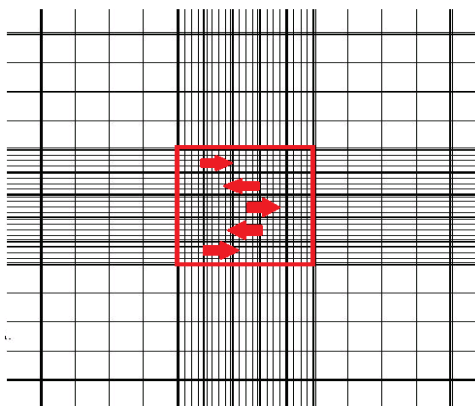


Figura 3. Método y zona de conteo en cámara de Neubauer.

Se inicia de izquierda a derecha, pasando por todos los recuadros, en forma de zigzag.

- Medición de la presencia de nidos de parásitos. Al término de los 45 días de infección o después de la muerte de los ratones inmunizados, se extrajeron los corazones y se realizaron cortes histológicos para observar la presencia de amastigotes después de la infección (Ver Anexos para procedimiento de montaje y tinción). La observación se realizó en microscopio óptico a 40x y 100x.

6.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante una prueba chi-cuadrada de Pearson, se utilizó un valor de $p < 0.05$ para que sea considerado como significativo. Los gráficos se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism 5.

VII. RESULTADOS

7.1 Obtención y medición de proteínas del extracto antigénico

La obtención del extracto antigénico se realizó a partir de la lisis de 2 a 20 x10⁶ parásitos/mL mediante un ciclo de congelamiento (-12°C) y descongelamiento a 80°C. Después de comprobar la destrucción de los parásitos a partir de la observación en microscopio óptico 10x y 40x, se realizó la medición de proteínas contenidas en el cultivo de parásitos lisados, al cual se le denominó como extracto antigénico total de *Trypanosoma cruzi*, dicha cantidad de proteínas fue determinadas mediante la técnica de Bradford.

Se obtuvo una curva patrón utilizando Albúmina Sérica Bovina (BSA) con concentraciones que fueron de 0 a 10 µg/mL. Se obtuvo un total de cuatro extractos antigénicos, los cuales se diluyeron 1/10, 1/20 y 1/40, se midieron a una absorbancia de 595nm, determinando una concentración de proteínas que partió de 280 µg/mL hasta 723 µg/mL, cabe mencionar que la inoculación de los extractos antigénicos fue de 300 µL por ratón, por lo tanto cada inoculación presentaba distinta cantidad de proteínas partiendo de las concentraciones antes mencionadas.

Tabla 2. Concentración de proteínas obtenida por el método de Bradford.		
ANTÍGENO	PROTEÍNAS µg/mL	CANTIDAD DE PARÁSITOS/mL
1.	600 µg/mL	19.375x10 ⁶
2.	280 µg/mL	2.58x10 ⁶
3.	723.3 µg/mL	7.5x10 ⁶
4.	646.6 µg/mL	3.75x10 ⁶

7.2 *Obtención de liposomas.*

Después de haber realizado las mezclas que componen 95% de aceite vegetal y 5% de detergente, se obtuvieron vesículas estables con un tamaño promedio de 10 μm . Las siguientes imágenes muestran la morfología obtenida mediante microscopía óptica.

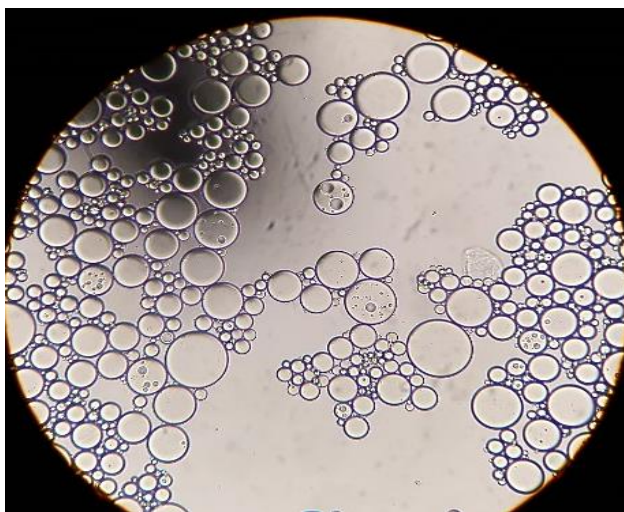


Figura 4. Liposomas vistos a microscopio óptico 10x.

7.3 Encapsulación del extracto antigénico total y soluble de *Trypanosoma cruzi*

Para comprobar si los liposomas lograban encapsular el extracto antigénico, se realizó una prueba preliminar que consistió en la tinción del antígeno con reactivo de Bradford (1mL de Bradford + 1mL de antígeno + 1 mL de liposomas), después de realizar la mezcla se tomó una muestra para comprobar su presencia al microscopio óptico con una amplificación de 10x. En la imagen se aprecia que en el centro de las vesículas se observa una ligera tonalidad azul, demostrando que el antígeno se encontraba en el centro de los liposomas; la siguiente figura muestra liposomas con antígeno teñido y liposomas sin antígeno.

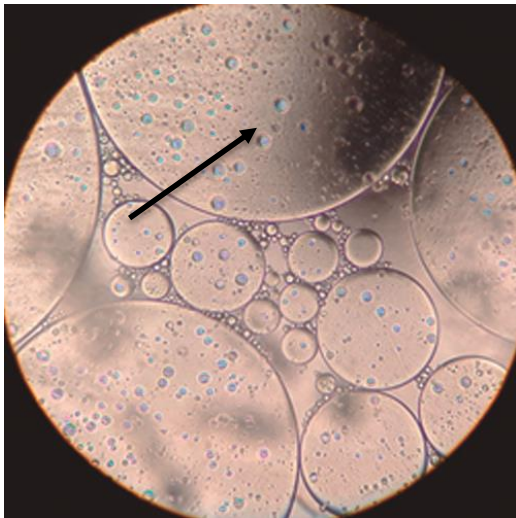


Figura 5. Liposomas con antígeno teñido encapsulado. 10x.



Figura 6. Liposomas sin antígeno 10x.

7.5 Evaluación de la inmunización en ratones CD-1

7.5.1 Prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*

La siguiente gráfica muestra el promedio del título de anticuerpos contra *T. cruzi* presentes en plasma de ratones machos con los distintos tratamientos (Figura 7). Se observa que los machos que no fueron inmunizados presentan un título de 1:2 al día 0 y un título de 1:4 después de 45 días, por el contrario los ratones que fueron inmunizados con antígeno libre y con antígeno liposomal no mostraron presencia de anticuerpos al día 0, es decir al inicio del experimento, no obstante, después de 45 días se observó un título de 1:64 en los ratones inmunizados. Según el análisis estadístico los resultados arrojan diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2= 52.9$; $p<0.05$) entre el grupo control y los ratones inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal al término de 45 días de infección.

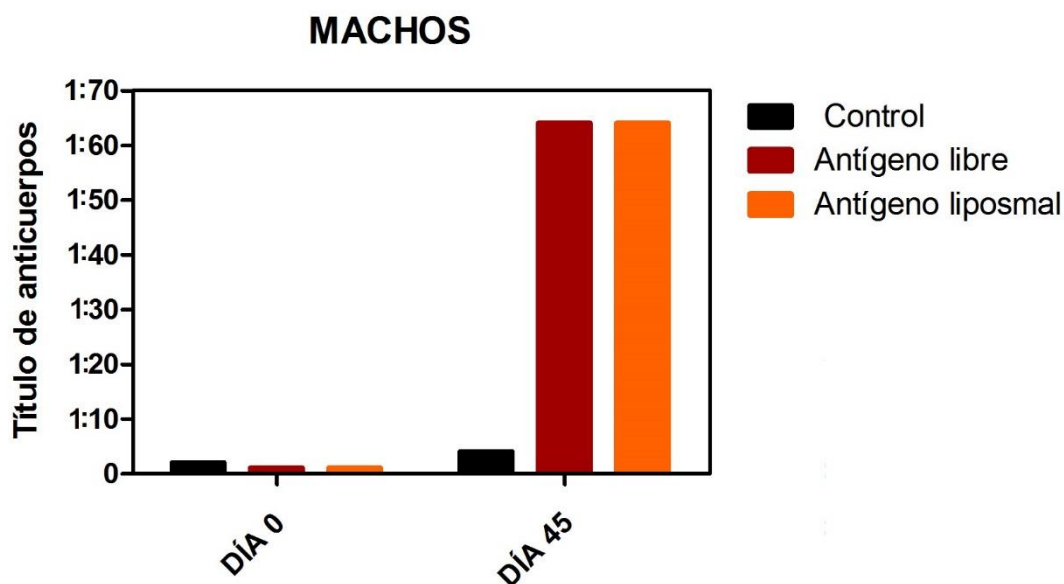


Figura 7. Promedio del título de anticuerpos presentes en ratones macho control e inmunizados. Existen diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2= 52.9$; $p<0.05$) entre el grupo control y los ratones inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal después de 45 días de infección.

Con relación a la inmunización de las hembras, en la siguiente imagen (Figura 8) se observan los resultados del título de anticuerpos anti-*T. cruzi*. El lote control presentó un título de anticuerpos de 1:2 en el día cero de infección y las hembras que fueron inmunizadas fueron no tuvieron anticuerpos anti-*T. cruzi* al inicio del experimento.

Sin embargo, para el día 45, las hembras del lote control aquellas que fueron infectadas y sobrevivieron a la infección con *T. cruzi*, desarrolló un título de 1:48 mientras que las hembras inmunizadas con antígeno libre y antígeno liposomal mostraron un título de anticuerpos promedio de 1:64.

Los resultados obtenidos mediante la elaboración de chi-cuadrada de Pearson, muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal después de 45 días de infección ($\chi^2= 2.2$; $p<0.05$).

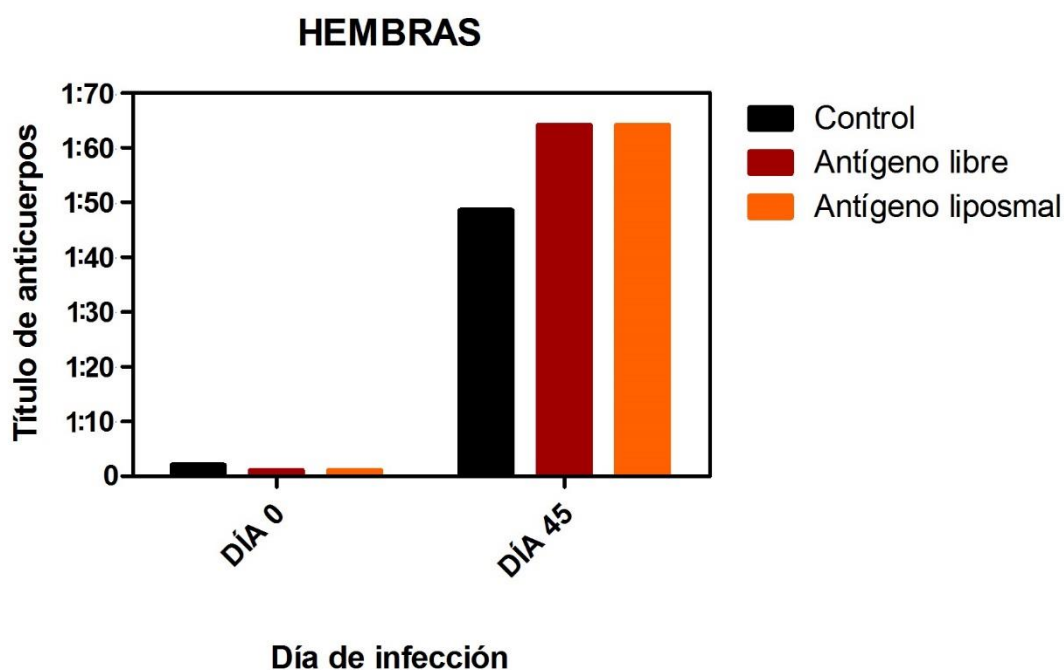


Figura 8. Promedio del título de anticuerpos presentes en ratones hembra control e inmunizadas. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal después de 45 días de infección ($\chi^2= 2.2$; $p<0.05$).

7.5.2 Determinación de parasitemia en ratones CD-1

Después de realizar las 5 inoculaciones intraperitoneales con antígeno liposomal o antígeno libre, se realizó el reto con inoculación de 10×10^4 parásitos/ratón con el fin de observar si el antígeno era capaz de proteger al ratón ante la infección con *T. cruzi*. Para obtener los datos de parasitemia, se realizaron dos conteos semanales en cámara de Neubauer durante 45 días (ver apartado 6.3.9).

La siguiente gráfica muestra la cantidad de parásitos en sangre observada después de la infección en ratones machos control y machos inmunizados, tanto con antígeno libre como con antígeno liposomal, los resultados fueron analizados mediante una prueba de chi-cuadrada de Pearson considerando una $P < 0.05$ como resultados significativos (Figura 9). La curva negra representa la curva de parasitemia en los ratones machos a los cuales no se les administró ningún tipo de antígeno (grupo control), observando que los niveles de parasitemia comienzan a aumentar después del día 15, el pico más alto de infección se muestra en el día 20 y a partir del día 25 se observa una disminución en el número de parásitos. La curva roja representa la parasitemia de ratones machos inmunizados con Antígeno libre, esta curva muestra un aumento de parasitemia a partir del día 10, y el pico más alto en el día 15 de infección, para el día 20 los parásitos en sangre desaparecen por completo, indicando que el antígeno libre produjo protección ante la infección, observada al día 20 de manera notoria, aunque los resultados estadísticos no muestran diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2 = 1.9$; $p > 0.05$). La curva amarilla muestra a los ratones inmunizados con Antígeno liposomal, esta curva muestra una parasitemia intermitente, en donde aparecen dos picos altos siendo el día 25 el más alto y la desaparición de parásitos en sangre después del día 30 apreciando que el antígeno liposomal de igual manera ofreció protección en los primeros 20 días de infección, según el análisis estadístico existen diferencias estadísticamente significativas entre la parasitemia de machos control contra machos inmunizados con antígeno liposomal ($\chi^2 = 2.2$; $p < 0.05$).

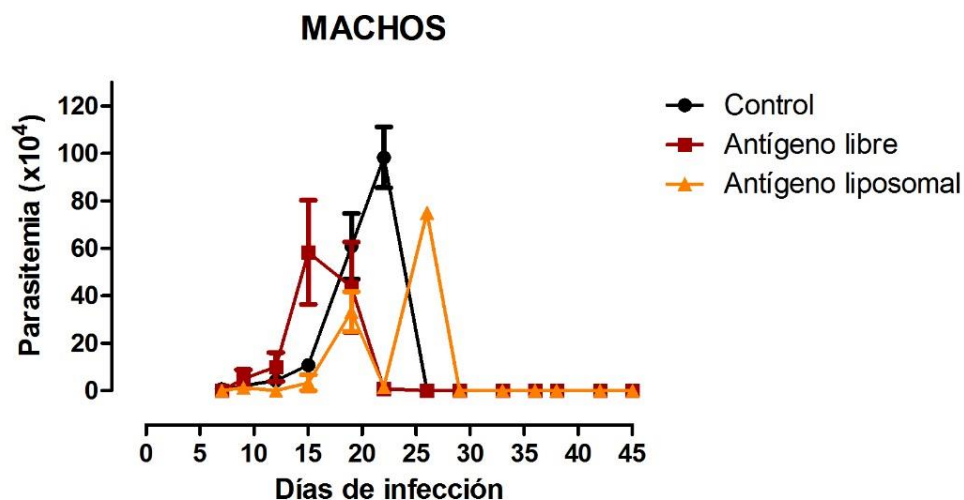


Figura 9. Niveles de parasitemia en ratones macho control e inmunizados. Las barras indican el error estándar. Existe diferencia estadísticamente significativa entre la parasitemia del grupo inmunizado con antígeno liposomal y el grupo control ($\chi^2= 2.2$; $p<0.05$).

En cuanto al grupo de hembras control e inmunizadas (Figura 10), la curva negra que representa al grupo de ratones no inmunizados, al igual que los ratones machos el pico más alto de parasitemia se observa en el día 20, la duración de la misma es de 30 días, cinco días más que en los ratones macho, de esta manera se determina que la presencia de parásitos en hembras tiene más duración pero en mucho menos cantidad que en machos.

Las hembras inmunizadas con Antígeno liposomal (curva roja), presentan un pico de parasitemia a los 10 días de infección que disminuye 5 días después, a diferencia del grupo inmunizado con Antígeno libre (curva naranja), el cual no se observaron parásitos en sangre durante la infección. De acuerdo a la prueba de chi- cuadrada de Pearson existen diferencias estadísticamente significativas entre la parasitemia del grupo control y las parasitemias entre las hembras tratadas con antígeno libre ($\chi^2= 3.49$; $p<0.05$), por el contrario aunque se aprecia una disminución en la parasitemia, el análisis estadístico nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las hembras control y las hembras inmunizadas con antígeno liposomal ($\chi^2= 1.6$; $p>0.05$).

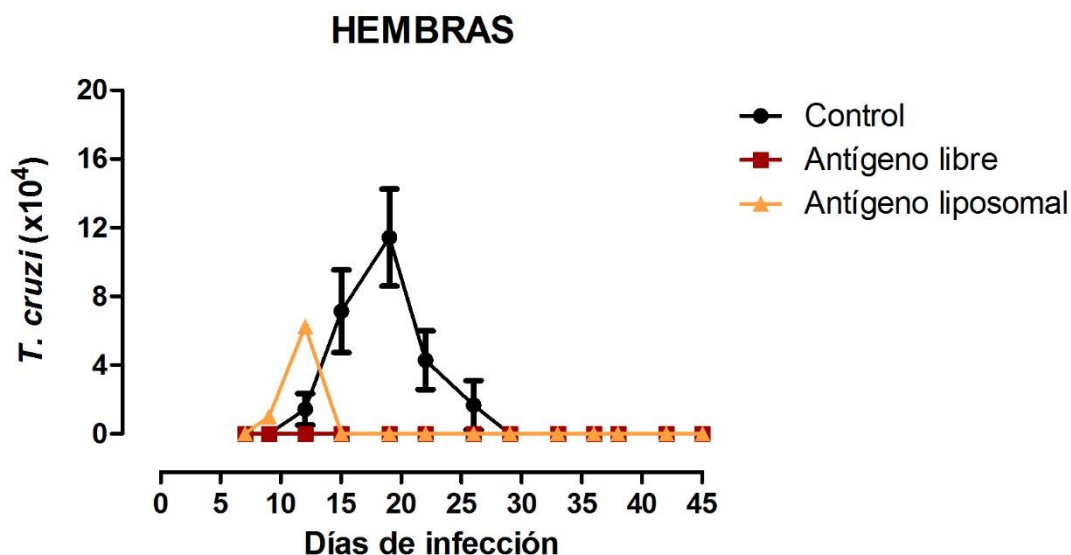


Figura 10. Niveles de parasitemia en ratones hembra control e inmunizados. Las barras indican el error estándar. De acuerdo a la prueba de chi- cuadrada de Pearson existen diferencias estadísticamente significativas entre la parasitemia del grupo control y antígeno libre ($\chi^2= 3.49$; $p<0.05$), por el contrario no existen diferencias estadísticamente significativas entre las hembras control y las hembras inmunizadas con antígeno liposomal ($\chi^2= 1.6$; $p>0.05$).

Mortalidad

Al término de la infección que tuvo una duración de 45 días, se realizó la evaluación de los porcentajes de mortalidad en los grupos controles, inmunización con antígeno libre e inmunización con antígeno liposomal, en ratones macho y hembra respectivamente y de esta manera evaluar la efectividad de cada antígeno con respecto a los porcentajes de mortalidad obtenidos.

Existe poca diferencia en los porcentajes de mortalidad observados en los machos (Figura 11), la curva negra muestra el grupo control el cual se observó una mortalidad del 83% a partir del día 26, la curva roja que representa ratones inmunizados con Antígeno libre presento un porcentaje de 80% a partir del día 26 y los ratones inmunizados con Antígeno liposomal presentaron un porcentaje de mortalidad de 75% a partir del día 29. Así, al igual que los datos de parasitemia, se muestra que el Antígeno liposomal aporta una ligera protección, pues disminuye la mortalidad en un 8%.

El análisis de chi-cuadrada de Pearson mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad de los machos control e inmunizados con antígeno liposomal ($\chi^2 = 2.56$; $p > 0.05$) y antígeno libre ($\chi^2 = 0.2$; $p > 0.05$).

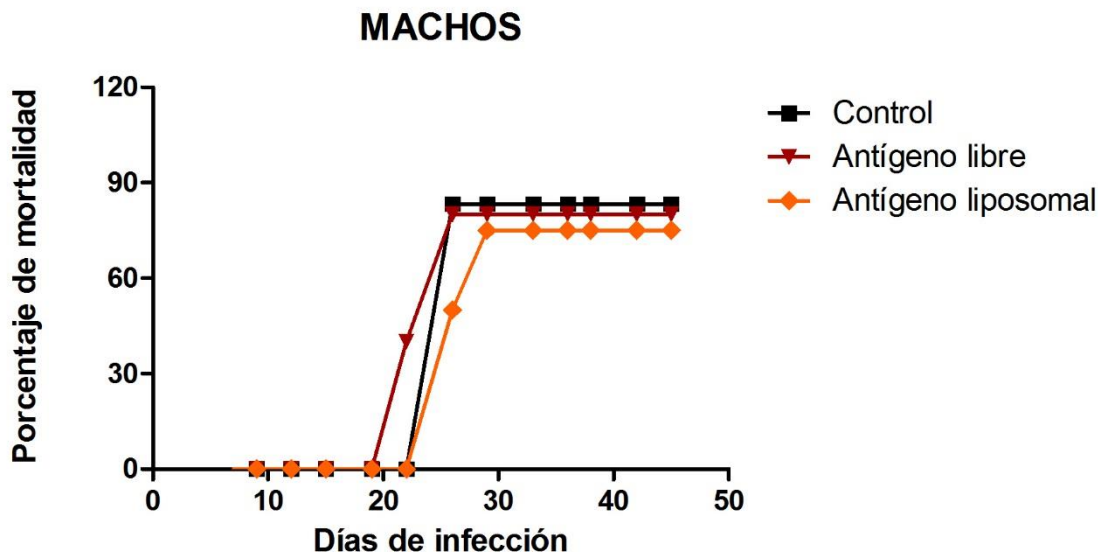


Figura 11. Porcentaje de mortalidad en ratones macho control y ratones macho inmunizados. El análisis de chi-cuadrada de Pearson mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad de los machos control e inmunizados con antígeno liposomal ($\chi^2 = 2.56$; $p > 0.05$) y antígeno libre ($\chi^2 = 0.2$; $p > 0.05$).

il no presentaron porcentajes de mortalidad durante los 45 días de infección, el grupo control presentó un porcentaje de mortalidad de 14% a partir del día 26, por lo tanto el antígeno libre y antígeno liposomal, ofrece en las hembras una reducción de la mortalidad en un 14%. Por lo tanto el análisis estadístico muestra claramente diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad del grupo control y ambos grupos inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal ($\chi^2 = 9$; $p < 0.05$).

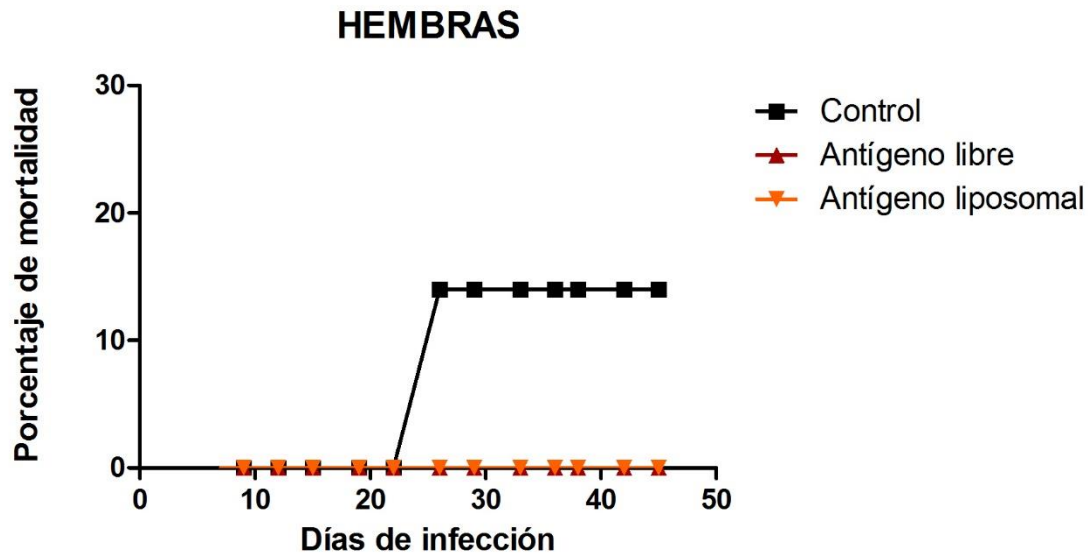


Figura 12. Porcentaje de mortalidad en ratones hembra control y ratones hembra inmunizados. El análisis estadístico muestra diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad del grupo control y los grupos inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal ($\chi^2= 9$; $p<0.05$).

7.5.3 Cuantificación de macrófagos activados

Después del término de la infección que tuvo una duración de 45 días, se extrajo 1 mL de líquido peritoneal de los ratones sobrevivientes y se expuso con 10×10^4 parásitos para observar la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales y de esta manera observar si existía un incremento en las células del sistema inmune y una disminución de parásitos en líquido peritoneal. En los resultados presentados a continuación, se muestra el conteo celular de ratones sobrevivientes sin ser separados por sexo debido a la baja tasa de sobrevivencia de machos.

La figura 13a muestra macrófagos presentes en líquido peritoneal teñidos en Giemsa y vistos bajo microscopio óptico a 100x; la figura 13b muestra macrófagos en presencia de parásitos después de la inoculación de los mismos; la figura 13c muestra la interacción de un macrófago con un parásito de *T. cruzi* indicando una fagocitosis inicial después de la activación celular.

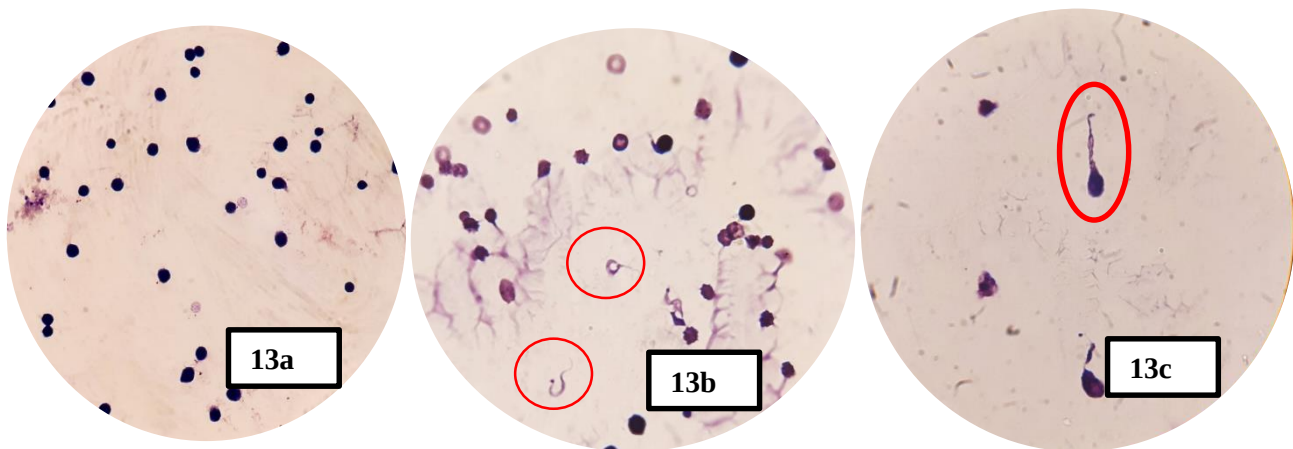


Figura 13. Macrófagos y parásitos presentes en líquido peritoneal de ratón 100x.

13a. Macrófagos presentes en líquido peritoneal; **13b.** Macrófagos y *T. cruzi*; **13c.** Fase inicial de fagocitosis.

La siguiente gráfica muestra los resultados obtenidos en el conteo de macrófagos y parásitos totales cuantificados en 20 campos presentes en 10 μ L líquido peritoneal de ratones que no fueron inmunizados (Figura 14), se observa una alta presencia de macrófagos, sin embargo aunque la muestra incluye también parásitos, se observaron en muy poca cantidad.

Los resultados derivados del análisis estadístico utilizando chi-cuadrada de Pearson mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de parásitos, macrófagos y fagocitosis inicial, observados en ratones inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal con respecto al control ($p < 0.05$).

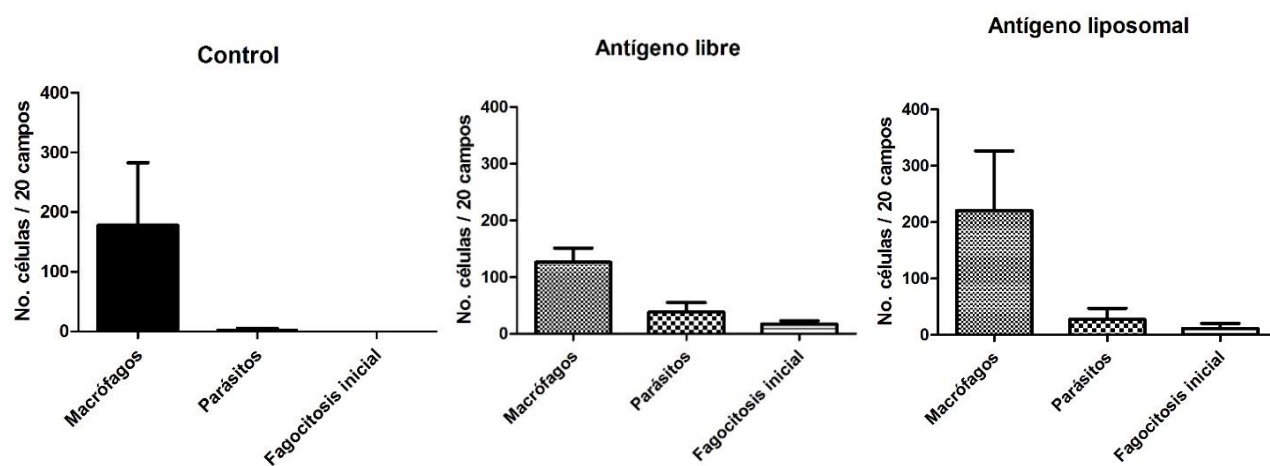


Figura 14. Conteo de macrófagos y parásitos totales cuantificados en 20 campos.

7.5.4 Presencia de nidos de amastigotes en corazón

Después de 45 días de infección o después de la muerte del ratón, se extrajeron los corazones y se almacenaron en formol al 10% (formol 10%, PBS pH 7.2 90%) hasta su preparación para la tinción en Eosina-Hematoxilina (ver metodología); cada laminilla se realizó por duplicado y se contaron 50 campos (Ver anexos), a continuación se presentan los resultados obtenidos por grupo como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Nidos de amastigotes en corazón.

GRUPO	Control	Antígeno libre	Antígeno liposomal	Control	Antígeno libre	Antígeno liposomal
	♂	♂	♂	♀	♀	♀
NIDOS EN CORAZÓN	++	+++	++	+	-	-

(+) 1-5 nidos por campo; (++) 6-10 nidos por campo; (+++) más de 11 nidos; (-) ausencia de nidos.

Como se aprecia en la tabla 3, los machos del grupo control presentaron una cantidad de nidos de amastigotes igual al del grupo inmunizado con antígeno liposomal (++), la diferencia se observa entre los tratados con antígeno libre los cuales presentaron una alta presencia de nidos (más de 11 nidos por campo de observación. En cuanto a las hembras, para el grupo control, en gran parte de los ratones se tuvieron muy pocos nidos (1 a 5 por campo de observación), mientras que los ratones hembras inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal no presentaron nidos en corazón lo que significa que los antígenos pudieron proteger al grado de impedir que se formaran nidos de amastigotes. Sin embargo el resultado también señala que en el caso de los machos no se obtiene una protección completa.

Las siguientes imágenes muestran la cantidad de nidos observados en los cortes histológicos de corazón, indicando los nidos observados. En la figura 17, se observan tres nidos (marcados con un círculo amarillo) por lo tanto se clasifica como muestra positiva (+); la figura 18 se observan ocho nidos y de esta forma se indica como positiva (++); la figura 19 al observarse mas de 13 nidos la muestra se clasifica como altamente positiva (+++), de esta manera se observaron todas las muestras de los corazones de los tres grupos de ratones tratados, cada muestra se realizó por duplicado obteniendo un total de 60 cortes histológicos.



Figura 15. Nidos de amastigotes en corazón 100x.

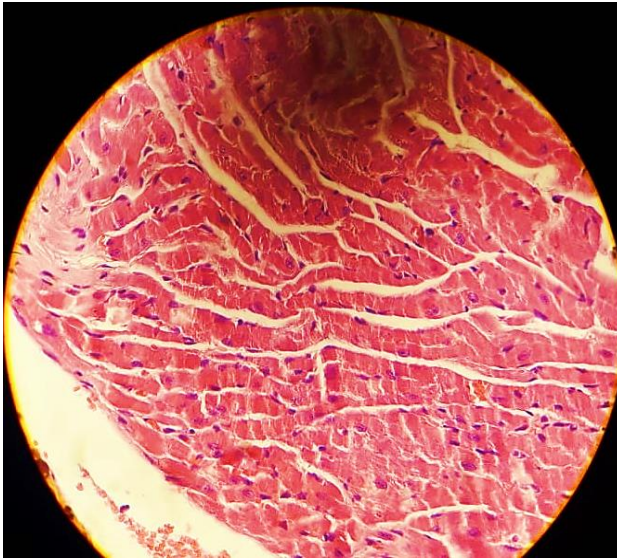


Figura 17. Tejido de corazón sin nidos de amastigotes, muestra negativa (-) 40x.

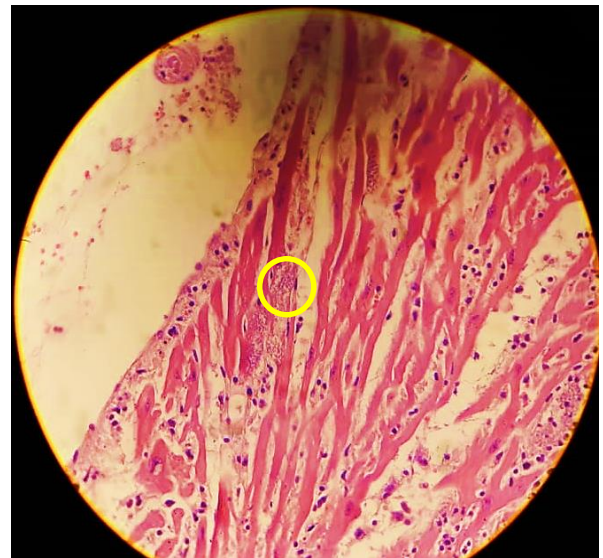


Figura 17. Nidos de amastigotes, muestra positiva (+) 40x.

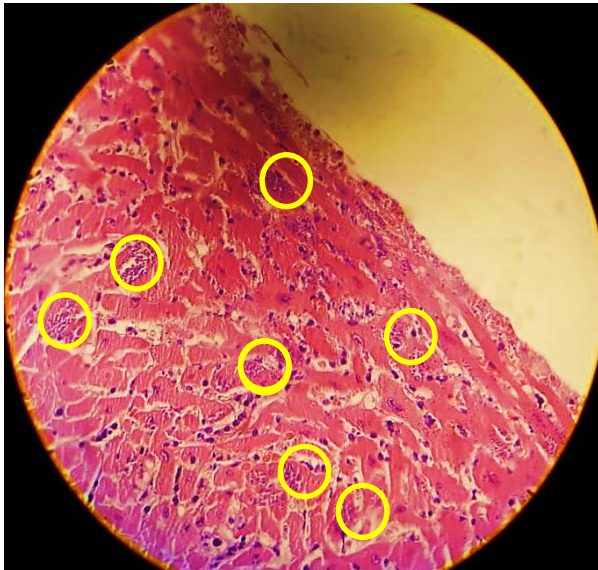


Figura 18. Nidos de amastigotes, muestra positiva (++) 40x.



Figura 19. Nidos de amastigotes en alta cantidad, muestra positiva (+++) 40x.

VIII. DISCUSIÓN

Extracción y encapsulación de antígeno de *Trypanosoma cruzi* en liposomas.

En este proyecto se obtuvo un inmunógeno de *T. cruzi* encapsulado en liposomas con la finalidad de evaluar su capacidad protectora contra la enfermedad de Chagas en ratones CD-1. El extracto antigénico total logró generar una respuesta inmune protectora contra la infección del parásito.

La preparación del antígeno se realizó modificando la metodología descrita por García-Escalante y cols. (1996), en donde utilizan la técnica de inactivación celular, por congelación-descongelación. En este estudio, el procedimiento fue modificado debido a que se comprobó que *T. cruzi* es un parásito muy resistente a temperaturas desde -70°C hasta 68°C e incluso sobrevive después de la muerte del hospedero hasta 20 días (66,67), así que se estableció una estandarización del procedimiento de congelación-descongelación durante 24h.

Se estandarizaron las condiciones óptimas para la obtención de liposomas unilaminares derivados a partir de lípidos y detergentes tal y como se describió anteriormente. Los resultados mostraron que la concentración del detergente, Tween-20 al 5% en medio lipídico, genera la formación de micelas estables y homogéneas, las cuales fueron observadas bajo el microscopio óptico (40X); la alta concentración de lípidos (95%) aumentó el tamaño de las partículas al igual que lo determinaron Jaafar-Malej y cols. (2010), en donde se reportaron resultados similares (68).

Se pudo observar que el extracto antigénico se concentró en las micelas o liposomas, con mayor concentración y estabilidad cuando se obtenían de un tamaño de alrededor de 10 µm de diámetro, coincidiendo con lo publicado por Gregoriadis y cols. (63), en donde los diámetros oscilan entre 10 y 25 µm, solo que emplearon liposomas de medicamentos (53,63). Es posible que el tamaño no solo influya en la estabilidad de las sustancias que se encapsulan dentro de los liposomas sino también en la capacidad de inmunogenicidad que se deseaba, pues si eran más grandes no se encapsulaban y si eran más pequeñas si se encapsulaba el extracto antigénico, pero la cantidad del extracto era tan pequeña que se corría el riesgo de inmunizar con cantidades bajas del antígeno y obtener una inmunización muy leve ante *T. cruzi*.

Efecto del extracto antigénico libre y liposomal en ratones CD-1.

El extracto antigénico se encapsuló en liposomas pues de acuerdo a Ghosh y cols. (2014), se reporta una inmunidad generada contra *Leishmania donovani* favorecida por el encapsulamiento de colesterol dentro de liposomas, activando el sistema inmune y la activación de macrófagos, dado que *T. cruzi* pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, la misma a la que pertenecen parásitos del género *Leishmania* por sus características moleculares, celulares, morfológicas y fisiológicas, era probable que sucediera lo mismo con *T. cruzi*, ya que el principal componente de los liposomas elaborados en este proyecto, está basado en aceite vegetal, mismo que puede aumentar el colesterol en sangre y a su vez aumentar la activación del sistema inmune en ratones (58).

Este proyecto demostró que la inmunización de ratones CD-1, produjo variaciones en la respuesta entre machos y hembras, pues las mediciones de parasitemia, HAI, mortalidad y la observación de nidos en corazón indican que la inmunidad de las hembras es más alta. Existen investigaciones que afirman que la inmunidad presenta dimorfismo sexual en animales y humanos, pues se han estudiado las diferencias entre las respuestas inmunitarias y el sexo, sin embargo aún existen pocos estudios que muestran estas diferencias, aunque se sugiere que existen moduladores de la respuesta inmune y su posible participación en la autoinmunidad (69,70).

Se sabe que las hembras presentan alta resistencia ante algunas infecciones, y esta protección podría estar relacionada con las hormonas gonadales que tiene un efecto estimulante sobre la función inmunológica que aumenta con la edad reproductiva, proporcionando un incremento de inmunoglobulinas que aumentan la respuesta inmune. También se ha demostrado que los esteroides sexuales como el estradiol y la testosterona regulan la expresión de genes que desempeñan un papel importante en la respuesta inmune adaptativa (69).

Otros estudios demuestran que los ratones hembra producen niveles más altos de IgG, de igual forma se ha descrito que la participación de genes que regulan la codificación de células inmunes innatas se encuentran en el cromosoma X, además de que contribuyen a modular las funciones de la maduración celular y vida útil de células pertenecientes a la inmunidad innata como los macrófagos, neutrófilos, células natural killer y células dendríticas.

Lo anterior podría explicar la alta sobrevivencia de hembras ante la infección con *T. cruzi*, pues se observó una alta protección en las cuales se obtuvo un alto título de anticuerpos. Los estudios histológicos en corazón mostraron niveles bajos de nidos de amastigotes en las hembras no inmunizadas y ausencia de nidos a aquellas que se inmunizaron con antígeno libre y liposomal, a diferencia los machos de los tres grupos en los cuales se les observó alta cantidad de nidos, reforzando de esta manera las diferencias entre la respuesta inmune y el sexo (71,72).

Los niveles de parasitemia de *T. cruzi* muestran una fuerte disminución de las parasitemias en hembras inmunizadas con antígeno liposomal y la nula presencia de parásitos en sangre de hembras tratadas con antígeno libre, en comparación con las hembras control que muestran presencia de parásitos en sangre. Con base a este resultado, podemos indicar que tanto el antígeno libre como el antígeno liposomal ofrecen protección contra *T. cruzi* en hembras, indicando una alta resistencia a la infección, pues al estar elaborados con aceite vegetal, los liposomas podrían estar actuando sobre el sistema inmune, ya que existen productos del aceite vegetal llamados ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, que dependiendo de la naturaleza del estímulo, la intensidad y duración se relacionan con la producción de interleucinas desde la IL-1 hasta la IL-10, obteniendo células diana como macrófagos, neutrófilos y células T, que favorecen protección inmunitaria (73).

Los resultados de la hemaglutinación indirecta indicaron una fuerte respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados. Se mostró una alta protección adquirida por las exposiciones repetidas al agente inmunógeno, desencadenando memoria adaptativa y alta producción de anticuerpos. Además es probable que no se hayan presentado fenómenos inmunológicos de hipersensibilidad, tolerancia, hipo o hiperreactividad e inmunosupresión por la cantidad de inmunizaciones efectuadas, lo cual es un riesgo cuando se administran varias vacunaciones con el mismo antígeno.

La cantidad más alta de título de anticuerpos obtenida fue de 1:64 en ratones machos y en hembras inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal. En contraste está la respuesta de los machos control pues presentaron un leve aumento de anticuerpos que fue desde 1:2 para el día 0 a 1:4 para el día 45, lo que muestra la baja protección inmunológica y como consecuencia se observó una alta mortalidad en los mismos. Algunos estudios mencionan la hipótesis de discapacidad de inmunocompetencia, que asume que existe una interrupción de la función del sistema inmune debido a la testosterona, por lo tanto existe una inmunosupresión que relacionan la inmunidad con los niveles de testosterona, sin embargo la evidencia experimental es escasa (74).

En cuanto a las hembras control, los títulos de anticuerpos muestran una marcada diferencia con respecto a los machos control, ya que en el día 0 de infección se obtuvo un título de anticuerpos de 1:2 y en el día 45 se muestra un título de 1:48, lo que indica probablemente una alta protección inmunológica innata y explicaría la baja mortalidad en hembras no inmunizadas, como anteriormente se mencionó, quizás estos resultados se deben principalmente a la alta producción de anticuerpos IgG debido a la presencia de factores genéticos y hormonales (69).

La evaluación de la inmunización mediante cuantificación de macrófagos activados y parásitos en ratones control sobrevivientes al reto contra *T. cruzi*, mostró un promedio de 178 macrófagos y un promedio de 2.6 parásitos. Aunque no se observaron indicios de fagocitosis la alta presencia de células indica una respuesta inmune innata activa y como consecuencia la sobrevivencia del 60% del total de ratones pertenecientes al grupo control. Muchos estudios han demostrado que los macrófagos de manera natural están involucrados en la defensa contra patógenos y antígenos ajenos al organismo, esta célula al estar involucrada en distintos procesos de defensa como fagocitosis, reparación y desarrollo de tejidos, están bien adaptados al microambiente y ofrecen protección de manera innata (75,76).

En el caso de ratones inmunizados con antígeno libre se observó un promedio de 17 macrófagos fagocitando parásitos en 20 campos, muestran diferencias significativas en comparación con el grupo control. En los conteos de fagocitosis inicial en ratones inmunizados con antígeno liposomal, muestran diferencias significativas en comparación con el grupo control. Esto se repite en la comparación de los conteos de macrófagos y parásitos, mostrando diferencias significativas entre ratones control y ratones inmunizados con antígeno libre y

antígeno liposomal. Existen estudios que muestran la presencia de células que se encuentran de forma latente las cuales necesitan de la presencia de agentes extraños que podrían estar relacionados en la activación de las misma, aumentando la actividad celular. Basso y cols. (2014), reportan un estudio en el que utilizaron parásitos muertos de *Trypanosma rangeli*, una forma no patógena para los humanos, inoculados en cobayos y observaron que durante las primeras horas de prueba, los cobayos mostraron un aumento de macrófagos y otras células como: granulocitos, IL-12 y células Natural Killer, disminuyendo los nidos de amastigotes y los daños en el músculo cardíaco y esquelético de los animales, a partir de este estudio se demuestra que la respuesta inmune innata juega un papel importante en animales inmunizados ayudando al aumento de células fagocíticas y promoviendo la eliminación temprana de parásitos (77,78).

VIII. CONCLUSIÓN

La administración del antígeno libre y liposomal en ratones produjo una mayor respuesta inmune aumentando la producción de anticuerpos tanto en hembras como en machos después de los 45 días de infección, logrando una disminución en la mortalidad, bajos niveles de parasitemia y una alta sobrevivencia de hasta un 100% para hembras y un 14% para machos, adicionalmente se obtuvieron resultados que muestran activación de macrófagos y por lo tanto generación de respuesta inmune innata que no solo explica la protección contra *T. cruzi* sino que avala el empleo de la vacuna liposomal.

X. RECOMENDACIONES

A pesar de las estrategias de prevención, la enfermedad de Chagas sigue estando presente en zonas rurales de distintas comunidades del país y esto implica la búsqueda de soluciones que logren erradicar y diagnosticar a tiempo la infección.

El uso de las técnicas para la evaluación de la inmunización en ratones presentadas en este trabajo nos arrojaron distintas conclusiones sobre el uso de antígenos en ratones, sin embargo pruebas a nivel molecular, como extracción y amplificación de DNA como técnica de diagnóstico contra *T. cruzi*, serían primordiales para comprobar la presencia o ausencia del parásito en suero de ratones inmunizados.

Sin duda la hemaglutinación indirecta es una técnica que nos ayuda a determinar la presencia de anticuerpos en suero, sin embargo el detectar la existencia de IgG en machos y hembras mediante prueba de ELISA, aportaría con mayor seguridad la protección contra *T. cruzi* y la diferencia que existe entre la protección de machos y hembras ya que la inmunoglobulina IgG es uno de los anticuerpos más abundantes representando el 80% de las inmunoglobulinas totales.

XI. REFERENCIAS

1. Chagas C. Aspecto clinico da nova entidade morbida produzida pelo *Schizotrypanum cruzi*. Bras Med. 1910;24:263–5.
2. Guerreiro C MA. Da reação de Bordet-Gengou na molestia de Carlos Chagas como lemento de diagnóstico. Bras Med. 1913;23:225.
3. Brumpt E. Le Xenodiagnostique. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particullier á la trypanosomose de Chagas. Bull Soc Pathol Exot. 1914;7:706.
4. Hoffman CC. Nota acerca de un probable transmisor de la tripanosomiasis humana en el estado de Veracruz. Rev Mex Biol. 1928;8:12–8.
5. Champion G. Insecta Rhynchota. Hemiptera-Heteroptera. In: Godwin and Salvin, editor. Biologia Centrali Americana. Vol. 2. 1899. p. xvi–416.
6. Mazzoti L. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. México. Gac Méd Méx. 1940;70:417–20.
7. Mazzotti L. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el país. Demostración de tripanosomas en los reduvideos transmisores. Medicina(Mex). 1936;16:584–5.
8. Mazzotti L. Estudios sobre *T. hegneri*. I. Infección natural y experimental con *T. cruzi*. II Intento de cruzamiento con *T. dimidiata*. Rev Inst Salud Enf Trop. 1943;4:53–6.
9. Palomo-Erosa E. *Triatoma dimidiata* (lat) de Yucatán. Algunas consideraciones sobre su prevalencia, distribución biológica e infección por *Trypanosoma cruzi*. Med Rev Mex. 1940;361:175–7.
10. Palencia L, Montaña R. Un nuevo caso de tripanosomiasis en México. Rev Fac Med. 1959;1:737–40.
11. Ortega GM, Beltrán HF Z-VJ. Enfermedad de Chagas en Chiapas. Estudios clínicos

- epidemiológicos. *Salud Publica Mex.* 1976;18:837–43.
12. Reyes P, Mendoza M, Marcushamer MJ GZ. Miocardiopatía congestiva y tripanosomiasis americana (estudio clínico y serológico). *Salud Publica Mex.* 1983;2:139–44.
 13. Tay J, Salazar-Schettino PM, Ontiveros A J, J. Estudio epidemiológico de enfermedad de Chagas en una población de Oaxaca. Primer caso de megasigmoïdes en México. *Parasitol.* 1985;1:17–24.
 14. Prata A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;1:81–8.
 15. Ramsey, J. M. & Schofield CJ. Control of Chagas disease vectors. *Salud Publica Mex.* 2003;45:123–8.
 16. Benenson A.S. El control de enfermedades transmisibles en el hombre. *Inf Of la Asoc Estadounidense Salud Pública.* 1992;15:538–42.
 17. García N.M. Desarrollo de un método inmunoenzimático para la detección de anticuerpos contra ADN de doble cadena. *ISCM La Habana;* 1995.
 18. Benenson A.S. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 16° ed. Washington DC OPS; 1997. 465–468 p.
 19. Becerril-Flores MA, Romero-Cabello R. Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad. In: *Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad.* Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2004. p. 73–83.
 20. Botero D RM. Parasitosis intestinales por cestodos y tremátodos. In: Botero D Restrepo M, editor. *Parasitosis humanas.* 4°. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB); 2003. p. 142–58.
 21. Asin S.N., Giojalas L.C. Type of rectal contents and infectivity of domiciliary populations of *triatoma infectans* (Hemiptera: reduviidae) in Argentina. *J Med Entomol.*

- 1995;399–401.
22. Petry K, Eisen H. Chagas disease: A model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol Today*. 1989;5(4):111–6.
 23. Velasco O, E GC, Ibañez S. Enfermedades Tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. Inst Nac Diagnóstico y Ref Epidemiológica la Secr Salud. 1994;279–91.
 24. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. Parasitología Clínica. In: 2ª, editor. *Parasitología Clínica*. 1986. p. 65–112.
 25. Cúyas MC, García J. Tripanosomiasis americana. Enfermedad de Chaga. In: *Medicina Interna*. 13ª. España: Mosby; 1995. p. 2448–51.
 26. Kennet EM. Tripanosomiasis Americana. In: *Tratado de Enfermedades Infecciosas*. 2ª. La Habana: Científico-Técnico; 1982. p. 1027–34.
 27. Hernandez MC, Fernández AM, Alcina A, Fresno M. Characterization of a Glycolyl-Phosphatidylinositol anchored membrane protein from *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1991;59:1409–16.
 28. Moncayo A. Enfermedad de Chagas en el Cono Sur: progreso en la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur. *Med (Buenos Aires)*. 59AD;2:120–4.
 29. Atias A, Neghme A. *Parasitología Clínica*. 3ª. Chile: Editorial Mediterráneo; 1991.
 30. De la Cruz M. Influencia de endosimbiontes sobre el desarrollo de *Triatoma barberi* y la colonización de *Trypanosoma cruzi*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2013.
 31. Wilson M. A world guide to infections: Diseases, Distribution, Diagnosis. In: *Profiles of infections*. New York: Oxford University Press; 1991. p. 675–6.
 32. Anselme A, Moleiro F. Pathogenic mechanisms in Chagas cardiomyopathy. In:

Tripanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas. 1974. p. 125--136.

33. Blanco S, Spillmann C, Canale D, Ripoll C, Audisio M, Martini F. Programa Nacional de Chagas Argentinas. Rev Minist Salud Nación Argentina. 2006;1:5–65.
34. Apt B W, Heitmann G I, Jercic L MI, Jotré M L, Muñoz C. del V P, Noemí H I, et al. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte III. Enfermedad de Chagas en donantes de banco de sangre. Rev Chil infectología. 2008;25(4):285–8.
35. Moncayo A. Progreso en la interrupcion de la transmision de la enfermedad de chagas en los paises del cono sur. World Dev. 1999;19–20.
36. Apt W. Transmisión Congénita de Protozoos Parásitos. Boletín la Of Sanit Panam. 1972;72:517–45.
37. Tay J, Lara R, Gutiérrez M, Velasco O. Parasitologia mèdica. 7º. Editores M, editor. 2002. 504 p.
38. Hoft D, Lynch R, Kirchhoff L. Kinetics analysis of antigen-specific immune response in resistant and susceptible mice during infection with Trypanosoma cruzi. immunol. 1993;151:7038–47.
39. Serena G, Yan S, Camhi S, Patel S, Lima RS, Sapone a., et al. Proinflammatory cytokine interferon- γ and microbiome-derived metabolites dictate epigenetic switch between forkhead box protein 3 isoforms in coeliac disease. Clin Exp Immunol. 2017;187(3):490–506.
40. Higuchi M, De Brito T, Reis M, Al E. Correlation between Trypanosoma cruzi parasitism and myocardium, inflammatory infiltrate in human chronic chagásica myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. Cardiovasc Pathol. 1993;2:101–6.
41. Hudson I, Guhl F, Sánchez N. Longitudinal studies of the inmune response of Colombia patiens infected with Trypanosoma cruzi and T. rangeli. Departament of Inminology. 1987;12.

42. Reyes M, Lorca M, Muñoz P. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:2846.
43. Hontebeyrie-Joskowisz M, Minoprio P. Chagas disease: *Trypanosoma cruzi* vrs the host immune system. *Res Immunol.* 1991;142:137–67.
44. Sánchez JMC, Sánchez AN, De Jesús MJ V. Liposomes Isolation and Characterization by Microencapsulation. *FarmaJournal.* 2016;1:93–100.
45. Duwe, H., Sackmann. Bending Elastic Moduli of Lipid Bilayers. *J Physics,.* 1990;51:17.
46. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Woo Joo S, Zarghami , Nosratollah Hanifehpour Y, Samiei M, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(102).
47. Nayar, R.M., Hope, J., Cullis P. Generation of Large Unilamellar Vesicles from Long-Chain Saturated Phosphatidylcholines by Extrusion Technique. *Biochim Biophys.* 1989;986:6.
48. Delgado Ó, De Jesús-Valle MJ, Sánchez-Navarro A. Design of a Liposomal Formulation Aimed to Vaccines Administration. 2016;1(1):53–60.
49. Perrie Y, Kastner E, Kaur R, Wilkinson A, Ingham AJ. A case-study investigating the physicochemical characteristics that dictate the function of a liposomal adjuvant. *Hum Vaccines Immunother.* 2007;121:216–26.
50. Mouritsen O, Jørgensen K. A New Look at Lipid Membrane Structure in Relation to Drug Research. *Pharm Res.* 1998;15:12.
51. Zambrano S. *Inmunología básica y clínica.* México: McGraw-Hill Interamericana; 2007. 384 p.
52. Mereles E. Antígenos. In: *inmunol.* Universidad Nacional de Misiones; 2009. p. 368.
53. Romero EL, Morilla MJ. Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2010;62(4–5):576–88. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.025>

54. Morilla MJ, Montanari J, Frank F, Malchiodi E, Corral R, Petray P, et al. Etanidazole in pH-sensitive liposomes: Design, characterization and in vitro/in vivo anti-Trypanosoma cruzi activity. *J Control Release*. 2005;103(3):599–607.
55. Migliaccio V, Santos FR, Ciancaglini P, Ramalho-Pinto FJ. Use of proteoliposome as a vaccine against Trypanosoma cruzi in mice. *Chem Phys Lipids*. 2008;152(2):86–94.
56. Mesa C, Leon J, Rigley K, Fernandez LE. Very small size proteoliposomes derived from Neisseria meningitidis: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. *Vaccine*. 2004;22:3045–52.
57. Yotsumoto, S., Kakiuchi, T., Aramaki Y. Enhancement of IFN- γ production for Th1-cell therapy using negatively charged liposomes containing phosphatidylserine. *Vaccine*. 2007;25:5256–62.
58. Ghosh J, Guha R, Das S, Roy S. Liposomal cholesterol delivery activates the macrophage innate immune arm to facilitate intracellular leishmania donovani killing. *Infect Immun*. 2014;82(2):607–17.
59. Zavala-Castro JE. Enfermedad de Chagas y otras tripanosomiasis. In: *Parasitología Médica*. McGraw-Hill; 2011. p. 430.
60. Guzmán-Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in México: an update. *Trends Parasitol*. 2001;17(8):372–6.
61. Arévalo U, Panebra A, Santa cruz C. Relevance of Hemin for in vitro Differentiation of Trypanosoma cruzi. *U. Protozoal*, fl: 553-SSS. *J Protozool*. 1985;32:553–5.
62. Saroja C, Lakshmi P, Bhaskaran S. Recent Trends in Vaccine Delivery Systems: A Review. *Int J Pharm Investig*. 2011;1(2):64–74.
63. Gregoriadis G, Perrie Y. Liposomes. In: *Encyclopedia of life Sciences*. 2010. p. 1–8.
64. Owais M, Gupta C. Liposome-mediated cytosolic delivery of macromolecules and its

- possible use in vaccine development. *Eur J Biochem*. 2000;267:3946–56.
65. Shuttleworth Martyn. Diseño factorial [Internet]. 2009. Available from: <https://explorable.com/es/disenio-factorial>
 66. Del S. Guzman E, Barrera MA, Rodríguez MF. Viabilidad del Trypanosoma cruzi en Triatoma dimidiata muertos. *Enf Infec y Microbiol* [Internet]. 1999;19(3):113–5. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-1999/ei993b.pdf>
 67. Toso A, Vial F, Norbel G. Oral transmission of Chagas' disease. *Rev Méd Chile*. 2011;139(2):258–66.
 68. C. Jaafar-Maalej, R. Diab, V. Andrieu, A. Elaissari HF. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *J Liposome Res*. 2010;20(3):228–43.
 69. V. Rider, N.I. Abdou (Ed.) MJL. Sexual dimorphism and the immune system in principles of gender-specific medicine. Elsevier Acad Press. 2004;2:1071–81.
 70. Cook IF. Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines. *Vaccine* [Internet]. 2008 Jul 4 [cited 2019 Mar 28];26(29–30):3551–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X08005069#bib5>
 71. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2001;1(6):983–93. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576901000443>
 72. Jaillon S, Berthenet K, Garlanda C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;1–14.
 73. Fao. Ingesta de grasa y ácidos grasos y respuesta infl amatoria e inmunitaria. In: *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana* [Internet]. 2012. p. 99–105. Available from: <http://www.fao.org/docrep/017/i1953s/i1953s.pdf>
 74. L. Nunn Charles, Lindenfors Patrik PER and RJ. On sexual dimorphism in immune

function. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci.* 2008;12(364(1513)):61–9.

75. Bonnardel J, Guilliams M. ScienceDirect Developmental control of macrophage function. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2018;50:64–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.12.001>
76. Sica A. MA. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122:787–95.
77. Basso B, Moretti E, Fretes R. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* induces resistance of guinea pigs to virulent *Trypanosoma cruzi*. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2014;157(1–2):119–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.10.011>
78. Basso B, Marini V. Experimental Chagas disease in Balb/c mice previously vaccinated with *T. rangeli*. II. The innate immune response shows immunological memory: Reality or fiction? *Immunobiology* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2019 May 3];220(3):428–36.
79. Verdín-Terán SL, Moreno FL, Rojo BN, García AL, Omaña MM, Meneses A NO. *Histología e inmunohistoquímica, manual de métodos.* Universidad Nacional autónoma de México. 2013;1–27.

XII. ANEXOS

12.1 Curva patrón para medición de proteínas

Tabla 4. Diluciones para curva patrón para medición de proteínas.						
Concentración $\mu\text{g/mL}$	0	2	4	6	8	10
H ₂ O μl	100	98	96	94	92	90
BSA μl	0	2	4	6	8	10
Bradford μl	900	900	900	900	900	900
Vol. Final mL	1	1	1	1	1	1

12.2 Preparación de medio LIT (infusión de hígado y triptosa).

Tabla 5. Reactivos para la elaboración de medio LIT.	
Elemento	Cantidad
NaCl	4.0g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄	8.0g
Glucosa	2.0g
Triptosa	5.0g
Infusión de hígado	5.0g
Hemina	25.0 mg
FCS (Suero fetal bovino)	100ml
H ₂ O	1000ml
pH= 7.2	

Se mezclan el NaCl, KCl, Na₂HPO₄, Glucosa, Triptosa y la Infusión de hígado en un frasco de vidrio 1000ml con tapa, se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión, 121 ° C durante 15 min, se deja enfriar a temperatura ambiente, se agrega el FCS (Suero Fetal bovino) inactivo y finalmente se agrega la Hemina previamente filtrada (filtro de 0.22 µm de diámetro de poro) para evitar contaminación, la manipulación se hizo en un gabinete de bioseguridad tipo II/AB, para mantener condiciones de total esterilidad. El medio es refrigerado a una temperatura de 4°C.

12.3. Proceso de preparación para cortes histológicos de corazón.

El proceso que se siguió en la técnica histológica fue el descrito por Verdín y colaboradores (79). La obtención del órgano se llevó a cabo posterior a la muerte o sacrificio de los animales, según fue el caso. El corazón se conservó en tubos pequeños con formol al 20%, los tubos fueron rotulados con el grupo correspondiente. Posteriormente cada corazón se cortó a la mitad de manera longitudinal, posteriormente se deshidrató utilizando alcohol etílico de concentración creciente hasta llegar a alcohol absoluto (50, 70, 80, 95, absoluto) mediante baños de una hora por cada concentración de alcohol; una vez deshidratado, el tejido fue aclarado mediante baños de xilol con la finalidad de hacer transparente el órgano, el volumen de xilol utilizado fue en la misma proporción del agente deshidratante (alcohol) y cada muestra de tejido fue colocada en tres baños con xilol de una hora cada uno, siendo el primer baño en xilol al 50%- alcohol al 50% y los dos posteriores únicamente de xilol.

La inclusión consistió en colocar las dos mitades del corazón en cassetes y rellenar con parafina a 60 ° C en una placa caliente, posteriormente cada cassette fue colocado en una placa fría para que la parafina solidificara y de esta manera se conformaron los bloques histológicos los cuales se refrigeraron durante una hora antes de realizar los cortes.

Los bloques fueron colocados en un micrótopo manual de rotación marca leica, modelo RM2125RT, se obtuvieron dos cortes por duplicado por corazón separados por 50 cortes cada uno con un grosor de 3 micras los cuales se colocaron en un baño maría a 38 °C que contenía un poco de grenetina para facilitar la adhesión a portaobjetos previamente rotulados con punta diamante, las laminillas fueron colocadas en canastillas y puestas en una estufa a 38 ° C para desparafinarse.

Una vez que la parafina se derritió, se comenzó el proceso de tinción como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 6. Tinción Hematoxilina-Eosina para cortes de 3 micras.	
Componente	Tiempo
Xilol	5´
Xilol	5´
Alcohol xilol	5´
Alcohol absoluto	5´
Alcohol absoluto	5´
Alcohol 96%	5´
Alcohol 96%	5´
Hematoxilina	5´
Agua corriente	5´
Baño rápido en alcohol ácido	3’’
Agua corriente	5´
5-10 Baños en agua amoniacal o carbonato de litio	1´
Agua corriente	5´
Alcohol 80%	5´
Alcohol 96%	5´
Alcohol 96%	5´
Eosina	30’’
Alcohol 96%	5´
Alcohol 96%	5´
Alcohol 96%	5´
Alcohol absoluto	5´
Alcohol absoluto	5´
Alcohol xilol	5´
Xilol	5´
Xilol	5´

Una vez finalizado el proceso de tinción las laminillas se prepararon para el montaje, se utilizó una gota de resina histológica en cada laminilla y se colocó un cubreobjetos cuidando que no aparecieran burbujas. Las laminillas se colocaron en un horno a una temperatura de 45 ° C durante 24 horas, una vez que la resina tuvo solidez suficiente y los restos de xilol se evaporaron se procedió a la observación de cada una de las laminillas bajo el microscopio óptico.

Biól. Abigail García Castro
Email: abieegc@gmail.com