

Ciencia Latina
Internacional

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), enero-febrero 2024,
Volumen 8, Número 1.

DOI de la Revista: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1

**INMUNOPROTECCIÓN CONTRA ENFERMEDAD
DE CHAGAS INDUCIDA POR UN EXTRACTO
TOTAL LIPOSOMAL DE TRYPANOSOMA CRUZI
EN RATONES CD-1**

**IMMUNOPROTECTION AGAINST CHAGAS DISEASE
INDUCED BY A TOTAL LIPOSOMAL EXTRACT OF
TRYPANOSOMA CRUZI IN CD-1 MICE**

Marco Antonio Becerril Flores

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

Abigail García Castro

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

José Ramón Montejano Rodríguez

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

Georgina Almaguer Vargas

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

Eduardo Mauricio Mata Cárdenas

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

Gabriela Pedrero Huerta

Escuela de Medicina Intermédica, México

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1.10451

Inmunoprotección contra Enfermedad de Chagas Inducida por un Extracto Total Liposomal de *Trypanosoma Cruzi* en Ratones CD-1

Marco Antonio Becerril Flores¹

becerril@uaeh.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0002-2322-4686>

Instituto de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
México

Abigail García Castro

ga185930@uaeh.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0001-8834-1966>

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
México

José Ramón Montejano Rodríguez

jose_montejano5902@uaeh.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0002-5744-381X>

Instituto de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
México

Georgina Almaguer Vargas

georgina_almaguer5910@uaeh.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0002-0396-752X>

Instituto de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
México

Eduardo Mauricio Mata Cárdenas

ma398655@uaeh.edu.mx

<https://orcid.org/0009-0009-7237-4005>

Instituto de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
México

Gabriela Pedrero Huerta

gabriela.pedrero@emintermedica.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0002-7543-7579>

Escuela de Medicina Intermédica
México

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una infección causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). En el 2017 la Organización Mundial de la Salud reportó 6 a 7 millones de personas infectadas y la muerte de 50,000 en donde 30 a 40% desarrollan miocardiopatías con consecuencias fatales. Es por eso la necesidad de tener inmunógenos que confieran protección contra la infección. El objetivo de este estudio fue probar un extracto antigénico totales de *T. cruzi* dentro de liposomas para facilitar su introducción en macrófagos de ratones CD-1 para favorecer la protección contra *T. cruzi* el cual es un excelente modelo, similar al humano. Los parásitos cultivados en medio LIT se lisaron por congelación-descongelación y el extracto total purificado se introdujo en liposomas con los cuales se inmunizaron ratones los cuales después de 45 días se retaron con el parásito. Los resultados mostraron aumento de la producción de anticuerpos anti-*T. cruzi* tanto en hembras como en machos después de los 45 días de infección, disminución de la mortalidad y la parasitemia y la sobrevivencia del 100% para hembras y 14% para machos, además de una franca activación de macrófagos concluyendo inmunoprotección contra la infección de *T. cruzi*.

Palabras clave: trypanosoma cruzi, inmunoprotección, liposomas, inmunidad, chagas

¹ Autor principal

Correspondencia: becerril@uaeh.edu.mx

Immunoprotection Against Chagas Disease Induced by a Total Liposomal Extract of *Trypanosoma Cruzi* in CD-1 Mice

ABSTRACT

Chagas disease is an infection caused by the hemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). In 2017, the World Health Organization reported 6 to 7 million people infected and the death of 50,000, where 30 to 40% developed cardiomyopathies with fatal consequences. That is why there is a need to have immunogens that provide protection against infection. The objective of this study was to test a total antigenic extract of *T. cruzi* within liposomes to facilitate its introduction into macrophages of CD-1 mice to promote protection against *T. cruzi*, which is an excellent model, similar to that of humans. The parasites cultured in LIT medium were lysed by freezing-thawing and the purified total extract was introduced into liposomes with which mice were immunized, which after 45 days were challenged with the parasite. The results showed increased production of anti-*T. cruzi* antibodies in both females and males after 45 days of infection, decreased mortality and parasitemia and 100% survival for females and 14% for males, in addition to a clear activation of macrophages concluding immunoprotection against *T. cruzi* infection.

Keywords: trypanosoma cruzi, inmunoprotección, liposomes, immunity, chagas

Artículo recibido 15 febrero 2023
Aceptado para publicación: 10 marzo 2023



INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por *T. cruzi*, un parásito protozoario hemoflagelado transmitido por varios mecanismos, pero el más frecuente es a través de las deyecciones del insecto denominado triatomino que elimina al microorganismo durante la picadura a organismos de sangre caliente incluyendo el humano (Becerril-Flores, 2023). La fase infectante es el tripomastigote, el cual se introduce en cualquier célula nucleada pero principalmente las células de músculo cardíaco, tejido nervioso y macrófagos. Las consecuencias pueden ser fatales causando síntomas en su fase aguda como son los relacionados a la puerta de entrada del protozoario, por ejemplo un edema bupalpebral generalmente unilateral llamado “Signo de Romana”, además fiebre, cefalea, síntomas intestinales y respiratorios; después de una fase indeterminada que puede durar varios años en donde el paciente está asintomático, excepto por la detección de problemas cardíacos por medio de electrocardiogramas y la identificación de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Después de esta fase se presenta la fase crónica en la que continúan las manifestaciones cardíacas como es el hemibloqueo o bloqueo completo de la rama derecha del Haz de His; también se presentan agrandamiento de diversos órganos produciéndose megasófago, megacolon, megauréter y por supuesto cardiomegalia, todos ellos pueden conducir a la muerte del infectado con *T. cruzi* (Becerril-Flores, 2023). En el 2017 la Organización Mundial de la Salud reportó que el número de personas infectadas por este parásito es de 6 a 7 millones en el continente americano, 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 (WHO,2023). 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. Para esto último 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 (Bonnardel, J., & Guilliams, M. 2018). Lo anterior considerando que un inmunógeno que se encuentra en un liposoma es protegido por la cubierta lipídica pero es procesado lentamente para generar una respuesta inmune celular y humoral sin que se destruya por completo y por



tanto conservando su poder inmunogénico. Dicho vehículo se ha probado en enfermedades parasitarias como Malaria y Leishmaniasis generando una buena respuesta inmune. Es por esto que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto producido en ratones cepa CD-1 por la inoculación de un extracto antigénico total de *Trypanosoma cruzi* dentro de una base de liposomas.

METODOLOGÍA

Se realizó una investigación básica de tipo experimental y exploratoria en ratones cepa CD-1 pues son un buen modelo que permite desarrollar la enfermedad de Chagas de manera similar a lo que ocurre en el humano.

Parásitos. Los protozoarios de la especie *T. cruzi* han sido mantenidos en medio de cultivo LIT a 28°C dentro del laboratorio de Microbiología experimental del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). en medio de cultivo LIT a 28°C y al mismo tiempo en ratones CD-1 dentro del bioterio de la UAEH durante 16 años, desde su primoaislamiento a partir de un triatomino de la especie *T. barberi* en el municipio de Tasquillo en el estado de Hidalgo (Becerril et al. 2007). Para su mantenimiento, tanto en ratones como en el medio de cultivo los pases de *T. cruzi* se han realizado cada 15 a 21 días. La manipulación se ha llevado a cabo en un gabinete de bioseguridad tipo II/AB, para mantener condiciones de total esterilidad.

Obtención del extracto antigénico de *T. cruzi*. El antígeno de *T. cruzi* se obtuvo por congelación y descongelación. Se obtuvieron cultivos con un número de parásitos de 2 a 20 x10⁶ parásitos/mL, los cuales se lavaron 3 veces con PBS 0.15 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 para tener un volumen final de 5 mL. Se sometieron a una temperatura de -12 ° C por 24 h dentro de un congelador. Después de la congelación se colocaron a una temperatura de 78 °C durante 5 min para propiciar la lisis de los parásitos, enseguida se observó bajo el 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. Para ello Se midió la concentración de proteínas presentes en el extracto antigénico, con la finalidad de obtener suficiente antígeno para determinar la relación de la producción de una respuesta inmune con la cantidad de proteínas provenientes de *T. cruzi* administrados a los ratones.



Elaboración de liposomas. Los componentes que se utilizaron para la elaboración de liposomas se obtuvieron a partir de aceite vegetal al 95%, compuesto principalmente por aceite de girasol, soya, canola, cártamo y 5% de detergente Tween 20 para lograr estabilidad en las vesículas (Delgado-Rubio, O., De Jesus-Valle, M. J., & Sanchez-Navarro, A., 2016) En un tubo de vidrio se agregaron 950 μ L de aceite vegetal y 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 (Delgado-Rubio, O., 2016).

Encapsulación del extracto antigénico de *T. cruzi*. En un tubo de vidrio se agregó 1 mL de liposomas a 1 mL de la concentración del extracto antigénico y fueron mezclados hasta conseguir una dispersión homogénea. Para la adición del antígeno, fue necesario añadir energía para la formación de las bicapas lipídicas, con ello los liposomas atrapan moléculas como drogas o antígenos que están presentes en el medio acuoso. Enseguida se realizó la inoculación intraperitoneal a los lotes de ratones mencionados a continuación.

Inoculación de ratones CD-1. 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 1×10^5 de parásitos de *T. cruzi*, para observar el efecto que el parásito tendría ante la presencia de anticuerpos producidos durante la inmunización.

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.

Por otro lado, se extrajo el plasma a 20 ratones inmunizados y a 10 ratones no inmunizados antes del reto y en los días 0 y 45 posteriores del mismo. Esto se realizó usando un soporte universal con el que se sostuvo un dispositivo de inmovilización y se introdujo el ratón sin anestesiarse, se calentó la cola durante 5 minutos para dilatar la vena y poder extraer la sangre más fácilmente ayudándose de una lámpara. Se le realizó una limpieza de cola con etanol al 70% y 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 μ L de heparina para evitar la coagulación, el procedimiento se terminó cuando se colectaron más de 100 μ L 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.

Hemaglutinación indirecta (HAI) para la detección de anticuerpos anti- *T. 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 masajearon para provocar el despegue de macrófagos. 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 μL , se extendió sobre un portaobjetos y se realizó una tinción de Giemsa para el conteo de macrófagos y parásitos en microscopio óptico a 100x.

Medición de la presencia de *T. cruzi* a ratones inmunizados. Con la finalidad de comprobar si el antígeno de *T. 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. Al término de cinco 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. Se medía la parasitemia, para esto se tomaron muestras de sangre y se realizaron conteos de parásitos dos 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 μL de cloruro de amonio para favorecer la lisis de los eritrocitos y se agregaron 10 μL de sangre de ratón, se dejó reposar la muestra por 10 min y se tomaron 10 μL para realizar el conteo celular. 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.

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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Encapsulación del extracto antigénico total y soluble de *T. 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 figura 1 se observa que en el centro de las vesículas se identifica una ligera tonalidad azul, demostrando que el antígeno se encontraba en el centro de los liposomas; en esta figura se muestran liposomas con antígeno teñido (Figura 1-A y liposomas sin antígeno (Figura 1-B).

Figura 1-A.

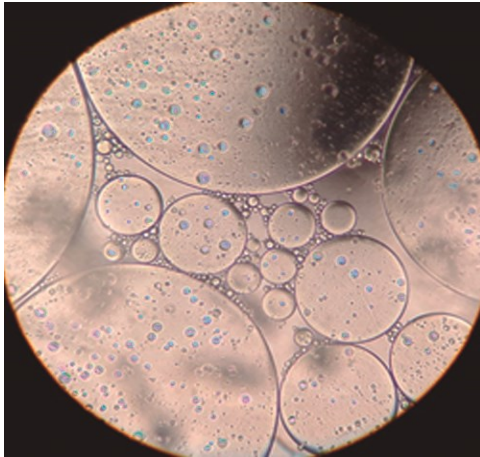
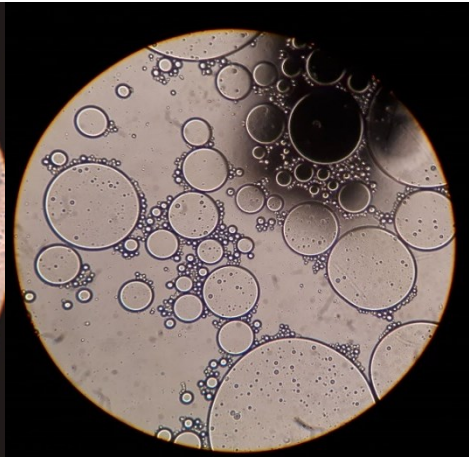


Figura 1-B.

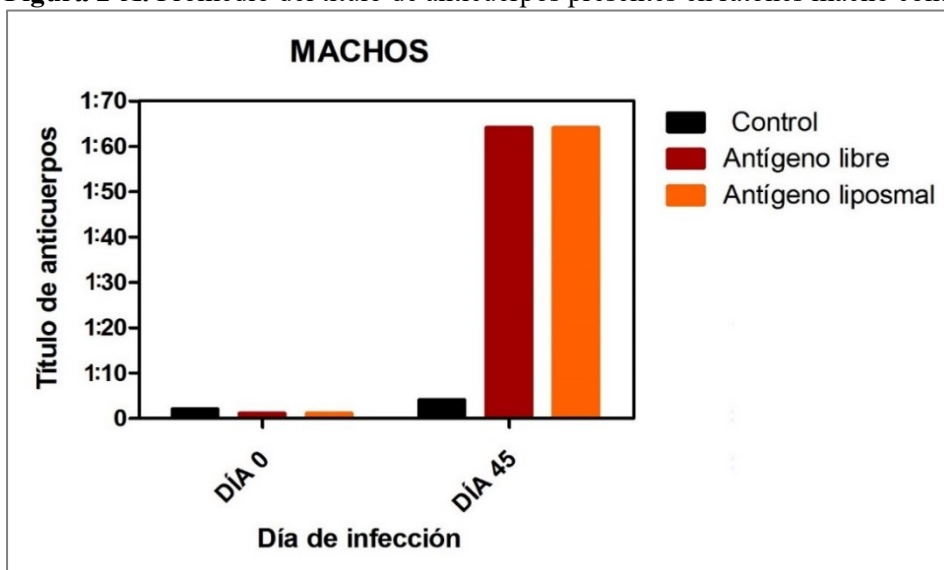


Liposomas con antígeno teñido encapsulado. 10x.

Liposomas sin antígeno 10X

Prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*. La figura 2-A muestra la gráfica que muestra el promedio del título de anticuerpos contra *T. cruzi* presentes en plasma de ratones machos con los distintos tratamientos. Se puede observar 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 2-A. Promedio del título de anticuerpos presentes en ratones macho control e inmunizados.

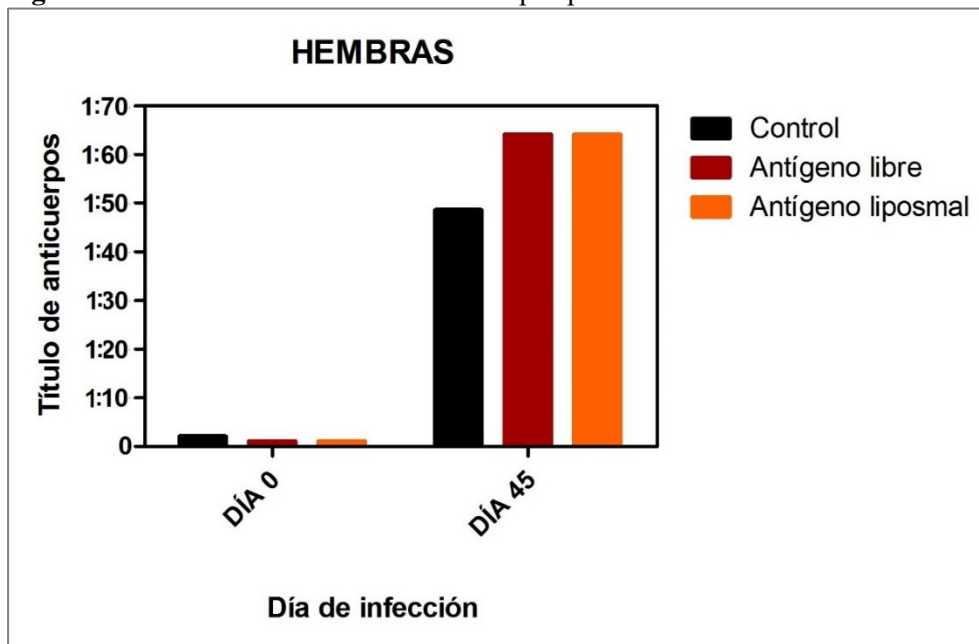


Existen diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2= 52.9$; $p<0.05$) entre el grupo control y los ratones inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal después de 45 días de infección.

Con relación a la inmunización de las hembras, en la siguiente imagen (Figura 2-B) 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 2-B. Promedio del título de anticuerpos presentes en ratones hembra control e inmunizadas.

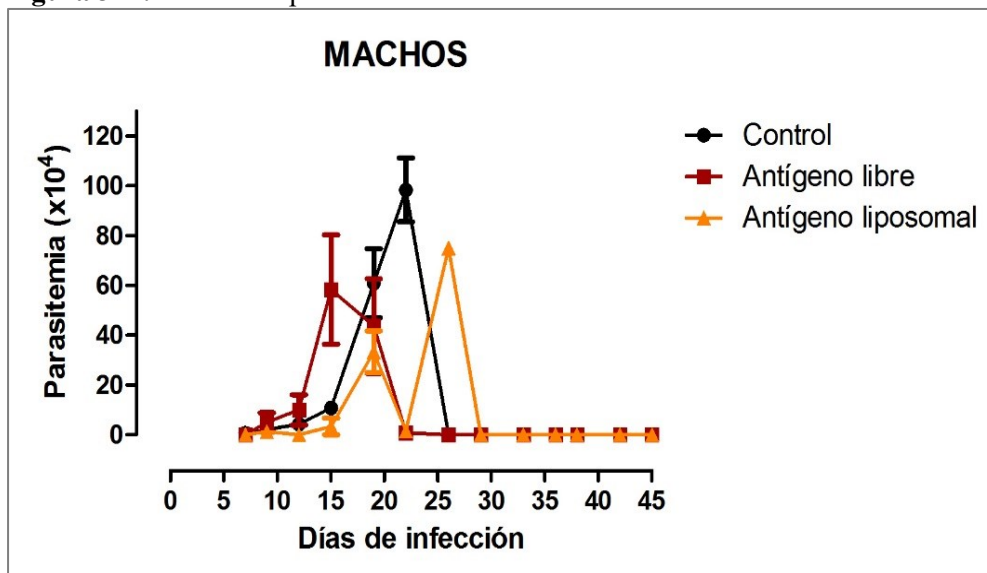


Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos inmunizados con antígeno libre y antígeno liposomal después de 45 días de infección ($\chi^2= 2.2$; $p<0.05$).

Determinación de parasitemia en ratones CD-1. Después de realizar las 5 inoculaciones intraperitoneales con antígeno liposomal o antígeno libre en diferentes momentos, cada semana, se realizó el reto con inoculación de 10×10^5 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. La figura 3 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. En los ratones macho se observa 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 en 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 no muestran diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2 = 1.9$; $p > 0.05$). En 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 detectando que el antígeno liposomal de igual manera ofreció protección en los primeros 20 días de infección y 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 3-A. Niveles de parasitemia en ratones macho control e inmunizados.

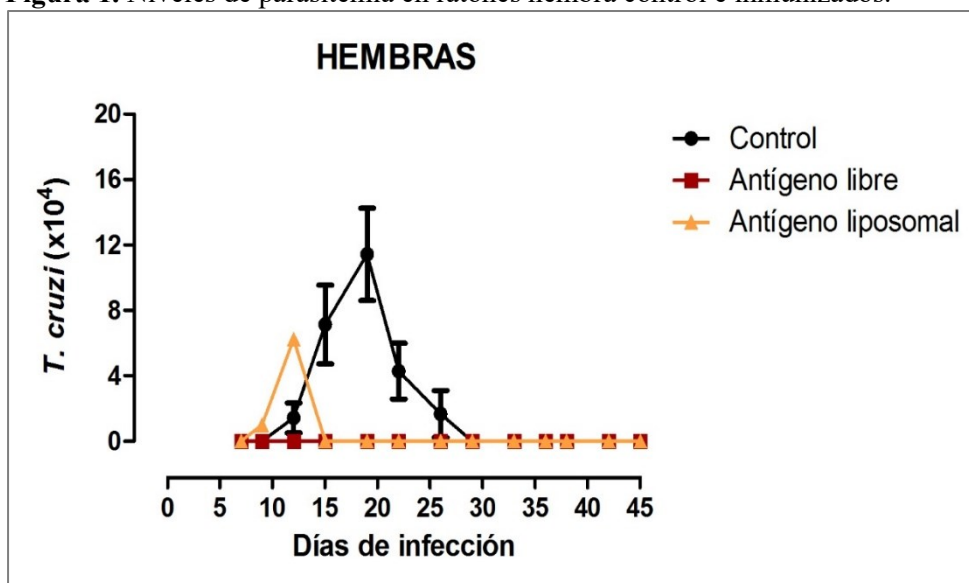


Las barras indican el error estándar. Existe diferencia estadísticamente significativa entre la parasitemia del grupo inmunizado con antígeno liposomal y el grupo control ($\chi^2 = 2.2$; $p < 0.05$).

En cuanto al grupo de hembras control e inmunizadas (Figura 3-B), 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 presentan un pico de parasitemia a los 10 días de infección que disminuye 5 días después, a diferencia del grupo inmunizado con Antígeno, en la 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 1. Niveles de parasitemia en ratones hembra control e inmunizados.

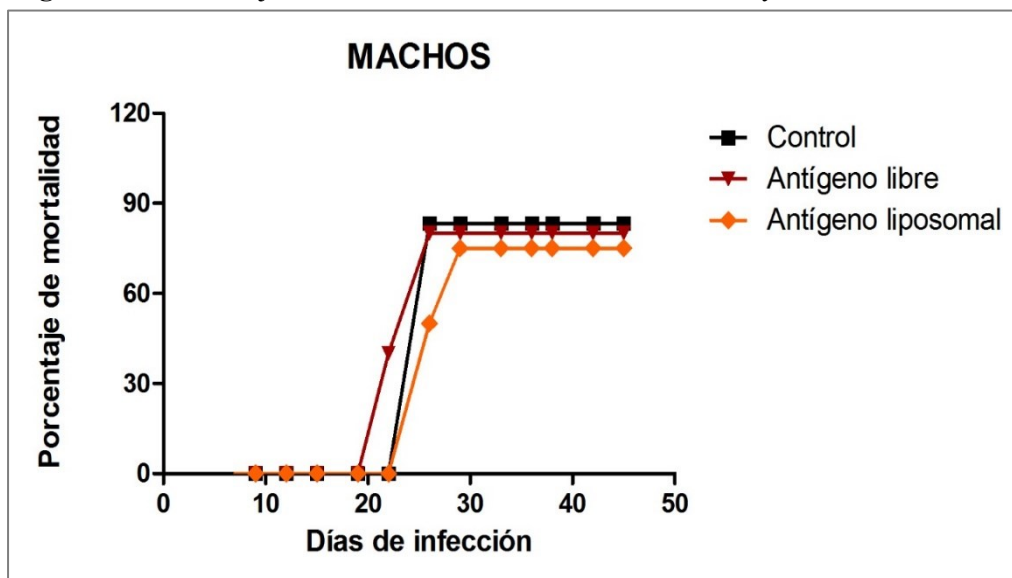


Las barras indican el error estándar. De acuerdo a la prueba de chi-cuadrada de Pearson existen diferencias estadísticamente significativas entre la parasitemia del grupo control y antígeno libre ($\chi^2= 3.49$; $p<0.05$), por el contrario no existen diferencias estadísticamente significativas entre 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: para el grupo control se observó una mortalidad del 83%, para los ratones inmunizados con Antígeno libre presento un porcentaje de 80% y para Antígeno liposomal presentaron un porcentaje de mortalidad de 75%. 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 ($\chi^2= 0.2$; $p>0.05$).

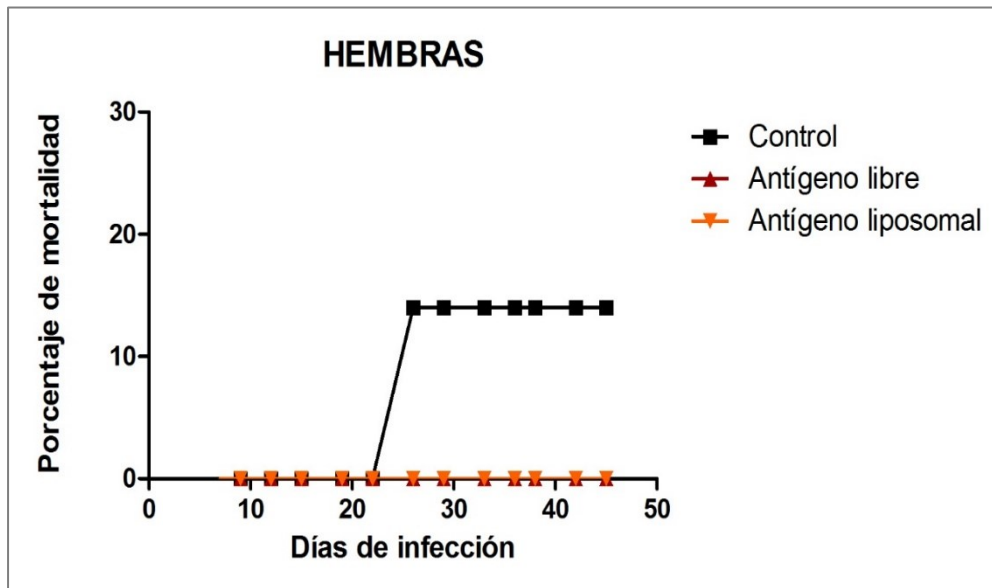
Figura4-A. Porcentaje de mortalidad en ratones macho control y ratones macho inmunizados.



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 ($\chi^2= 0.2$; $p>0.05$).

Por otro lado, las hembras inmunizadas con antígeno libre y liposomal 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 que el antígeno libre y antígeno liposomal, ofrece en las hembras una reducción de la mortalidad en un 14%. Por 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 ($\chi^2= 9$; $p<0.05$).

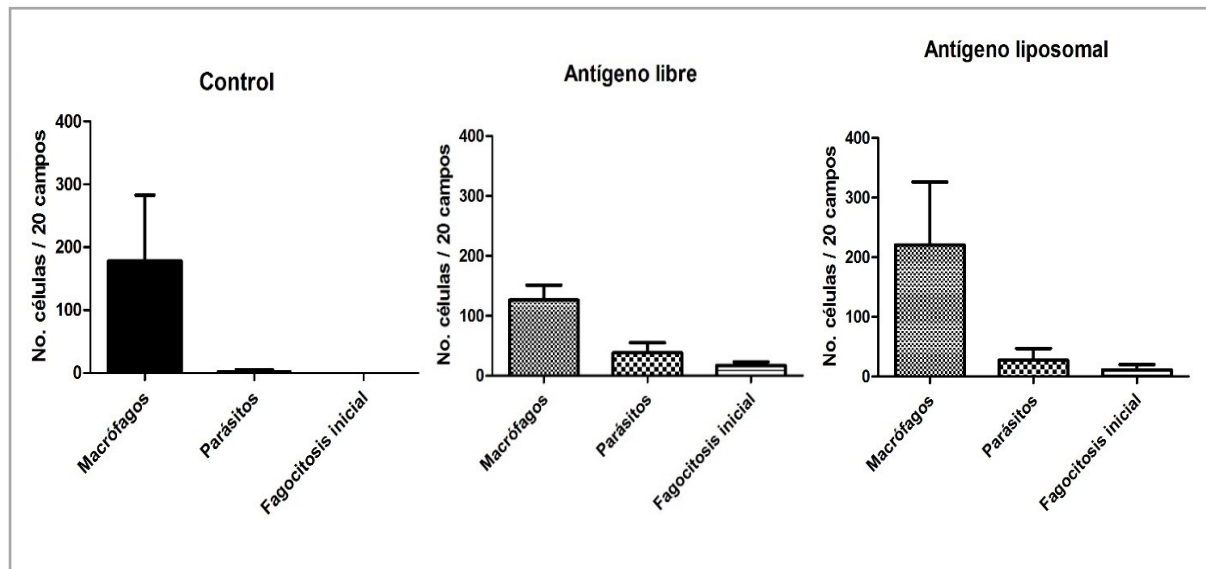
Figura 4-B. Porcentaje de mortalidad en ratones hembra control y ratones hembra inmunizados.



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

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

Figura 5. Cuantificación de macrófagos, parásitos y fagocitosis inicial.



CONCLUSIONES

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. 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 nm de diámetro, coincidiendo con lo publicado por Gregoriadis y cols, 2010 en donde los diámetros oscilan entre 10 y 25 nm, solo que emplearon liposomas de medicamentos (Gregoriadis, 2010; Romero, 2010). 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* (Mesa, C., 2004).

El extracto antigénico se encapsuló en liposomas pues, 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 (Akbarzadeh, A, 2013).

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 (Jaillon, S., 2017).

Los niveles de parasitemia de *T. cruzi* muestran diferencias entre machos y hembras, 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 (Verthelyi, D. ,2001). 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 (Bonnardel, J., & Guilliams, M., 2018).

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 (Petry, K., & Eisen, H., 1989).



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 (Bonardel,2017). 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 (Migliaccio, V. y cols. (2008), 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 cardiaco 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 (Reyes, M. B. 1990).

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.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-102>.
- Becerril-Flores, M. (2023). *Parasitología Médica*. Cd. de México: McGraw Hill.
- Bonnardel, J., & Williams, M. (2018). Developmental control of macrophage function. *Current Opinion In Immunology*, 50, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.12.001>.
- Delgado-Rubio, O., De Jesus-Valle, M. J., & Sanchez-Navarro, A. (2016). Diseño de una formulación de liposomas para la administración de vacunas. <https://revistas.usal.es/cinco/index.php/2445-1355/article/view/13228/14154>.
- Gregoriadis G, Perrie Y. Liposomes. In: Encyclopedia of life Sciences. 2010. p. 1–8.
- Jaillon, S., Berthenet, K., & Garlanda, C. (2017). Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clinical Reviews In Allergy & Immunology*, 56(3), 308-321. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8648-x>.
- Mesa, C., De León, J., Rigley, K. P., & Fernández, L. E. (2004). Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. *Vaccine*, 22(23-24), 3045-3052. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.02.010>.
- Migliaccio, V., Santos, F. R. D., Ciancaglini, P., & Ramalho-Pinto, F. J. (2008). Use of proteoliposome as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Chemistry And Physics Of Lipids*, 152(2), 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.12.003>.
- Petry, K., & Eisen, H. (1989). Chagas disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitology today*, 5(4), 111-116.
- Perrie, Y., Kastner, E., Kaur, R., Wilkinson, A., & Ingham, A. (2013). A case-study investigating the physicochemical characteristics that dictate the function of a liposomal adjuvant. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(6), 1374-1381. <https://doi.org/10.4161/hv.24694>.



Reyes, M. B., Lorca, M., Muñoz, P., & Frasch, A. C. (1990). Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 87(7), 2846-2850.

<https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2846>

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>

Serena , G., Yan , S., Camhi , S., Patel , S., Lima , R., & Sapone, A. (2017). Proinflammatory cytokine interferon-gama and microbiome-derived metabolites dictate epigenetic switch between forkhead box protein 3 isoforms in coeliac disease. *Clinical Experimental Immunology*, 187(3), 490-506.

Verthelyi, D. (2001). Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *International Immunopharmacology*, 1(6), 983-993. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00044-3).

World Health Organization. Chagas Disease Day 2023. (s. f.). <https://www.who.int/campaigns/world-chagas-disease-day/2023>

