



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DEL  
ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA Y LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA  
TcVac1M EN RATONES BALB/c INFECTADOS CON *Trypanosoma cruzi*”

# TESIS

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

**PRESENTA:**

M. en C. A. R. N. JOSÉ MARÍA ELOY CONTRERAS ORTIZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Julio 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DEL  
ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA Y LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA  
TcVac1M EN RATONES BALB/c INFECTADOS CON *Trypanosoma cruzi*”

# TESIS

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

**PRESENTA:**

M. en C. A. R. N. JOSÉ MARÍA ELOY CONTRERAS ORTIZ

**COMITÉ TUTORIAL:**

Dr. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN

Dr. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

Dr. RIGOBERTO OROS PANTOJA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Julio 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la UAEM y la Secretaria de Investigación**

Por el apoyo al proyecto de investigación No. 3326/2012, para la culminación del presente trabajo

Por brindarme un espacio académico, donde se desarrollaron habilidades, se adquirieron conocimientos y donde sobre todo se hizo ciencia, que nos permitió alcanzar las metas propuestas para la finalización de los proyectos descritos en este documento.

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**

Por la beca No. 252794 para los estudios de doctorado y por el apoyo al proyecto de investigación No. 156701.

### **A los amigos de trabajo CIESA-UAEM**

Por su apoyo y atenciones brindados durante el proceso del doctorado, *Esteban, Toño, Wael, Viri, Gabo, Mirna Faz, Gerardo, Laucel.*

### **A los profesores**

Por sus sabios consejos y tan valiosos.

### **A mi tutor y asesores académicos**

Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán, Dr. Alberto Barbabosa Pliego, Dr. Rigoberto Oros Pantoja, por la oportunidad, guía y consejos tan importantes, y por el apoyo brindado en cada etapa del proceso del doctorado en general, que llevo a la conclusión del mismo. **MUCHAS GRACIAS POR TODO.....**

## DEDICATORIAS

*Para ti Liliana E. Peralta García, por ser lo que me mueve y me impulsa, por soportar mis altas y bajas y por qué te hice parte de problemas que no tenías por qué pasar .....*

*Para ti Esteban y Aldo.... Porque son mi más grande inspiración....*

*Y a usted Dr. Tito por ser un alma caritativa y noble, le estaré eternamente agradecido....*

*A mi madre por todo su apoyo infinito y hermanos por estar conmigo siempre....*

*Y especialmente para una persona que se fue hace muchos años y que me enseñó que para conseguir algo hay que trabajar muy duro. Vivirás por siempre en mi corazón y recuerdos. Gracias Padre†.....donde sea que estés.*



**“Evaluación del efecto de la suplementación del antioxidante astaxantina y la administración de la vacuna TcVac1M en ratones BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi*”.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ASTX	Astaxantina
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
NFMX	Nifurtimox
ON	Óxido nítrico
ST	Células o parásitos sin tratamiento
RL	Radical libre
SOD	Superóxido dismutasa
GPx	Glutación peroxidasa
MDA	Malondialdehído
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
BZN	Benznidazol
TcG2	Antígeno vacunal TcG2
TcG4	Antígeno vacunal TcG4
TcVac1M	Vacuna recombinante TcG2/TcG4 modificado
EO	Estrés oxidativo
PBS	Buffer fosfato salino
PBS-T	Buffer fosfato salino-Tween 20
GPI	Glucosil-fosfatidil-inositol
T CD8+	Linfocito citotóxico CD8+
T Cd4+	Linfocito citotóxico CD4+
IL-12	Interleucina 12
GM-CSF	Factor estimulante de crecimiento de monocitos y granulocitos
MTS	Sales de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
PBN	Fenil-tertbutil-nitrona
SFB	Suero fetal bovino
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
IgG	Inmunoglobulina G
LB	Medio Luria-Bertani
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis Tumoral- $\alpha$
NK	Células Natural Killer

LTC	Linfocito T citotóxico
PGE2	Prostaglandina E2
Th1	Respuesta inmune humoral
Th2	Respuesta inmune celular
OMS	Organización Mundial de la Salud
TA	Tripanosomiasis americana
OPS	Organización panamericana de la salud
ECG	Electrocardiograma
CPA	Célula presentadora de antígenos
CL	Célula de Langerhans
CD	Célula dendrítica
MHC-1	Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1
MHC-2	Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 2
BcR	Receptor de las células B
LcR	Receptor de las células T
ASP	Proteína de superficie del parásito
HRP	Peroxidasa de rábano
CMCC	Cardiomiopatía chagastica crónica

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIAS .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
1. RESUMEN.....	xv
2. ABSTRACT.....	xvi
3. INTRODUCCIÓN .....	1
4. MARCO TEÓRICO.....	3
4.1 Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas.....	3
4.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
4.6 Ciclo de vida del parásito.....	5
4.3 Epidemiología .....	6
4.4 Carga económica de la enfermedad .....	7
4.5 Transmisión.....	7
4.7 Fases de la enfermedad de Chagas.....	9
4.8 Cardiomiopatía chagásica .....	10
4.9 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas .....	11
4.10 Inmunidad durante la enfermedad de Chagas .....	12
4.11 Tratamiento .....	12
4.12 Vacunas.....	13
4.13 Mecanismo de acción general de las vacunas clásicas.....	14
4.14 Vacunas de tercera generación.....	14
4.15 Electroporación .....	15
4.16 Mecanismo de acción de vacunas génicas .....	16
4.17 Vacunas profilácticas y terapéuticas para la enfermedad de Chagas .....	17
4.18 Estrés oxidativo en la enfermedad de Chagas.....	21
4.19 Antioxidantes .....	23
4.20 Astaxantina.....	26
4.21 Biodisponibilidad y farmacocinética de la astaxantina .....	29
4.22 Astaxantina, respuesta inflamatoria y sistema inmune .....	30

4.23 Astaxantina, antioxidantes y enfermedad de Chagas .....	31
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
6. HIPÓTESIS.....	34
7. JUSTIFICACIÓN .....	35
8. OBJETIVO GENERAL .....	36
8.1 OBJETIVO PARTICULAR.....	36
9. MATERIAL Y MÉTODOS .....	37
9.1 Estrategia in vitro .....	37
9.1.1 Cultivos de células .....	37
9.1.2 Cultivo de parásitos <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa NINOA en línea celular VERO.....	37
9.1.3 Cosecha de parásitos del cultivo celular .....	38
9.1.4 Extracción de astaxantina para uso <i>in vitro</i> .....	38
9.1.5. Estimación de la concentración de ASTX.....	38
9.1.6 Ensayo de toxicidad <i>in vitro</i> de la ASTX para <i>T. cruzi</i> y células Vero.....	39
9.1.7 Evaluación morfológica de los cambios inducidos por ASTX en co-cultivo de células Vero y <i>T. cruzi</i> .....	39
9.1.8 Astaxantina como preventivo para infección de <i>T. cruzi</i> en células Vero .....	40
9.2 Estrategia in vivo.....	40
9.2.1 A) Astaxantina en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> .....	40
9.2.1.1 Animales y desafío.....	40
9.2.1.2 Parasitemia .....	41
9.2.1.3 Suplementación de ASTX y tratamiento con NFMX para ensayos in vivo.....	41
9.2.1.4 Sacrificio animal y muestreo de tejidos .....	42
9.2.1.5 Estudios histopatológicos.....	42
9.2.1.6 Ensayo Malondialdehído (MDA).....	43
9.2.2 B) TcVac1M y Astaxantina en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> .....	43
9.2.2.1 Clonación y replicación de pcDNA3.0/TcG2 y pcDNA3.0/TcG4.....	43
9.2.2.2 Extracción y purificación de la vacuna TcVac1M .....	43
9.2.2.3 Control de calidad de la purificación de plásmidos .....	44
9.2.2.4 Animales .....	44
9.2.2.5 Inmunización, infección y tratamientos .....	44
9.2.2.6 Suplementación con ASTX.....	45

9.2.2.7 Detección de anticuerpos IgG por ELISA.....	45
9.3 Análisis estadístico.....	46
10. RESULTADOS.....	47
10.1 Artículo Publicado .....	47
10.2 Segundo artículo enviado.....	60
11. DISCUSIÓN .....	83
12. CONCLUSIONES .....	90
13. REFERENCIAS.....	91
14. ANEXOS .....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de amastigote de <i>T. cruzi</i> .....	4
Figura 3. Epimastigote de <i>T. cruzi</i> teñido con Giemsa .....	5
Figura 4. Tripomastigote de <i>T. cruzi</i> .....	5
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
Figura 6. Especies de triatomíneos de importancia en México .....	8
Figura 7. Vista macroscópica externa de corazón chagásico .....	11
Figura 8. Etapas y tiempos de la enfermedad de Chagas .....	12
Figura 9. Mecanismo de acción de una vacuna de ADN .....	17
Figura 10. Estructura molecular lineal de la astaxantina .....	26
Figura 11. Distintas etapas de producción de ASTX por <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	26
Figura 12. Estructura molecular de distintos carotenoides .....	27
Figura 13. Disposición de la ASTX y otros antioxidantes	

a nivel membrana celular .....	28
Figura 14. Porcentaje de viabilidad de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> y células Vero después del tratamiento con diferentes dosis de ASTX .....	102
Figura 15. Parasitemia en sangre de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> .....	102
Figura 16. Tamaño de bazo de animales infectados experimentalmente con <i>T. cruzi</i> .....	103
Figura 17. Análisis histológico de secciones de tejido del corazón de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> y tratados con astaxantina y/o Nifurtimox .....	103
Figura 18. Análisis histológico de tejido del bazo de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> , tratados con Astaxantina y/o Nifurtimox .....	104
Figura 19. Niveles séricos de MDA en animales infectados con <i>T. cruzi</i> y suplementados con ASTX .....	104
Figura 20: Parásitos en sangre de ratones BALB/c vacunados con TcVac1M, infectados con <i>T. cruzi</i> y/o suplementados con ASTX .....	105
Figura 21: Porcentaje de sobrevivencia de ratones BALB/c vacunados con TcVac1M, desafiados con <i>T. cruzi</i> y/o	



suplementados con ASTX a los 60 días post-infección .....	106
Figura 22: Niveles de malondialdehído (MDA) en el suero de ratones BALB/c vacunados con TcVac1M, desafiados con <i>T. cruzi</i> y/o suplementados con ASTX .....	106
Figura 23: Nivel de anticuerpo IgG para TcVac1M en suero de ratones BALB/c .....	107
Figura 24. Cambios morfológicos de <i>T. cruzi</i> post-tratamiento con ASTX .....	107
Figura 25. Integridad de la membrana post-tratamiento con ASTX, determinado por tinción con azul tripán .....	107

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de triatomíneos de importancia en México .....	8
Tabla 2. Antígenos recombinantes empleados como estrategia vacunal contra infección experimental de <i>T. cruzi</i> .....	19
Tabla 3. Principales radicales libres presentes en estrés oxidativo .....	22
Tabla 4. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos .....	24
Tabla 5. Principales antioxidantes enzimáticos, no enzimáticos y su fuente de origen .....	25
Tabla 6. Capacidad comparativa de la ASTX y otros carotenoides para eliminar radicales libres .....	29
Tabla 7: Disposición de volúmenes para curva patrón de $\beta$ -caroteno y estimación de la concentración de ASTX .....	39
Tabla 8. Grupos de ratones del experimento A .....	41
Tabla 9. Grupos de ratones del experimento B .....	45
Tabla 10. Anomalías histopatológicas miocárdicas en ratones durante la fase aguda de la infección experimental con <i>T. cruzi</i> (60 días después de la infección) .....	105
Tabla 11. Efecto de la ASTX en cultivo de células Vero infectadas con <i>T. cruzi</i> (24 h post-tratamiento) .....	105
Tabla 12. Anormalidades histopatológicas del miocardio en ratones inmunizados con TcVac1M a 60 días post-infección .....	107

## 1. RESUMEN

El conocimiento científico en torno al parásito *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas, en la actualidad permite diversificar estrategias que tienen la finalidad de solucionar o aminorar el problema. Entre estas medidas se encuentra el control del vector, desarrollo de agentes farmacológicos y vacunas de nueva generación, así como el uso de tratamientos alternativos que involucran extractos herbolarios con capacidad antiparasitaria. A pesar del poco éxito alcanzado, la OMS aun reporta 8 millones de personas infectadas en el mundo, 25 millones en riesgo de contraer la infección y un registro de 10,000 muertes al año. En este contexto, el problema se ha globalizado ya que recientemente se han registrado casos de Chagas en lugares no endémicos. Actualmente solo los fármacos Nifurtimox y Benznidazol han demostrado eficacia en el tratamiento, sin embargo, su empleo conlleva a efectos adversos cuya severidad es dosis dependiente y proporcional a la cronicidad de la enfermedad. El panorama epidemiológico de esta enfermedad podría ser un gran desafío, debido a la inexistencia de vacunas antiparasitarias efectivas, aunado a la resistencia farmacológica que últimamente se ha reportado en el parásito.

Respecto a las estrategias vacunales, se han empleado antígenos de superficie del parásito como vacunas de ADN o proteínas recombinantes, las cuales han demostrado efectos inmunoestimulantes de las respuestas de tipo Th1 y Th2. En algunos casos, se ha controlado la carga parasitaria y el infiltrado inflamatorio, alcanzando mayor sobrevida en modelos de infección experimental. Sin embargo, estas medidas tienen limitantes terapéuticas, debido a que no se logra inmunidad estéril y/o las respuestas inmunitarias específicas son inadecuadas. Recientemente, llama la atención el uso de antioxidantes exógenos como medida terapéutica contra la enfermedad. En esta relación, las vitaminas E y C han demostrado efectos positivos en cuanto a la evolución de la cardiomiopatía chagásica crónica. Tales efectos cardioprotectores, se atribuyen a una disminución en los niveles de estrés y daño oxidativo, los cuales se asocian a la sobre-activación del sistema inmunitario contra la enfermedad de Chagas y/o a los efectos adversos propiciados por terapéutica farmacológica.

En la presente investigación evaluamos el efecto de la ASTX *in vitro*, en parásitos cultivados axénicamente y en co-cultivo con células Vero, e *in vivo*, donde se evaluó la suplementación de la ASTX en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* previamente inmunizados con TcVac1M. Los resultados *in vitro* muestran que la astaxantina tiene efecto detrimental sobre los parásitos, pero no cuando se cultiva con monocapa de células Vero. *In vivo*, la ASTX no mostró valor terapéutico frente a la infección pues los ratones murieron antes del día 30 después de la infección y no contribuyó en el control de la parasitemia. Sin embargo, se mostró incremento en la infiltración linfo-plasmocítica de tipo focal en corazón, con reducción en el número de nidos de amastigotes, y en bazo los folículos linfoides fueron menos hiperplásicos en comparación con los grupos control. El uso de la vacuna TcVac1M y la suplementación con ASTX, no mostró control en la carga parasitaria y la vacuna por sí sola mostró 50 % de sobrevivencia comparado con el 25 % en los ratones suplementados con ASTX. También se observó una disminución en los niveles de estrés oxidativo y no hubo mejora en la producción de anticuerpos IgG. En tejido cardíaco la suplementación del antioxidante registró nidos de amastigotes con moderada infiltración linfo-plasmocítica, comparado con el grupo control vacunal el cual no registró nidos de amastigotes y el infiltrado fue ligero. De ahí que no se recomienda el uso de la ASTX durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, ya sea solo o en combinación con fármacos terapéuticos. La vacuna TcVac1M por sí sola induce una buena respuesta inmune contra la infección inducida por *T. cruzi* en ratones BALB/c. A pesar de lo reportado, son necesario nuevas estrategias vacunales y sería importante evaluar la ASTX en fase crónica de la enfermedad de Chagas y determinar si tiene potencial contra el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica.

## 2. ABSTRACT

The scientific advances regarding the knowledge about *T. cruzi* parasite and Chagas disease have allowed us to propose different strategies to solve the problem, ranging from vector control, recombinant vaccine development and alternative treatments involving new drugs, Chemical agents and plant extracts that have shown potential against the parasite, but the success has not been complete since, despite advances, WHO still reports 8 million infected people in the world and 25 million more at risk of infection with a record of 10,000 deaths a year. On the other hand, the problem has become globalized, as cases of the disease have been recorded in non-endemic areas. Currently, only the drugs Nifurtimox and Benznidazole have demonstrated efficacy in the treatment, with effects proportional to the chronicity of the disease and severe collateral damages and unfortunately no vaccine is available, additionally resistance to anti-parasitic drugs has been reported. Vaccine strategies include using surface antigens of the parasite as DNA vaccines or recombinant proteins and have been shown to stimulate Th1 and Th2 type responses, controlling in some cases parasitic burden and inflammatory infiltrate, which increases survival of the experimental model, however, sterile immunity and adequate and specific immune response have not been achieved, and there are few studies that address the issue of the development of chagasic cardiomyopathy in chronic patients. Recently, the use of exogenous antioxidants as a potential treatment against the disease has been called because antioxidant therapy such as vitamins E and C decrease the levels of oxidative stress associated with Chagas disease, protecting the myocardium and controlling the progression to chagasic cardiomyopathy. In the present study, we evaluated the effect of ASTX *in vitro* on axenically cultured parasites and on co-culture with Vero cells. *In vivo*, ASTX supplementation was evaluated in *T. cruzi*-infected BALB/c mice and supplementation of ASTX and the use of the recombinant TcVac1M vaccine. The results show that astaxanthin has a detrimental effect on the parasites, but not when cultivated with monolayer Vero cells. *In vivo*, ASTX showed no therapeutic value against infection as the mice died before day 30 after infection and there was no control of parasitemia. However, an increase in focal type lympho-plasmacytic infiltration was shown in heart with reduction in the number of amastigotes nests, in spleen the lymphoid follicles were less hyperplastic compared to the control groups. The use of the TcVac1M vaccine and ASTX supplementation no showed control on parasite burden. The vaccine alone showed a 50% survival rate compared to 25% in ASTX-supplemented mice. There was also a decrease in oxidative stress levels however it was no improvement in the production of IgG antibodies. In cardiac tissue, antioxidant supplementation recorded amastigotes nests with moderate lymphoplasmacytic infiltration, compared to the vaccine control group which did not register amastigotes nests and the infiltrate was light. Therefore, we do not recommend the use of ASTX during the acute phase of *T. cruzi* infection, either alone or in combination with therapeutic drugs, and the TcVac1M vaccine alone induces a good immune response against the infection induced by *T. cruzi* in BALB/c mice. Despite the reported, new vaccine strategies are necessary and it would be important to evaluate ASTX in the chronic phase of Chagas disease and to determine if it has potential effect against the development of chronic chagasic cardiomyopathy.

### 3. INTRODUCCIÓN

Han pasado más 100 años desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas, sobre la cual se han realizado múltiples investigaciones para entender su comportamiento y generar estrategias terapéuticas o de control epidemiológico. Los métodos concernientes al tratamiento, permanecen insuficientes (Kowalska *et al.*, 2011) pues aún no existe un tratamiento eficaz y la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que es una enfermedad tropical desatendida, con registros de aproximadamente 8 millones de personas infectadas en el mundo y más de 25 millones de personas en riesgo de infección en los países endémicos (OMS, 2017).

Una de las afecciones más importantes vinculada a la enfermedad de Chagas, es la cardiomiopatía chagásica, en la cual se comprometen los cardiomiocitos y el sistema nervioso autónomo. En esta condición adversa, aún se desconoce si la fisiopatología es debida a la capacidad infectiva y de replicación del parásito en los cardiomiocitos o se debe a reacciones autoinmunes del hospedero con el subsecuente incremento de estrés oxidativo (EO) (Dhiman *et al.*, 2013; Zacks *et al.*, 2005; Bonney & Engman, 2008). Lo que parece un hecho, es que estas respuestas participan de manera conjunta en la evolución de la cardiomiopatía, la cual puede culminar en insuficiencia cardíaca y muerte repentina del hospedero (Zacks *et al.*, 2005).

Respecto al tratamiento, Nifurtimox (NFMX) y Benznidazol (BZN) son los únicos fármacos autorizados en varias regiones de América Latina, los cuales han demostrado eficacia terapéutica contra la enfermedad de Chagas, sobre todo durante la fase aguda. Así mismo (NFMX y BZN), además de mostrar poca efectividad durante la fase crónica, conducen a efectos colaterales severos (Castro, 2014), así como al desarrollo de resistencia farmacológica por parte de los parásitos (Camandaroba *et al.*, 2003). A estas limitantes, se suma la inexistencia de tratamientos vacunales, por tanto, se vuelve necesario y urgente la búsqueda de tratamientos alternativos.

Como parte de estas estrategias, en nuestro laboratorio se está trabajado desde hace varios años en el desarrollo de vacunas. Para este caso, los antígenos TcG2 y TcG4, que son proteínas situadas en la superficie de la membrana extracelular de *Trypanosoma cruzi*, y que se anclan a través de enlaces Glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) han sido empleados. Su evaluación previa en varios modelos biológicos incluyendo el murino, permite que sean considerados de manera individual o con adyuvantes, candidatos viables para el desarrollo de vacunas. Los resultados demuestran que estos antígenos despiertan una protección inmunitaria eficiente contra infección por *T. cruzi* (Bhatia & Garg, 2008; Bhatia *et al.*, 2004),

lo que ha permitido incrementar la sobrevivencia de los ratones. Sin embargo, se requiere que la vacuna tenga la capacidad para despertar respuestas inmunitarias adecuadas, efectivas y más eficientes.

A fin de explorar otras alternativas terapéuticas, estudios recientes proponen que la ingesta de antioxidantes exógenos, podrían tener efectos protectores, si se incluyen en la dieta de los pacientes chagásicos crónicos (Wen *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2010). Sin embargo, no existen reportes que hayan evaluado la efectividad de estos compuestos durante la fase aguda de la enfermedad. En esta relación, el pigmento carotenoide astaxantina (ASTX) (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta'$ -caroteno-4,4'-diona), que se encuentra de manera natural en algunos animales marinos, es un antioxidante que pertenece a la familia de las xantofilas (Guerin *et al.*, 2003). Se ha reportado que además de tener efectos cardioprotectores, fortalece el sistema inmunitario, debido a que se le atribuyen propiedades inmuno-moduladoras, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas (Chew *et al.*, 2011; Goto *et al.*, 2001; Iwabayashi *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010). A fin de evaluar si la astaxantina tiene efectos cardioprotectores, inmuno-protectores, antiparasitarios o efectos terapéuticos en la enfermedad de Chagas. En el presente estudio se analizaron los efectos de la ASTX en cultivo de parásitos y la suplementación de la misma en ratones BALB/c infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi*. Así mismo, también se evaluó la efectividad del tratamiento conjunto (vacuna TcVac1M/ASTX) en el mismo modelo biológico.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana (TA), también conocida como enfermedad de Chagas es una enfermedad parasítica tropical zoonótica potencialmente mortal. Afecta predominantemente estratos sociales marginados, debido a la predilección del hemíptero de la subfamilia Triatominae, que es su vector, y que reside en cabañas construidas con paredes elaborados de arcilla, bambú y palma, que son materiales que emplean personas de escasos recursos y extrema pobreza en los lugares endémicos. La enfermedad se cataloga como una Enfermedad Tropical Desatendida (del inglés Neglected Tropical Diseases) (OMS, 2017), donde desafortunadamente los residentes afectados mueren antes de ser diagnosticados (Kowalska *et al.*, 2011). Recientemente se ha mencionado que el patrón epidemiológico de la enfermedad se ha extendido parcialmente, debido a migración de personas afectadas de áreas rurales endémicas a áreas urbanas (OMS, 2017).

El agente etiológico *T. cruzi* (Chagas, 1909), desarrolla su ciclo de vida en hospederos vertebrados (mamíferos) e invertebrados (Triatominos), en donde ocupa diferentes estadios evolutivos. Fue descrito por el científico brasileño Carlos Chagas en el año de 1909 en Minas Gerais, después de aislar al parásito de *Panstrongylus megistus*, Carlos Chagas cultivó el parásito, reprodujo la infección en mamíferos y realizó observaciones del curso de la enfermedad en animales de laboratorio (Salazar-Schettino *et al.*, 2016). Sin embargo, muestras antiguas conservadas muestran presencia de fragmentos de ADN de *T. cruzi* en momias de Perú de hace aproximadamente 9000 años (Aufderheide *et al.*, 2004), aunque podrían asumirse muchos miles de años más atrás.

## 4.2 *Trypanosoma cruzi*

Es un protozoo parásito, que adopta diferentes formas dependiendo de la etapa de su ciclo de vida, característicamente presenta un flagelo que utilizan para su motilidad y su simple mitocondria contiene el kinetoplasto que es una red de ADN extranuclear constituida de maxi y mini círculos (Simpson, 1987) y corresponden al genoma mitocondrial generalmente localizado cerca del cuerpo basal del flagelo, taxonómicamente se clasifica de acuerdo a la siguiente imagen (Figura 1):

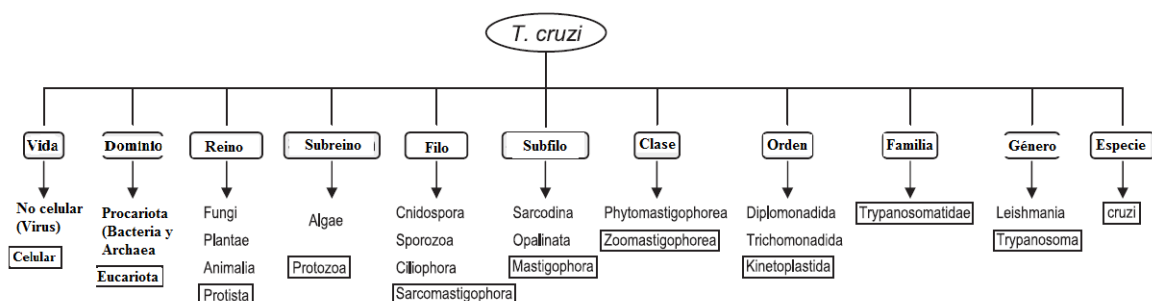


Figura 1. Taxonomía de *T. cruzi*. Tomado de Rassi *et al.*, 2012.

Evolutivamente *T. cruzi* adopta varias formas evolutivas, distinguiéndose 3 formas características (Bogitsh *et al.*, 2005):

**Amastigote:** Adquiere forma intracelular, ovoide, con una base flagelar, presenta un tamaño promedio de 1.5-5  $\mu\text{m}$  diámetro, con un núcleo largo y kinetoplasto prominente. Esta forma resulta de la diferenciación y división por fisión binaria del tripomastigote metacíclico una vez que infecto la célula (Figura 2).

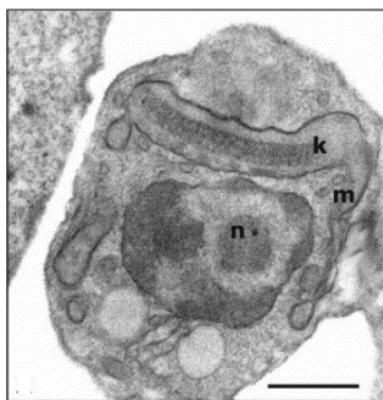


Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de un amastigote de *T. cruzi*. n, núcleo; k, kinetoplasto; m, mitocondria. Tomado y modificado de Silva *et al.*, 2007.

**Epimastigote:** Forma característica fusiforme, el kinetoplasto se encuentra en la parte anterior al núcleo y el flagelo en la parte posterior del parásito con una pequeña membrana ondulante,



principalmente se le encuentra en el intestino medio del triatomino, donde se diferencia a tripomastigote metacíclico, con capacidad de infectar a mamíferos incluyendo al humano (Figura 3).



Figura 3. Epimastigote de *T. cruzi* teñidos con Giemsa. Telmed.org, 2009.

Tripomastigote: Forma característica alargada y fusiforme conocida del parásito, con un tamaño promedio de 10-20  $\mu\text{m}$  de largo y 1-3  $\mu\text{m}$  de ancho, presenta una membrana ondulante que inicia en el kinetoplasto el cual se ubica en la región posterior del núcleo y termina en la región posterior en un flagelo, esta estructura es soportada por estructuras tubulares que le ayudan al parásito a darle forma y flexibilidad (Figura 4).

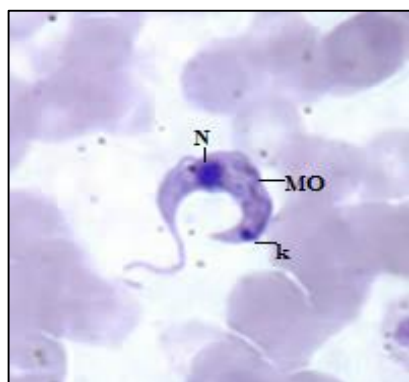


Figura 4. Tripomastigote de *T. cruzi*, N, núcleo; MO, membrana ondulante; k, kinetoplasto. Tomado y modificado de Telmed.org, 2009.

#### 4.6 Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida del parásito inicia cuando un insecto Triatomino ingiere tripomastigotes de la sangre de un hospedero mamífero infectado (humano). Estos posteriormente pasan hasta la porción media del intestino, donde se diferencian en la forma de epimastigote y se reproduce por fisión binaria. Después los parásitos son propulsados hacia la porción posterior del intestino donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Una vez que el insecto Triatomino infectado se alimenta de la sangre de un mamífero incluido el humano, defeca cerca del lugar de la picadura. La acción mecánica causada por el escozor de la picadura provoca la entrada de *T. cruzi* al torrente sanguíneo. No obstante, *T. cruzi*, también puede atravesar las mucosas por una lesión preexistente (Rassi *et al.*, 2012), Cuando *T. cruzi* alcanza



de migración de personas infectadas, hacia Canadá, Estados Unidos, países de Europa entre los que se incluyen Francia, Italia, Suecia, Suiza e Inglaterra, también se han reportado casos de la enfermedad en países como Japón y Australia y España. Este último, se considera el país europeo que reporta el mayor número de infectados (47,000-67,000) (Roca *et al.*, 2011).

En México, se reporta que aproximadamente 1.1 millones de individuos podrían estar infectados con *T. cruzi* (Hotez *et al.*, 2008). La Secretaría de salud registró 5,559 casos en el periodo de 2000 a 2012. La prevalencia básicamente fue en personas de entre 25 y 44 años de edad y los estados con mayor incidencia fueron Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco. En 2013 con 762 nuevos casos y 729 en 2014, las defunciones registradas fueron 371 la mayoría en los estados de Oaxaca (54.7%) y Guerrero (15.4%) (Salazar-Schettino *et al.*, 2016). En el Estado de México se documentó la presencia de anticuerpos-*T. cruzi* específico en 7.1 % de los humanos muestreados (n=293) (Estrada-Franco *et al.* 2006; Barbabosa-Pliego *et al.* 2009), a pesar de que fue considerado erradicado en el año de 1992 (Velazco-Castrejón *et al.*, 1992).

#### **4.4 Carga económica de la enfermedad**

A pesar de ser una enfermedad olvidada, la enfermedad de Chagas es una de las enfermedades más costosas, ya que afecta principalmente a personas jóvenes productivas por las manifestaciones clínicas digestivas y cardíacas que se presentan, además de requerir tratamientos prolongados y cirugías que involucran la inserción de marcapaso, desfibriladores cardíacos y trasplantes de corazón, lo cual incrementa el costo del tratamiento y como resultado pérdida económica considerable (Abuhab *et al.*, 2013). Se estima que anualmente la enfermedad tan solo para Estados Unidos y Canadá tiene un costo de 7.19 billones de dólares al año y ambos países representan un 10 % del gasto total a nivel mundial (Lee *et al.*, 2013).

#### **4.5 Transmisión**

La infección con *T. cruzi* se transmite a humanos principalmente por la mordedura de insectos hematófagos, los cuales fungen como vectores del parásito infectante. Pertenecen a la familia Reduviidae, orden Hemiptera (chinchas), Subfamilia Triatominae. Algunas especies se distribuyen únicamente en regiones selváticas, los cuales se denominan con el mismo nombre (especies selváticas), otros debido a la actividad humana e invasión de su nicho ecológico, se han adaptado a los hogares o a las periferias, por lo que se denominan domésticos y peridomésticos respectivamente.

Popularmente se les ha nombrado de distintas maneras, tales como: *chinche*, *chinche besucona*, *chipo*, *pito*, *bananom*, *chirimacha*, *chichâ*, *chupão*, *chupança*, *bicudo*, *fincão*, *protocó* y *vinchuca* (Carlomagno *et al.*, 1989). Entre las especies de importancia epidemiológico se encuentran: *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay, Perú y Chile; *Rhodnius prolixus* en Colombia, Venezuela y algunos países de Centroamérica; *Triatoma dimidiata* en Ecuador, México, América Central, *Rhodnius pallescens* en Panamá (OPS, 2002) y *T. rubida* en México (Martínez-Ibarra *et al.* 2012).

Por su parte México alberga una de las poblaciones de triatóminos más diversa, documentadas con 39 especies, De estas, al menos 21 de ellas se consideran vectores potenciales para *T. cruzi* y de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Chagas (Tabla 1) (Figura 6).

Tabla 1. Especies de Triatominos de importancia en México

<i>Triatoma barberi</i>	<i>T. picturata</i> ( <i>Meccus picturatus</i> )
<i>T. dimidiata</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>
<i>T. pallidipennis</i> ( <i>Meccus pallidipennis</i> )	<i>Dipetalogaster maxima</i>
<i>T. longipennis</i> ( <i>Meccus longipennis</i> )	<i>Panstrongylus spp.</i>
<i>T. infestans</i>	<i>T. gearslaeckeri</i>
<i>T. mazzotti</i> ( <i>Meccus mazzotti</i> )	<i>T. mexicana</i>



Figura 6. Especies de Triatominos de importancia en México, vectores de *T. cruzi*, Tomado de (Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

Otras formas de transmisión conocidas son: transfusional, ocurre principalmente en lugares endémicos por falta en el control de tamizaje a partir de donantes infectados. Este tipo de

transmisión se ha acentuado en Europa por la migración de personas infectadas provenientes de varios países endémicos (Fumadó *et al.*, 2014).

Otra forma de transmisión es la congénita (vertical o connatal), ocurre cuando *T. cruzi* atraviesa la placenta de una madre seropositiva y logra infectar al embrión o al feto. Por otro lado, la infección también puede darse durante el parto, debido al contacto sanguíneo con las mucosas del recién nacido. Se estima que en Latinoamérica existen unos 2 millones de mujeres en edad fértil, susceptibles de transmitir el parásito al feto. Así mismo, se estiman, 15,000 neonatos infectados en Latinoamérica y 2,000 en Norteamérica cada año.

La transmisión oral se da por ingestión de líquidos o alimentos contaminados con *T. cruzi* a partir de heces del vector (Camandaroba *et al.*, 2002). Por último, otra forma de transmisión es por accidentes de laboratorio. Este tipo de ocurrencia es rara y se debe a la manipulación de parásitos vivos (Rassi *et al.*, 2012).

## **4.7 Fases de la enfermedad de Chagas**

### **4.7.1 Fase Aguda**

Durante esta fase de la enfermedad, los signos y síntomas que preceden por la entrada del parásito al huésped se deben al desarrollo de una condición inflamatoria en el lugar de inoculación o en su caso sistémica. En muchos casos ocurre edematización del párpado (signo de Romana), el cual se acompaña de linfadenopatía, fiebre baja, hepatomegalia, esplenomegalia, diarrea, espasmos musculares, disfunción respiratoria, coma, coloración azulada de las mucosas, dolores musculares y articulares. Aunque 70-95 % de los casos pueden ser asintomáticos (Kowalska *et al.*, 2011). El cuadro clínico suele aparecer de 4 a 10 días post-inoculación mientras que el periodo de incubación puede prolongarse varios meses. Posterior a esta fase, ocurre un periodo de reactivación que conlleva a la fase aguda de la enfermedad de Chagas, la cual se caracteriza por una infección activa, inflamación y daño al miocardio (Andrade, 1983). En este caso la miocarditis crónica y la subsecuente cardiopatía, puede aparecer varios años después (Andrade, 1983), En este caso la miocarditis crónica y la subsecuente cardiopatía, puede aparecer varios años después de la infección (Rassi *et al.*, 2000). Aproximadamente en 1% de los casos, si los parásitos atacan violentamente los tejidos cardíacos o del sistema nervioso central, la infección puede causar muerte súbita del hospedero. Esta condición ha sido observado especialmente en niños menores de 1 año, cuya causa se atribuye a miocarditis aguda, efusión pericárdica y/o meningoencefalitis (Prata, 2001).

#### 4.7.2 Fase crónica

Cerca del 40% de los individuos infectados, al entrar en la fase crónica desarrollan alteraciones cardiacas y mientras que cerca del 10% desarrollará alteraciones digestivas y/o neurológicas que resultan en considerable morbilidad y mortalidad a los 10 o 35 años posteriores (OMS, 2017). Es importante destacar que el daño causado por el parásito es irreversible, dejando consecuencias que a menudo imposibilitan a los pacientes a realizar sus actividades diarias, y muchas personas mueren en edad productiva (Silveira y Dias, 2011; Silveira, 2011). En el desarrollo de cardiomiopatía dilatada, se asocian manifestaciones importantes como: hipertrofia ventricular, insuficiencia cardiaca progresiva, complicaciones trombo-embolicas y muerte repentina (Ribeiro *et al.*, 2012). Cuando los tejidos del tracto digestivo están afectados por *T. cruzi*, se produce una dilatación patológica de la luz del colon y un esófago agrandado, condiciones denominadas como megacolon y megaesófago respectivamente, con lesión grave del sistema nervioso entérico (Rassi *et al.*, 2010).

#### 4.8 Cardiomiopatía chagásica

La enfermedad de Chagas es la infección parasítica que afecta de forma más severa al corazón en forma crónica (Rassi *et al.*, 2012). El daño al miocardio por causa de la enfermedad se clasifica en diferentes etapas. La primera nombrada A en donde los electrocardiogramas (ECG) son normales sin ninguna alteración; la segunda se conoce como B, en esta etapa se presentan algunas anomalías en los ECG e indican progresión de la enfermedad. Tanto en A como B puede haber muerte repentina. En las etapas C y D, aparecen síntomas de falla cardiaca (Andrade *et al.*, 2010), tempranamente hay fallas en el sistema de conducción del corazón y frecuentemente bloqueo de rama derecha o bloqueo fascicular anterior izquierdo (Ribeiro *et al.*, 2013), ventrículo izquierdo segmentario (Barros *et al.*, 2001) y disfunción diastólica (García-Alvarez *et al.*, 2010), con miocarditis en todas las cámaras, persistencia del parásito en tejido cardiaco (Benvenuti *et al.*, 2008), lesión miocárdica inmuno-mediada y trastornos microvasculares. Dichas lesiones van siendo reemplazadas por fibrosis miocárdica intersticial (Ferrans *et al.*, 1988), adelgazamiento de las paredes ventriculares, aneurisma apical, destrucción generalizada de células miocárdicas, edema, infiltración linfocítica del miocardio y cicatrización de la conducción (Figura 7).

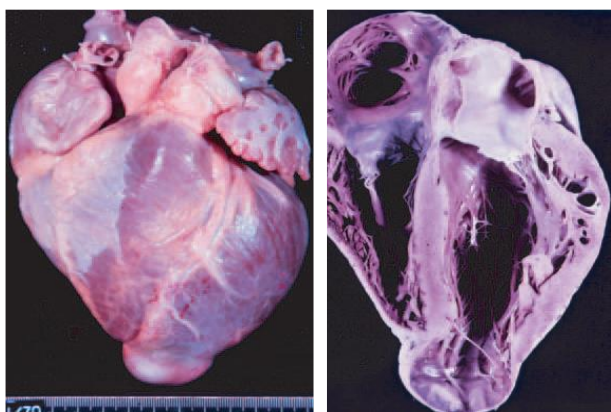


Figura 7. A, Vista macroscópica externa de corazón chagásico con abultamiento apical típico. B, Sección frontal con aneurisma apical y agrandamiento leve de los cuatro Cámaras cardíacas. Tomado de (Marin-Neto *et al.*, 2007).

De un 60 a 70 % de los infectados en fase crónica estarán en la fase indeterminada, la cual no tiene síntomas clínicos y se caracteriza por positividad a anticuerpos contra *T. cruzi* en suero, con exámenes radiológicos normales de pecho, esófago y colon. La cardiomiopatía dilatada es la manifestación más severa de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Afecta de un 30 a 40 % de los pacientes chagásicos crónicos caracterizado por disfunción ventricular, falla cardíaca, arritmias, tromboembolismo y muerte repentina (Ribeiro *et al.*, 2012) y forma digestiva, como megaesófago y megacolon de 10 a 30 años de haberse producido la infección, en esta etapa puede surgir la reactivación de la enfermedad de Chagas debido a que los pacientes están inmunológicamente comprometidos (Rassi *et al.*, 2010).

Se sugiere por métodos convencionales y moleculares que la persistencia del parásito y la inflamación crónica, son responsables del daño al miocardio en infección crónica con *T. cruzi* en lugar de mecanismos autoinmunes, y las anomalías en la microvasculatura coronaria y denervación cardíaca contribuyen a la patogénesis de la lesión crónica (Marin-Neto *et al.*, 2007).

#### 4.9 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la enfermedad en fase aguda se basa principalmente en la detección de la motilidad del tripomastigote por examinación microscópica de sangre no coagulada o por gota fresca, también se puede realizar una tinción con Giemsa y frotis por gota gruesa. El microhematocrito es una buena opción por su alta sensibilidad en la detección de infección congénita (Rassi *et al.* 2012), el uso de prueba serológica no es adecuado en fase aguda, aunque la detección de inmunoglobulinas M (IgM) anti-*T. cruzi* puede ser usado, sin embargo, no está ampliamente disponible ni estandarizada. En fase crónica, la mejor opción es el análisis serológico de inmunoglobulinas de tipo G (IgG) específicas que unen a



antígenos de *T. cruzi*, debido a que la parasitemia es baja e intermitente en esta fase (Figura 8). La prueba de ELISA, inmunofluorescencia y hemaglutinación indirecta son los métodos más comúnmente usados. La PCR no es de mucha ayuda en el diagnóstico rutinario debido a la falta de estandarización de la técnica y a los resultados variables entre laboratorios y países, sin embargo debido a su alta sensibilidad podría ser empleado como una herramienta complementaria a las metodologías actualmente disponibles (Rassi et al. 2010; Rassi et al. 2012).

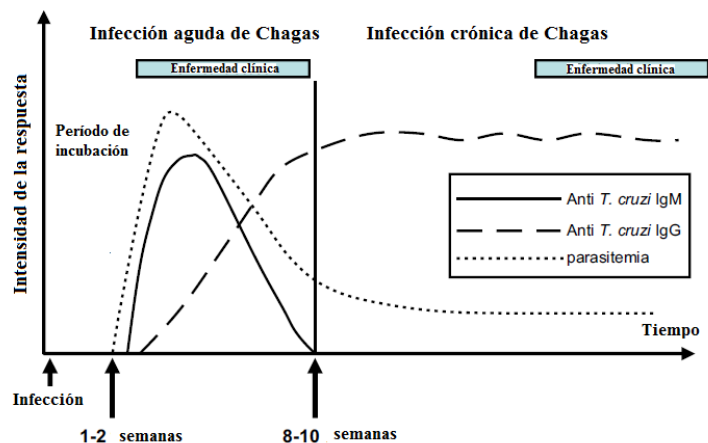


Figura 8. Etapas y tiempo de la enfermedad de Chagas, tomado y modificado de Rassi *et al.*, 2012.

#### 4.10 Inmunidad durante la enfermedad de Chagas

La infección con *T. cruzi*, es detectado por moléculas y células del sistema inmune innato y adaptativo los cuales interactúan con proteínas y ADN del parásito y participan en la resistencia a la infección (Tarleton, 2007). Aunque la inmunidad contra la infección de *T. cruzi*, dependa críticamente de las linfocitos T, se ha reportado que las células NK son activas tempranamente durante la infección con tripomastigotes de *T. cruzi*, para la producción de citosinas que activan macrófagos, inducen muerte a los parásitos e inducen una respuesta celular T de tipo Th1 (Cazorla *et al.*, 2009).

#### 4.11 Tratamiento

El único tratamiento para la enfermedad de Chagas, autorizado por la OMS se basa en 2 tipos de medicamentos Nifurtimox (NFMX) y Benznidazol (BZN) (Nitrofuranos y nitroimidazoles), estos fármacos muestran gran variación en la susceptibilidad del aislado del



parásito. La eficacia del tratamiento antiparasitario es inversamente proporcional a la cronicidad de la enfermedad, de disponibilidad limitada y de distribución inestable, aunado a que su administración está asociado con efectos colaterales serios (Kowalska *et al.*, 2011) y de administración prolongada, además de que se ha informado resistencia de los parásitos a la quimioterapia empleada en varias regiones de América Latina (Camandaroba *et al.*, 2003), pese a lo anterior, ambos fármacos son los únicos de probada eficacia con actividad significativa durante la fase aguda de la enfermedad, con cura parasitológica en cerca del 80 % de los pacientes por eliminación de la parasitemia (Rassi *et al.* 2000). Usualmente se recomienda en niños dosis de 5 a 10 mg/kg/día de BZN por 60 días o 15 mg/kg/día de NFMX por 60 a 90 días, en el caso de los adultos 5 mg/kg de BZN y 8-10 mg/kg/día de NFMX por 60 días.

Los efectos adversos varían entre fármacos, en el caso del BZN es muy generalizado algunas veces dermatitis alérgica localizada de intensidad leve a moderada (20 -30 %), neuropatía sensitiva periférica dosis dependiente (5-10 %), leucopenia y supresión de medula ósea, náuseas, vómitos, anorexia, pérdida de peso, insomnio, pérdida de gusto y onicólisis. Para el NFMX se ha reportado síntomas gastrointestinales (50 %), que incluyen, anorexia, pérdida de peso, vómito y diarrea, los efectos adversos mencionados para ambos fármacos son menores en niños (Rassi *et al.*, 2009).

Adicionalmente se están desarrollando nuevos medicamentos antiparasitarios por ejemplo el posaconazol, tioridazina y alopurinol, que han demostrado ser potenciales en la cura de la infección por *T. cruzi* en modelo murino, sin embargo, los fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas no son interesantes para las industrias farmacéuticas y solo 2 fármacos han entrado a fase clínica II (posaconazol y ravuconazol) (Leslie, 2011) y ninguna vacuna está actualmente disponible.

#### **4.12 Vacunas**

Desde el desarrollo de la primer vacuna por Edward Jenner en 1796 contra la viruela humana, la temática de las vacunas ha evolucionado drásticamente, en un principio se usaban vacunas atenuadas a partir del patógeno vivo y atenuado por subsecuentes infecciones en cultivo celular o por métodos físicos y químicos, estas vacunas son capaces de inducir respuesta humoral (Th1) y celular (Th2) (Shroff *et al.*, 1999) tal como se demostró para vacunas contra la polio, viruela, tuberculosis, rubeola y varicela. Sin embargo, este tipo de vacunas presentaba el riesgo de reversibilidad como en el caso de algunas cepas de VIH (Giese, 1998). Posteriormente se desarrollaron vacunas que empleaban el patógeno muerto mediante métodos físicos y químicos como en el caso de vacunas contra el cólera, tifoidea, tétanos y

difteria, sin riesgo de desencadenar la enfermedad mostrando una respuesta Th1 principalmente, menos intensa y duradera, pero necesitaban refuerzo y requerían de adyuvantes para potencializar la respuesta inmune. Posteriormente se desarrollaron vacunas que emplearon subunidades antigénicas, tales como proteínas del patógeno, ribosomas, y lipopolisacáridos. Esta metodología fue desarrollada para vacunas contra tosferina, hepatitis B, enfermedad neumocócica e influenza B. Todos estos tipos de vacunas son los denominados vacunas clásicas (Lopez *et al.*, 2004).

Por tanto, podemos mencionar que una vacuna, es una sustancia producida a base del patógeno, vivo o atenuado, o fracciones proteicas del mismo, capaz de inducir una respuesta inmune protectora, específica y duradera contra infecciones futuras contra el agente infeccioso y que sea inocuo.

#### **4.13 Mecanismo de acción general de las vacunas clásicas**

El objetivo de las vacunas es simular el proceso de primer contacto con el patógeno e inducir una respuesta inmune potente adquirida y específica vía anticuerpos y células citotóxicas contra el agente infeccioso en caso de tener contacto con él en un futuro (), a partir de determinantes antigénicos y llevar a cabo la inmunización o sensibilización para generar memoria inmune y aventajar el tiempo natural de la respuesta inmune adquirida, posterior a la inoculación y dependiendo de la vía de la misma, las células presentadoras de antígenos (CPA) tiene contacto con el antígeno y estas empiezan a secretar citosinas y quimosinas para aumentar la respuesta inmune, posteriormente estas células viajan por el torrente sanguíneo hasta la médula ósea y a los ganglios linfáticos donde tienen contacto con linfocitos B de memoria y linfocitos T, los cuales serán activados y los primeros sintetizarán anticuerpos que reconocerán y neutralizarán los antígenos de la vacuna y también inducirán la proliferación de las células de memoria (Revisado en Lopez *et al.*, 2004).

#### **4.14 Vacunas de tercera generación**

Con el avance de la biología molecular, celular e inmunología se desarrollaron vacunas denominadas de nueva generación o de ADN (Mota-Sánchez, 2009), los cuales emplean técnicas de la biotecnología e ingeniería genética, para modificar genéticamente microorganismos patógenos a partir de cepas virulentas y hacerlos no patógenos, péptidos recombinantes sintéticos a partir de una secuencia antigénica y producidas químicamente y vacunas genéticas. Este último a partir de vectores bacterianos o víricos (Lopez *et al.*, 2004) y vacunas de ADN desnudo, una de sus características es que no se administra la molécula

inmunizante sino la secuencia genética que lo codifica, desencadenando una respuesta humoral leve y celular y ofreciendo ventajas como seguridad (no incluye organismos vivos), se pueden modificar los antígenos codificados en los plásmidos, menor costo por producción a gran escala, estabilidad y vida media mayor (Shedlock & Weiner, 2000).

El sitio de inoculación, así como en las vacunas clásicas, es un punto determinante para la inducción de la respuesta inmune exitosa, pues se sabe que solo del 1 al 10% del ADN inoculado como vacuna se procesa adecuadamente y expresa la proteína (Reyes-Sandoval & Hildegun 2001; Huygen, 2005), siendo musculo, piel y mucosas las rutas más comunes empleadas para este tipo de vacunas, pudiendo aplicarse mediante inyección directa, por pistola génica, este último con un porcentaje alto de éxito, debido a que penetra la piel hasta la capa subdérmica permitiendo la transfección directa de las células blanco (Shedlock y Weiner 2000; Huygen 2005) como las células musculo-esqueléticas y células presentadoras de antígenos que, si bien, estas últimas son ideales para la activación de células inmunitarias mediante presentación de antígenos, estas células lo pueden tomar de otras células mediante presentación cruzada (Srivastava y Liu, 2003).

#### **4.15 Electroporación**

La electroporación es un método físico que permite la apertura de poros en la membrana, bajo la influencia de un campo eléctrico las membranas celulares acumulan un potencial transmembrana hasta que se supera la resistencia dieléctrica de la membrana y se produce un evento de permeación (Drabick *et al.*, 2001). Es una herramienta que se ha empleado para la aplicación de vacunas génicas como nuevo método de entrega vacunal en la región dérmica, diversos estudios apuntan a que es una buena estrategia para inducir una buena respuesta inmunológica posterior a la aplicación debido a que es una región donde se pueden encontrar una buena cantidad de células presentadoras de antígenos, además de que es un método eficiente de entrega de la vacuna. Varios trabajos recientes reportan que el uso de la electroporación como método para liberar una vacuna, potencializa el efecto del mismo, estimula una respuesta inmune durable (Kulkarni *et al.*, 2014) y facilita a las células presentadoras de antígenos (CPA), células de Langerhans (CL) y células dendríticas (CD) su captación, además de ser poco invasiva y bien tolerada (Lamolinara *et al.*, 2015) se ha reportado que induce respuesta Th1 y Th2.

#### 4.16 Mecanismo de acción de vacunas génicas

La inducción de la respuesta inmunitaria inicia cuando el ADN plasmídico penetra la célula y se trasloca al núcleo, donde se inicia la transcripción, los transcritos, se mueven al citoplasma y se traducen. Las proteínas recién sintetizadas entran al proteosoma y se degradan en fragmentos de 8-10 aminoácidos, posteriormente se transportan al retículo endoplásmico y de ahí se vincula con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC-1), los péptidos afines entran a la vía secretora y llegan a la superficie de la membrana celular donde se acoplan con el receptor TcR de los linfocitos T citotóxicos CD8+. Las proteínas exógenas fagocitadas entran vía endosóma y se degradan en fragmentos de 25 aminoácidos y estos se vinculan con el MHC-2, posteriormente tras la unión del complejo MHC-péptido con la TCR de los linfocitos T, se da la señal 1, la cual es insuficiente para una buena respuesta inmunológica (Srivastava & Liu 2003), por lo que es necesaria una segunda señal para activar linfocitos CD4+ y CD8+, previamente la señal 0 se inicia cuando las CPA se activan por ciertas citosinas pro-inflamatorias dando como resultado sobreexpresión de citosinas pro-inflamatorias y favoreciendo la presentación del antígeno inicial por las CPA en la señal 1 en su mayoría células dendríticas (CD) (Huygen 2005). Estas células migran a los ganglios linfáticos donde activan a las células T y B inmaduras, una vez activadas, los linfocitos T, dejan los ganglios, migran por gradiente de quimosinas e inician su etapa efectora y secretan sustancias tóxicas como las perforinas producidas por las células CD8+ o inflamatorias y las interleucinas secretadas por las células CD4+ (Figura 9) (Donnelly *et al.*, 2005; Huygen, 2005).

Los linfocitos B se activan, cuando su receptor BcR tiene contacto con los antígenos, producidos por la expresión del plásmido transfectado, los linfocitos B activados cambian de isotipo al hipermutar la región variable de las inmunoglobulinas, generando clonas cuya afinidad por un antígeno en específico es mayor, posteriormente los linfocitos B se van a diferenciar a células de memoria o plasmáticas, para continuar con la producción de anticuerpos (Donnelly *et al.*, 2005; Huygen, 2005).

A pesar de que las vacunas génicas han demostrado ser efectivas en modelo murino, no son tanto cuando se prueban en otros mamíferos, donde la respuesta es débil (Kutzler & Weiner 2008), Para mejorar la respuesta, al igual que en las vacunas clásicas, se emplean adyuvantes que potencian el efecto de las vacunas. En este caso los adyuvantes genéticos como las interleucinas (IL) de tipo Th1 (IL-12, INF- $\gamma$ , IL-15 e IL-18) y Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13), así como del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Una nueva propuesta vacunal incluye el uso de proteínas recombinantes usadas como

refuerzo de vacunas génicas para aumentar la respuesta inmunológica humoral y celular (Donnelly *et al.*, 2005; Huygen, 2005; Kutzler & Weiner 2008).

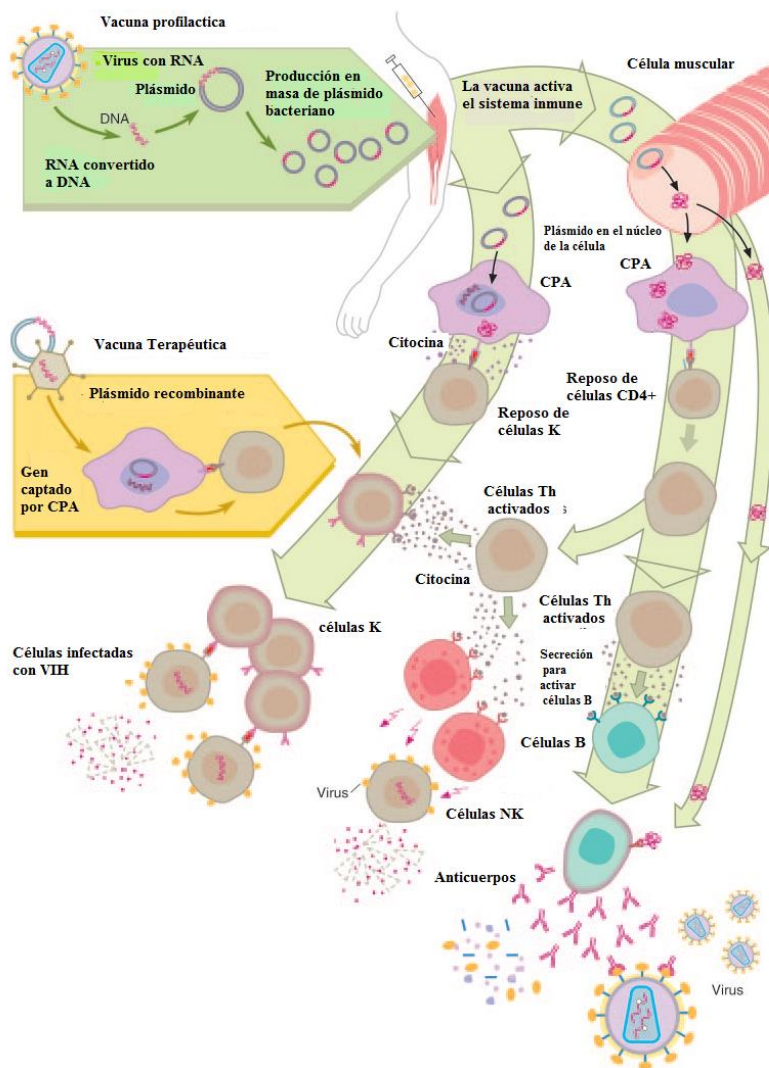


Figura 9. Mecanismo de Acción de una vacuna de ADN. Tomado y modificado de (Donnelly *et al.*, 2005).

#### 4.17 Vacunas profilácticas y terapéuticas para la enfermedad de Chagas

El uso de vacunas génicas como agentes profilácticos y terapéuticos se presenta como una alternativa prometedora, para reducir el riesgo de infección de la enfermedad de Chagas a un costo relativamente bajo y con posibilidades de alcanzar a la población en riesgo de las zonas endémicas y marginadas (Plotkin, 2008). Distintos trabajos con un sin número de propuestas

prometedoras han mostrado control de la carga parasitaria y aumento de la sobrevivencia de los ratones y otros modelos biológicos infectados con *T. cruzi* (Tabla 2). A pesar de todos los esfuerzos realizados hasta ahora, no hay vacunas disponibles (Urbina & Docampo, 2003), por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para resolver los problemas actuales observados en la experimentación con las vacunas de nueva generación.

Varios grupos de investigación en el mundo han estudiado distintas estrategias en el desarrollo de vacunas de ADN contra *T. cruzi* (Tabla 2), una de estas es la referente a genes que codifican antígenos de superficie del parásito, perteneciente a la familia de las transalidasas referidas como ASP-1, ASP-2 y TSA-1, ya que al inmunizar ratones C57BL/6 y desafiarlos con *T. cruzi*, mostraron protección contra la infección en un 30 a 60 %, pero con poca producción de anticuerpos y actividad de linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, cuando se co-administraron con genes IL-12 y GM-CSF como adyuvantes, la resistencia, actividad citotóxica y producción de anticuerpos aumentaron, incluidos la sobrevivencia, la cual fue del 80%, disminuyendo la parasitemia, inflamación y daño en tejido cardíaco (Garg & Tarleton 2002).

Por otra parte, una secuencia genética conocida como Clon-9 relacionada a ASP-2 ha demostrado que ratones BALB/c inmunizados con esta vacuna y desafiados con cepa Y de *T. cruzi*, induce la producción de anticuerpos específicos y secreción de IFN- $\gamma$  por parte de linfocitos CD4+ aumentando la sobrevivencia de los ratones (Boscardin *et al.*, 2003). Se ha evaluado también la participación de las células T NK contra infección inducida por *T. cruzi* (cepa Tulahuén), para ello ratones deficientes de CD1-d deficientes infectados, mostraron que la ausencia de las células NK no incrementa la susceptibilidad a la infección y la parasitemia, la sobrevivencia reportada fue muy parecida a la de ratones normales. Posteriormente se determinó que las células NK participaban en la inmunidad inducida por la inmunización con la secuencia del gen pTSSA perteneciente a la familia de transalidasas (Miyahira *et al.*, 2003). Además, la inducción y activación de estas células pueden tener efectos adversos, sobre la inmunidad protectora inducida por la vacunación con ADN, posiblemente porque las células NK tienen receptores tipo Toll capaces de reconocer las células infectadas con parásitos y probablemente las células transfectadas son suprimidas y por lo tanto, la activación de la respuesta inmune disminuye (Arce-Fonseca *et al.*, 2015).

Otros antígenos de la familia de las transalidasas involucran a los genes TcSP y TcSSP4 y proteínas recombinantes nombradas de la misma manera, los cuales mostraron para el primer antígeno, una respuesta mezclada de tipo Th1/Th2 y para el segundo la producción de IFN- $\gamma$ , el cual fue detectado tempranamente posterior a la inmunización, sugiriendo una respuesta tipo Th1. Al infectar a los ratones BALB/c con *T. cruzi* cepa H8, solo los vacunados tuvieron

disminución en el pico de parasitemia y aumento en la sobrevivencia de los ratones (Arce-Fonseca *et al.*, 2011).

Se han evaluado por otra parte proteínas antigénicas tal como la cruzipaina, una enzima secretada por el parásito y considerada un factor de virulencia, la cual demostró que la inmunización con esta molécula estimuló una respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CTL) capaz de reconocer y lisar células infectadas con *T. cruzi* (Scnapp *et al.*, 2002).

Otros experimentos han probado polisacáridos de la pared bacteriana para modular el sistema inmune inducido por la respuesta de un plásmido denominado P154/13 también de las transialidasas demostrando disminución de la parasitemia, y aumentó de la respuesta Th1 específica, concluyendo que el uso de adyuvantes puede mejorar la respuesta y protección de la vacuna de ADN (Maussalem *et al.* 2006).

Tabla 2. Antígenos recombinantes empleado como estrategia vacunal contra infección experimental de *T. cruzi*. Tomado de Arce-Fonseca *et al.*, 2012.

Vector	Modelo	Respuesta inmune	% sobrevivencia	Antígeno recombinante	Referencia
pCMVI.UBF3/2	C57BL/6	Th1 -1	30-60	ASP-1, ASP-2, TSA	(Garg & Tarleton, 2002)
pcDNA3	BALB/c	Th1	100	Clon 9 (ASP-2)	(Boscardin <i>et al.</i> , 2003)
pCMV	BALB/c	ND	25-100	TSSA	(Miyahira <i>et al.</i> , 2003)
pcDNA3	BALB/c	Th1	ND	Dominio catalítico de una transialidasa	(Mussalem <i>et al.</i> , 2006)
pcDNA3.1	C57BL/6	Th1	ND	TcG1, TcG2, TcG4	(Bhatia & Garg 2008)
pBK-CMV	BALB/c	Th1/Th2	92	TcSP	(Salgado-Jiménez <i>et al.</i> 2013)
pBK-CMV	BALB/c	Th1	75	TcSSP4	(Arce-Fonseca <i>et al.</i> 2011)
pBK-CMV	Perros Beagle	Th1	100	TcSP, TcSSP4	(Arce-Fonseca <i>et al.</i> 2013)
pSCREEN	BALB/c	Th1	ND	Cruzipaina	(Scnapp <i>et al.</i> , 2002)
pcDNA3	C3H/HeN	Th1	100	Cruzipaina	(Cazorla <i>et al.</i> 2008)
pCMV	C57BL/6J	Th1	80	LYT1	(Frailish y Tarleton, 2003)
Virus Vaccinia	BALB/c	Th1	25-50	Epitope ANYNFTLV	(Miyahira <i>et al.</i> 2005)
pcDNA3.1	BALB/c	ND	70	Tc13	(García <i>et al.</i> , 2006)
pCMV4	BALB/c y C57BL/6 transgénicos	Th1	75	PFR2 y PFR3	(Morell <i>et al.</i> , 2006)
pcDNA3.1	Ratas Holtzman	Th1/Th2	ND	Beta quimiocina CCL4/MIP-1	(Roffe <i>et al.</i> , 2006)

ND: No determinado

Por otro lado, mediante el uso de la base de datos de secuencia de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) y programas bioinformáticos, se pasó directamente de la información secuencial a la identificación antigénica objetivo y el diseño de vacunas (Bhatia *et al.*, 2004), para ello se identificaron genes de anclaje de proteínas a través de enlaces GPI o proteínas de superficie secretadas por *T. cruzi* denominadas como TcG1-TcG8, los cuales son considerados buenos candidatos para el desarrollo de vacunas. A partir de la caracterización molecular y

bioquímica se identificó a tres candidatos vacunales TcG1, TcG2, TcG4 que son secuencias conservadas en el genoma de las cepas de *T. cruzi* de importancia clínica. Estos se expresan en diferentes etapas de desarrollo (tripomastigotes y amastigotes) del parásito y despiertan inmunidad en varios hospederos. Los candidatos seleccionados fueron reconocidos por anticuerpos líticos y células T CD8<sup>+</sup> en ratones infectados (Bhatia & Garg, 2008).

Los antígenos TcG1, TcG2, TcG4 clonados en plásmidos de expresión y los adyuvantes genéticos IL-12 y GM-CSF, ya fueron probados en modelo murino, donde se observó aumento de la supervivencia y disminución de la carga parasitaria en ratones inmunizados, con una respuesta inmune asociada a un perfil de isotipos dominante IgG2b/IgG1, donde los niveles de IFN- $\gamma$ , de factor de necrosis tumoral (TNF), así como de infiltrado inflamatorio en corazón fueron disminuidos (Gupta & Garg, 2010; Bhatia & Garg, 2008).

Nuestro grupo de investigación ha propuesto varias estrategias vacunales experimentales con antígenos TcG2 y TcG4 y adyuvantes genéticos en perros infectados con *T. cruzi*. La vacuna TcVac1 (TcG1, TcG2, TcG4) y citosinas como: IL-12 y GM-CSF, elicitaron una respuesta específica contra el antígeno y el parásito con un perfil IgG2>IgG1, mostrando control de la parasitemia, sin embargo no controló la carga parasitaria y se presentó moderado daño cardíaco, comparado con los perros no vacunados (Aparicio-Burgos *et al.*, 2011). Un estudio similar se realizó un año antes con la vacuna TcVac2 (TcG1, TcG2, TcG4, IL-12 y GM-CSF) más refuerzo de proteína recombinante, con los mismos antígenos y citosinas en ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi*, (Silvio X10/4), se reportó que en este estudio, la vacuna indujo una fuerte respuesta de anticuerpos antígeno específico (IgG2b>IgG1) y un nivel moderado de proliferación linfocitaria en los ratones y elicito una respuesta substancial de células T CD8<sup>+</sup> asociadas con citosinas tipo 1 IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , controlando la carga parasitaria en fase aguda, en fase crónica la respuesta mostro persistencia de anticuerpos (Gupta y Garg, 2010).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha adoptado una nueva estrategia de administración y entrega de la vacuna TcVac1M a partir de la técnica de electroporación aplicada intradérmicamente, los resultados demuestran que el tipo de administración vacunal induce una buena respuesta inmune contra el parásito, por altos títulos de anticuerpos para grupos de ratones BALB/c vacunados, mostrando un cambio de perfil inmunitario de Th1 (IgG2b/IgG1>1) a Th2 (IgG2b / IgG1 <1) (Hegazi-Hassan, en proceso).

El uso terapéutico de las vacunas de ADN contra la enfermedad de Chagas podría mejorar la efectividad del tratamiento actual y así proporcionar un mejor pronóstico para el paciente y estas vacunas para uso terapéutico no han demostrado efectos tóxicos.



Las vacunas de ADN profiláctico o terapéutico han demostrado que reducen la duración y los signos de la fase aguda, mientras que en la fase crónica se ha disminuido la gravedad del daño cardíaco y por tanto prolonga la vida de los pacientes (Arce-Fonseca *et al.*, 2015). Sin embargo, pese a todo lo desarrollado, los métodos clásicos y de nueva generación en el desarrollo de vacunas, están lejos de estimular una adecuada respuesta inmune protectora efectiva.

#### **4.18 Estrés oxidativo en la enfermedad de Chagas**

Otro factor detectado como respuesta a la infección y desarrollo de la enfermedad de Chagas, es el estrés oxidativo, generado por la alta producción de radicales libres, que son moléculas químicas que en su estructura atómica presentan un electrón impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad y reactividad (Chauhan & Chauhan, 2006), y que fueron descubiertos en 1900 por Moses Goember (Henderson, 2000). Para alcanzar su estabilidad electroquímica necesitan sustraer el electrón faltante de un átomo o molécula más cercana, pero si no es controlado, pueden desencadenar una reacción en cadena.

Los radicales libres son de vida corta (milisegundos) y se producen por diferentes mecanismos metabólicos normales entre los que se encuentra la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones y las reacciones de oxidación, dando como productos Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), es irónico pensar que el oxígeno un elemento indispensable para la vida, bajo ciertas condiciones tenga efectos deletéreos y nocivos para el cuerpo humano (revisado en Lobo *et al.*, 2010), existen otras moléculas pertenecientes al grupo de los radicales libres, conocidos como: especies reactivas de nitrógeno (ERN), especies reactivas de cloro (ERC), las principales especies reactivas del oxígeno se muestran a continuación (Tabla 3):

Tabla 3. Principales radicales libres presentes en estrés oxidativo

Radicales libres	Descripción
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , anión superóxido	Estado de reducción de un electrón de O <sub>2</sub> , formado por reacciones de auto-oxidación y por la cadena de transporte de electrones, no es reactivo, pero puede liberar Fe <sub>2+</sub> de las proteínas de hierro-azufre y ferritina. Dismuta para formar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> espontáneamente o por catálisis enzimática y es un precursor para la formación de OH catalizado por metal.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Peróxido de hidrogeno	Estado de reducción de dos electrones, formado por dismutación de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ó por reducción directa de O <sub>2</sub> . Soluble en lípidos y por lo tanto capaz de difundir a través de las membranas.
OH, Radical Hidroxilo	Estado de reducción de tres electrones, formado por reacción de Fenton y descomposición de peroxinitrito, extremadamente reactiva.
ROOH, Hidroperóxido orgánico	Formado por reacciones de radicales con componentes celulares tales como lípidos y nucleótidos.
RO, radicales peroxi, alcoxi y ROO,	Radicales orgánicos centrados en el oxígeno. Las formas lipídicas participan en las reacciones de peroxidación lipídica. Producido en presencia de oxígeno por adición de radicales a enlaces dobles o por extracción de hidrógeno.
HOCl, ácido hipocloroso	Formado a partir de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la mieloperoxidasa. Lípidos solubles y altamente reactivos. Oxida proteínas, incluyendo grupos tiol, amino y metionina.
ONOO <sup>-</sup> , peroxinitrito	Formado de reacción entre O <sub>2</sub> <sup>-</sup> y NO. Lípidos solubles y similares en reactividad al ácido hipocloroso. La protonación forma el ácido peroxinitroso, que puede sufrir escisión homolítica para formar radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno.

Tomado y modificado de lobo *et al.*, 2010

Los radicales libres participan en eventos fisiológicos como la respuesta inmune, incluso, estas moléculas son utilizados en fagocitosis, metabolismo de ácidos grasos insaturados y reacción inflamatoria (Abd Ellah, 2010), favorece también la síntesis de colágeno, prostaglandinas, activa enzimas en la membrana celular, sistema citocromo p450 y disminuye la síntesis de catecolaminas (Liu *et al.*, 1999). Por otra parte se ha reportado que favorecen la quimiotaxis, generados de forma enzimática y no enzimática, reaccionan también con componentes orgánicos por factores como: la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes (rayos X, gamma), el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Finkel & Holbrook, 2000).

En condiciones normales, la producción de RL es estabilizado por la defensa de antioxidantes endógenos (Lightfoot *et al.*, 2006). Cuando el nivel de radicales libres, no puede ser controlado por los antioxidantes endógenos, se genera el estrés oxidativo (EO), el cual es un desbalance en la capacidad de los antioxidantes de controlar la producción excesiva de los radicales libres, estos niveles altos de EO puede dañar tejidos, oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Schallreuter *et al.*, 2007) y pueden contribuir a patogénesis de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, aterosclerosis, restenosis, falla cardíaca y complicaciones vasculares diabéticas (Griendling, 2004), artritis, lupus eritematoso, enfermedades isquémicas, enfisema, úlceras gástricas, hipertensión, preclamsia, Alzheimer, Parkinson y distrofia muscular (Stefanis *et al.*, 1997).

Reciente evidencia sugiere que el daño por estrés oxidativo sostenido está asociado con la evolución de la enfermedad de Chagas, en donde procesos patológicos crónicos e inflamación crónica, este último muy relacionado con el EO, y probablemente fenómenos que no se pueden separar (Hensley *et al.*, 2000) pueden permitir el desarrollo de alteraciones en el estatus antioxidativo, el imbalance redox, y estrés oxidativo y posiblemente participar en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica. Dado que muchos parásitos son aerobios, utilizan el oxígeno molecular como aceptor de electrones en oxidaciones productoras de energía, por tanto, el oxígeno molecular es la principal fuente en la generación de radicales libres.

Durante el curso de la infección por *T. cruzi*, las ROS pueden producirse como consecuencia de la destrucción tisular causada por secreciones tóxicas de parásitos, reacciones citotóxicas inmuno-mediadas y daño secundario a las mitocondrias, los cuales liberan producción baja pero constante de anión superóxido (Gupta *et al.*, 2009). En estudios experimentales, la infección por *T. cruzi* ha sugerido iniciar la formación de ROS a través de la estimulación de mediadores inflamatorios como, citoquinas y quimiocinas, que conducen a una explosión oxidativa de células fagocíticas.

#### **4.19 Antioxidantes**

El término antioxidante fue referido en un principio como moléculas químicas que prevenían el consumo de oxígeno y no fue hasta finales del siglo XIX y principios del siglo XX cuando se empleó para procesos industriales importantes como prevención de la corrosión de metales, vulcanización de bandas y polimerización de aceites (Mattill, 1947). Posteriormente se empleó como producto para prevenir la oxidación de ácidos grasos insaturados, para evitar la rancidez (German, 1999), pero no fue hasta el descubrimiento de las vitaminas A, C y E que revolucionaron el campo y su participación en organismos vivos (Knight, 1998).

Los antioxidantes son moléculas que estabilizan a un radical libre, al ceder el electrón que le falta y el cual lo hace inestable, y por tanto detiene, retarda o inhibe la oxidación y la producción de los mismos (Avello y Suwalsky, 2006; Valenzuela y Pérez, 2016). Estas moléculas están presentes a nivel celular de forma endógena y funcionan como un mecanismo propio de defensa contra los radicales libres, cosechando radicales, donando hidrógenos, donando electrones, descomponiendo peróxidos, inhibiendo enzimas, actúa como sinergista, o como agente quelador de metales (Frei *et al.*, 1988).

Se han propuesto dos mecanismos de acción para los antioxidantes; en el primer mecanismo, el antioxidante al donar un electrón es capaz de escindir la estructura del radical libre, el segundo mecanismo involucra la remoción de iniciadores de especies ROS y RNI por catálisis quelante de la cadena inicial. En sistemas celulares *in vivo*, los antioxidantes biológicos donan electrones, quelan iones metálicos y regulan la expresión de genes (revisado en Lobo *et al.*, 2010).

Los antioxidantes de manera clásica se han clasificado en dos tipos: enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 4).

Tabla 4. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Antioxidantes enzimáticos	Características
Superóxido dismutasa (SOD)	Catalizan la ruptura de O <sub>2</sub> · y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , en humanos tres formas están presentes SOD1 (contiene cobre y zinc) es un dímero localizado en el citoplasma, SOD2 se localiza principalmente en la mitocondria y SOD3 (contiene manganeso, cobre y zinc) es localizado extracelularmente.
Catalasa	Descompone H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a oxígeno y agua, está presente en todas las células y en mayor concentración en hígado.
Sistema glutatión Glutatión reductasa Glutatión peroxidasa Glutatión transferasa	Catalizan peróxido de hidrogeno a hidroperóxidos orgánicos, contienen 4 cofactores selenio y es abundante en hígado.
Antioxidantes no enzimáticos	
Vitamina C Ácido ascórbico	Se mantiene en su forma reducida por el glutatión, puede ser catalizado por la disulfuroisomerasa y la glutaredoxina, neutraliza el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
Glutatión	Péptido que contiene cisteína, funciona como antioxidante porque su grupo tiol puede ser reducido u oxidado, mantenido en su forma reducida por la Gpx,

	participa en proceso homeostático para mantener el estado redox.
Melatonina <i>N-acetil-5-metoxitriptamina</i>	Hormona con propiedades antioxidantes, es un antioxidante terminal porque una vez oxidado no se reduce a su forma anterior.
Vitamina E <i>Tocoferol</i>	Antioxidante liposoluble, reacciona con radicales lipídicos, produciendo radicales $\alpha$ -toxiferoles y puede ser reducido por ascorbato o retinol.
Ácido úrico	Representa aproximadamente la mitad de la capacidad antioxidante del plasma.

Por otra parte existen antioxidantes exógenos, y que podemos encontrar en la naturaleza en una vasta cantidad de productos de origen animal o vegetal y podemos incorporarlas en nuestra dieta diaria, (Tabla 5) (Duthie & Crozier 2000; Avello & Suwalsky 2006).

Tabla 5. Principales Antioxidantes enzimáticos, no enzimáticos y su fuente.

Antioxidantes exógenos	Fuente
Vitamina E	Aceites vegetales, germen de trigo y de maíz, almendras, avellanas, girasol, frijol de soya, nuez, maní, pimentón, apio, pollo y pescado.
Vitamina C	Cítricos, guayaba, mango, kiwi, fresa, papaya, mora, piña, tomate, verduras de hojas verdes, coliflor, brócoli, pimentón y lechuga.
Carotenoides	<i>B-caroteno</i> Verduras y frutas amarillas y anaranjadas, verduras verde oscuro. <i>Alfacaroteno</i> Zanahoria <i>Licopeno</i> Tomate <i>Luteína y zexantina</i> Verduras de hoja verde, brócoli.
Xantofilas	<i>Astaxantina</i> Camarón, jaiba, langosta, salmón
Isoflavonas, ácidos fenólicos	Frijol de soya
Polifenoles, catequinas	Té verde, té negro
Esteres fenólicos	Café
Ácidos fenólicos, polifenoles	Vino tinto
Ácido carnósico, ácido rosmárico	Romero
Bioflavonoides, chalconas	Cítricos y otras frutas
Quercetina, camferol	Cebollas
Polifenoles	Aceitunas

## 4.20 Astaxantina

Es uno de los antioxidantes más potentes conocidos hasta ahora, es un cetocarotenoide liposoluble de color rojizo cuyo nombre químico es 3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta'$ -caroteno-4,4'-diona, pertenece al grupo de las xantofilas (molécula oxigenada). A nivel molecular presenta una estructura lineal ( $C_{40}H_{52}O_4$ ), con dos anillos funcionales ceto en su extremo pues contiene 2 moléculas de  $O_2$  de ahí que deriva su nombre, tiene un peso molecular de 596.8 Da (Figura 10). Estructuralmente tiene similitud con algunos otros antioxidantes de la misma familia como lo son la zeaxantina,  $\beta$ -caroteno, luteína, y la cantaxantina (Figura 12). sin embargo, la diferencia radica en la presencia de los oxígenos anteriormente mencionados (Guerin *et al.*, 2003; Hussein *et al.*, 2006; Algatechnologies, 2010) .

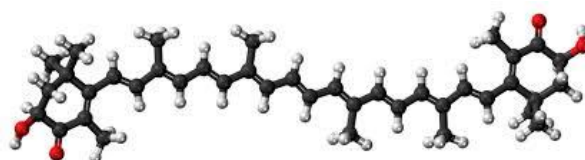
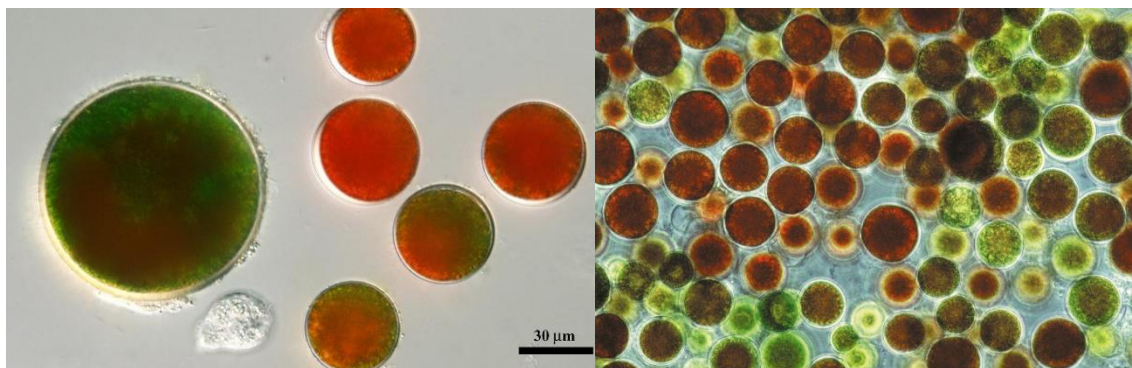


Figura 10. Estructura molecular lineal de la astaxantina.

La astaxantina, se puede encontrar de forma natural en algunas frutas rojas, flores, carnes rojas, plumaje de algunas aves como los flamings y codornices, hongos microscópicos como la especie *Phaffia rhodozima* y en animales marinos como los crustáceos, entre los que destacan los camarones, jaibas y langostas, pero el principal productor es el alga marina *Haematococcus pluvialis* (Figura 11) (Kobayashi *et al.*, 1991). Su alta producción de ASTX es de interés comercial. Se ha estimado que el contenido de astaxantina en el hongo *P. rhodozima* suele alcanzar 0.4 mg/g de masa seca, mientras que *H. pluvialis* es de 50 mg/g de masa seca (Johnson & Schroeder, 1995), en la primera especie la ASTX aparece de forma libre, mientras que en la segunda siempre es encontrado como éster (Renstrom, Borch,



Skulberg, & Liaaen-Jensen, 1981), del cual 70 a 80 % está presente como monoéster, mientras que el 20-30 % como diéster.

Figura 11. Distintas etapas de *Haematococcus pluvialis* en la producción de ASTX, tomado de Algatech, 2017.

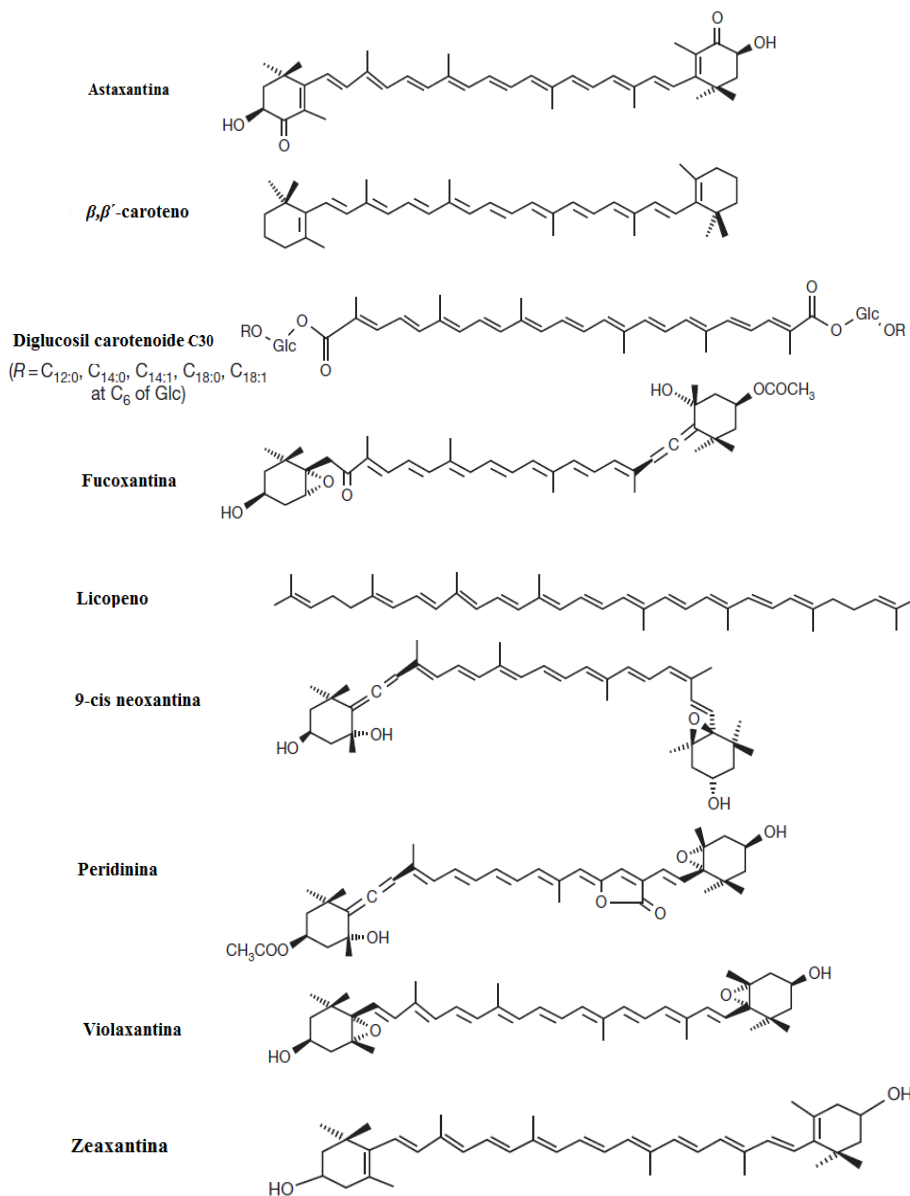


Figura 12. Estructura molecular de distintos carotenoides, tomado y modificado de Scheer, 2008.

A nivel molecular, la ASTX se caracteriza porque tiene la particularidad de insertarse en la membrana celular de manera transversal, lo que le confiere su potente capacidad antioxidante, el cual es varias veces mayor al del  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, luteína, cantaxantina, y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (Shimidzu *et al.*, 1996; Kurashige *et al.*, 1990) (Tabla 6), debido a que los anillos de la ASTX quedan expuesto en ambas caras de la membrana celular (intra y extracelular), a diferencias de otros antioxidantes como la vitamina C, la cual solo queda expuesta en la membrana externa, el  $\beta$ -caroteno, que se inserta de manera perpendicular en la parte interna de la membrana celular y solo atrapa radicales internos a la membrana y cercanos a ella en la parte externa celular (Figura 13) (Goto *et al.* 2001).

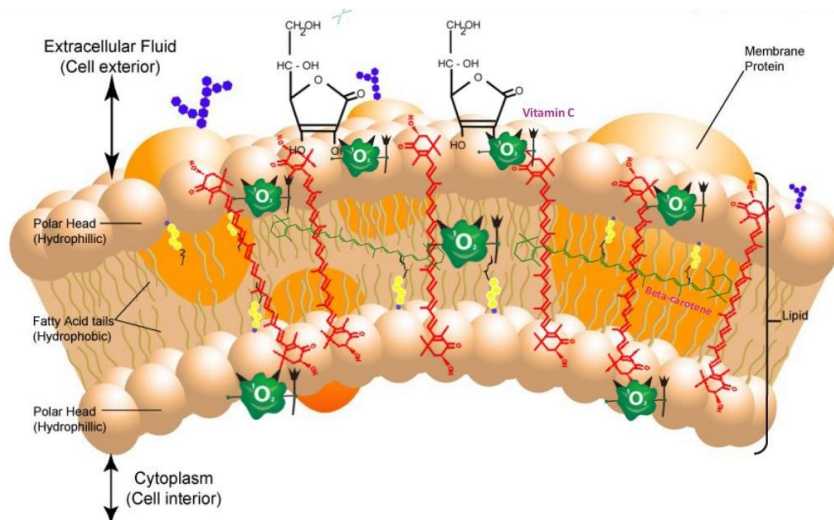


Figura 13. Disposición de la ASTX y otros antioxidantes a nivel membrana celular. Tomado de Algatechnologies, 2010.

La astaxantina (ASTX) es un potente antioxidante (Iwabayashi *et al.*, 2009; Goto *et al.*, 2001), con propiedad anti-inflamatorias (Park *et al.*, 2010) e inmuno-moduladoras, ha demostrado contrarrestar el estrés oxidativo causado por otras enfermedades al corazón y contribuir a prevenir el daño causado por la oxidación a las células cardiacas (Fassett & Coombes, 2012), manteniendo la salud cardiovascular en general y mostrando un efecto cardioprotector (Nakao *et al.*, 2010).

Por otra parte se ha demostrado que el antioxidante Astaxantina tiene aplicaciones muy importantes en la industria alimenticia, cosmética, y nutricional (Guerin *et al.*, 2003) ya que se ha reportado que su ingesta como carotenoide puede ayudar a prevenir y combatir varias enfermedades en el humano (Hussein *et al.*, 2006) mantener la salud visual, cardiovascular, del sistema nervioso, rendimiento muscular, hipertensión, ulcera gástrica e incluso como



agente anti-cáncer (Revisado en Algatechnologies, 2010), esto debido a que los carotenoides como la ASTX son potentes antioxidantes biológicos, que puede absorber la energía excitada de un singlete de oxígeno dentro de la cadena del carotenoide provocando la degradación de la molécula carotenoide y así previniendo la aparición de radicales libres que pueden causar daño a las células de los tejidos de tejidos (Naguib *et al.*, 2000).

Tabla 6. Capacidad comparativa de la ASTX y otros carotenoides para eliminar radicales libres. Tomado y modificado de Algatechnologies, 2010.

Sistema experimental	Carotenoides	Tasa de actividad de la ASTX	Referencia
Solución química	$\beta$ -caroteno	x 1.5	Terao 1989
	Zeaxantina	x 1.5	
	Cantaxantina	comparable	
	Zeaxantina	x 2	Miki 1991
	Luteína	x 3.5	
	Cantaxantina	x 2.5	
	$\beta$ -caroteno	x 4.5	
	Vitamina E	x 100	
Protección contra oxidación lipídica en liposomas	Licopeno	x 2	Barros 2001
	Vitamina E	x 2	
	Cantaxantina	x 3-10	Rengel 2000
	$\beta$ -caroteno	x 2	Goto 2001
	$\beta$ -caroteno	x 6	Naguib 2000
	$\alpha$ -caroteno	x 2.5	
	Licopeno	x 3	
	Luteína	x 3	
Protección contra la oxidación de lípidos en microsomas de rata	$\beta$ -caroteno	x 4	Palozza 1992
	Cantaxantina	comparable	
	Vitamina E	comparable	
Protección contra la oxidación de lípidos en microsomas y órganos de ratas	Vitamina E	+ potente	Nishigaki 1994

#### 4.21 Biodisponibilidad y farmacocinética de la astaxantina

La ASTX es insoluble en agua y el nivel de esterificación determina la fácil absorción o no en el sistema digestivo, es también muy sensible a oxidación cuando la ASTX se encuentra libre, sin embargo, la forma esterificada obtenida en *H. pluvialis* muestra alta biodisponibilidad y potencia. En cuanto a la farmacocinética, son pocos los estudios referentes, sin embargo, se ha observado que la absorción de la ASTX es similar al proceso de captación, transporte y liberación de los ácidos grasos, debido a que es una molécula

liposoluble. La astaxantina se incorpora a quilomicrones y se distribuye entre lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) y se transporta a los tejidos. Se ha observado que a las pocas horas de ingerida la ASTX, alcanza su pico más alto en plasma, se distribuye en todos los tejidos, pero se ha visto una mayor concentración en hígado y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica en humanos. En aves se ha detectado alta concentración en intestino, seguida por grasa subcutánea, grasa abdominal, bazo, hígado, corazón, riñón y piel (Algatechnologies 2010). La ASTX se elimina relativamente rápido, se ha registrado una vida media promedio de 15.9 horas y altas concentraciones ingeridas de ASTX no se reflejan en concentraciones altas en plasma, no se almacena en tejido por periodos largos por lo menos en humanos y algunos reportes indican que el 64% de la ASTX ingerida se secreta en heces, la ingesta de cantidades de ASTX que van de 1 hasta 40 mg/kg/día no han reportado efectos adversos en humanos (revisado en Guerin *et al.*, 2003; Hussein *et al.*, 2006; Algatechnologies, 2010).

#### **4.22 Astaxantina, respuesta inflamatoria y sistema inmune**

Varios reportes mencionan que la ASTX mejora de la respuesta inmune mediada por células, específicamente para algunos reportes referentes a la provitamina A y astaxantina, donde se menciona que pueden prevenir la inflamación por bloqueo de la expresión de genes pro-inflamatorios debido a la supresión del factor kappaB (NF- $\kappa$ B), también se demostró inhibición de ON, prostaglandina E2 (PGE2) y las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$ . En otro estudio, en ratas con uveítis inducido por lipopolisacárido. Se reportó que la ASTX induce efecto de supresión de la inflamación ocular de manera dosis dependiente, por supresión de ON, PGE2 y producción de TNF- $\alpha$  por bloqueo directo de la actividad de la ON sintasa. Por otra parte, un estudio de células mononucleares de sangre periférica en pacientes asmáticos, mostró que la ASTX puede suprimir la activación de las células T, respuesta equiparable a algunos antihistamínicos y por último se ha demostrado que la ASTX es capaz de disminuir la inflamación gástrica asociada con la respuesta inflamatoria inducida por infección con *Helicobacter pylori* (revisado en Hussein *et al.*, 2006; Guerin *et al.*, 2003; Algatechnologies, 2010). Por otra parte se sabe que la modulación inmune tiene como objetivo restablecer el equilibrio entre los diferentes subconjuntos de células T, de modo que se suprimen las respuestas perjudiciales producidas por estrés oxidativo y otros factores, varios reportes indican que la ASTX, puede modular el sistema inmune, por estimulación de la proliferación de linfocitos T y producción de inmunoglobulinas en células de bazo, incrementa la actividad de las células NK y subpoblaciones de células T y B (Park *et al.*, 2010), un estudio en células sanguíneas humanas, demostró que la ASTX incrementa la producción de IgA, IgM e IgG como respuesta a estímulo célula T-dependiente (revisado en Algatechnologies 2010).

#### 4.23 Astaxantina, antioxidantes y enfermedad de Chagas

Varios trabajos *in vitro* han reportado que los antioxidantes provenientes de algunas plantas podrían tener efecto sobre la viabilidad de distintos parásitos, por ejemplo se ha observado que el extracto de la planta *Tecoma mollis* tiene actividad contra *leishmania donovani* (Abdel-Mageed et al. 2012), al igual que el extracto de *Cornus florida* y que además tiene actividad contra *Plasmodium falciparum* (Graziose et al. 2012), se ha reportado además que el extracto etanólico de las hojas de *Arrabidaea triplinervia* mostró actividad *in vitro* contra tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Leite et al. 2006), de igual manera diterpenos de *Dracocephalum komarovi* mostro ser un potente tripanomicida que evita la replicación de amastigotes *in vitro* (Uchiyama et al. 2005), y más recientemente se observó que flavonoides presentes en el extracto de la planta *Moringa oleífera* induce muerte a *Trypanosoma brucei* (Ukachi et al. 2015).

Tal como se mencionó con anterioridad, se ha demostrado efecto benéfico tras la ingesta de antioxidantes como la vitamina E y C incluida la astaxantina en enfermedades como cáncer, Parkinson, Alzheimer, inflamación crónica y enfermedades cardiovasculares por el potencial de estos en mantener la homeostasis contra daño de las ERO y proteger al tejido contra la peroxidación lipídica (Brigelius-Flohe *et al.*, 2002; Padayatty *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas, el corazón del hospedero está expuesto a invasión, a la replicación del parásito, a las reacciones citotóxicas del propio sistema inmune y por tanto estrés oxidativo, el cual es causado por altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos a partir de la estimulación de mediadores inflamatorios (Citocinas y quimiosinas), lo que causa lesión y muerte de cardiomiocitos, dichas lesiones puede contribuir al desarrollo de cardiomiopatía chagásica (Wen *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2009).

Pocos estudios han reportado el uso de antioxidantes exógenos durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, la mayoría de ellos evalúan el efecto de antioxidantes en etapa crónica de la enfermedad de Chagas y su efecto en el desarrollo de la cardiomiopatía dilatada chagásica. Por ejemplo, se ha demostrado que la terapia de antioxidantes como la vitamina E y C disminuyen los niveles de radicales libres (RL) y estrés oxidativo asociado con la enfermedad de Chagas (Ribeiro et al. 2010; Maçao et al. 2007), protegiendo al miocardio y controlando la evolución a cardiomiopatía chagásica (Wen et al. 2010).

Solo un estudio ha evaluado la inmunización con una vacuna recombinante compuesta de plásmidos con los fragmentos antigénicos TCG2 y TcG4 y de la citocina IL-12 y del GM-

CSF, más refuerzo de proteína en ratones infectados con *T. cruzi* que sobre-expresaban GPx, determinando que la GPx protege de la patogénesis chagásica del corazón, demostrando arresto de la persistencia parasitaria en fase crónica, reduciendo la inflamación y el estrés oxidativo. Se observó además que la estrategia vacunal controló la miocarditis y la remodelación cardíaca causados por la enfermedad de Chagas (Gupta *et al.*, 2015).

Por todo lo anterior, estamos interesados en evaluar el posible efecto que tendría el antioxidante astaxantina en el cultivo de parásitos y en la suplementación de la misma en ratones BALB/c infectados experimentalmente con *T. cruzi* cepa NINOA (TcI) e inmunizados con la vacuna TcVac1M y evaluar si la estrategia Astaxantina/TcVac1M muestran efecto positivo en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los fármacos anti-chagásicos utilizados y aprobados por la OMS no son completamente efectivos, ya que producen efectos secundarios adversos y la eficacia de estos fármacos dependen de la edad del paciente, de la cepa del parásito y la fase de la enfermedad. Por otro lado, no se ha desarrollado una vacuna que produzca inmunidad estéril y por tanto, es necesario encontrar tratamientos terapéuticos y profilácticos más efectivos.

Se ha observado que los antioxidantes contribuyen a mantener la salud del corazón, reduciendo niveles de estrés oxidativo, pero no se ha probado su efecto sobre animales infectados con *T. cruzi*, por lo que sería interesante evaluar los efectos del antioxidante sobre la salud cardíaca en animales infectados y en animales vacunados e infectados.

## 6. HIPÓTESIS

Un tratamiento profiláctico y terapéutico basado en la aplicación de una vacuna génica (TcVac1M) y un antioxidante (astaxantina) actúan de manera sinérgica para controlar la proliferación parasitaria, así como para reducir los daños ocasionados en tejido cardíaco de animales (ratones BALB/c) infectados experimentalmente con *T. cruzi*.

## 7. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los logros alcanzados en materia de control vectorial, prevención y tratamiento de la enfermedad, la Tripanosomiasis Americana sigue siendo un serio problema de salud pública en países endémicos y algunos países donde la enfermedad es exótica, ya que afecta a alrededor de 8 millones de personas a nivel mundial y más de 25 millones de personas están en riesgo de infección, además de que se estima que 50,000 personas se infectan y 10,000 mueren anualmente por este padecimiento.

Por tanto, se requieren, esquemas terapéuticos más efectivos, eficientes, menos tóxicos y de bajo costo. Una alternativa que podría aumentar la eficacia de la inmunidad protectora de los antígenos vacunales candidatos, es el uso de la ASTX, por sus propiedades antioxidantes, inmuno-moduladoras y por ayudar a mantener la salud cardiovascular en general cuando es incluida en la dieta.

Este sistema podría detener el ciclo biológico de *T. cruzi* y beneficiar a la población humana afectada de las regiones endémicas de nuestro país y de América Latina.

## 8. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la ASTX como un elemento coadyuvante en la respuesta protectora contra una infección experimental de *Trypanosoma cruzi*, en ratones BALB/c vacunados con TcVac1M.

### 8.1 OBJETIVO PARTICULAR

- Evaluar el efecto de la ASTX en cultivos de *T. cruzi* y de células VERO *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la ASTX sobre cultivo de células VERO infectadas con *T. cruzi*.
- Determinar el porcentaje de viabilidad de *T. cruzi* y células VERO *in vitro* post-tratamiento con ASTX.
- Determinar los niveles de parasitemia, porcentaje de sobrevida, cambios macroscópicos y microscópicos de corazón y bazo de los ratones inmunizados con TcVac1M, infectados con *T. cruzi* y suplementados con ASTX.
- Determinar niveles de estrés oxidativo y respuesta inmune humoral en suero de ratones inmunizados con TcVac1M, infectados con *T. cruzi* y suplementados con ASTX.



## 9. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de biología molecular y bioterio del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) perteneciente a la Universidad Autónoma de Estado de México (UAEM). El CIESA se localiza en el kilómetro 14.5 de la carretera Panamericana en su tramo Toluca–Atlacomulco.

La estrategia de investigación consta de 2 partes: *In vitro* e *In vivo*

### 9.1 Estrategia *in vitro*

#### 9.1.1 Cultivos de células

Se cultivaron a confluencia células Vero (ATCC, CCL-81) en botellas T25 (Sarsted, USA) con DMEM (Gibco, USA) a 37 ° C, 5 % CO<sub>2</sub>, 10% SFB (Suero Fetal Bovino) (Gibco, USA) y penicilina-estreptomicina 1% (Gibco, USA). A los cultivos celulares se les realizó pasajes cada tercer día por tripsinización de acuerdo a protocolos publicados (Contreras-Ortiz *et al.*, 2017). En breve: a la monocapa se le retiró el medio y se lavó con PBS 1X (Gibco, USA) mediante movimientos circulares, se retiró el volumen de lavado, se incubaron con 1 mL de tripsina al 0,25% (Gibco, USA), y una vez que las células ya no estaban ancladas a la superficie se colectaron y lavaron con 1 ml de PBS y se sembró en una nueva placa 20% del volumen total recolectado en medio de cultivo DMEM suplementado y se les permitió crecer a un porcentaje del 60% de confluencia.

#### 9.1.2 Cultivo de parásitos *Trypanosoma cruzi* cepa NINOA en línea celular VERO

A partir de cultivos preservados de *T. cruzi*, cepa NINOA (TC1) (amablemente donado por el Dr. Pedro Reyes, del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez”), fueron usados para infectar monocapas de células Vero. Para ello un criovial de parásitos, se descongeló por pipeteo con DMEM complementado y la suspensión de parásitos se centrifugó en un tubo de 15 mL a 2700 rpm por 7 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de medio fresco y se colocaron en una botella T25 (Sarsted, USA) con cultivo de células VERO con una confluencia del 60 %, se incubó entonces a 37 ° C, 5 % CO<sub>2</sub> y humedad saturada, se realizó cambio de medio cada tercer día con DMEM 2% SFB, 1% penicilina-estreptomicina (Manning-Cela *et al.* 2001).

### 9.1.3 Cosecha de parásitos del cultivo celular

Los parásitos fueron cultivados de 1 a 2 semanas en monocapa de células VERO, cuando estos empezaron a lisar las células infectadas, el medio con parásitos libres fue colectado en tubos cónicos estériles de 15 mL y se centrifugaron a 2700 rpm por 7 min. Se desechó el sobrenadante por decantación y el pellet se resuspendió con 1 mL de medio DMEM. Los parásitos fueron contados usando un hemocitómetro y el número fue ajustado a las necesidades de cada experimento. El total estimado ( $\bar{X}$ ) de parásitos contados obedeció a la siguiente fórmula:

$$\bar{X} = (x) (25) (\text{dilución}) (10000) (\text{mL})$$

Donde x es el promedio de parásitos contados, mL es el volumen.

### 9.1.4 Extracción de astaxantina para uso *in vitro*

Para la purificación de ASTX comercial se empleó 1 gr de astaxantina microencapsulada (Bioastin®, Cyanotech, USA), fue triturado en mortero estéril y se colocó en un tubo cónico estéril de 15 mL, y se resuspendió con 6 mL de solución de extracción compuesto a base de Éter de petróleo-Acetona-Agua, con las siguientes proporciones 15:75:10 (Meyers & Bligh, 1981), la suspensión se mezcló por inversión varias veces y vortexeo generosamente por 15 minutos, entonces el tubo se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos a 4°C, se colectó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo de 15 mL estéril y se permitió la evaporación de los solventes de la solución de extracción a 40° C por 12 horas en oscuridad, pasado este tiempo, la astaxantina se resuspendió en vórtex por 10 minutos con 2 mL de DMEM-Dimetil sulfoxido (DMSO [Sigma Aldrich, USA]) 0.3% y se filtró con un acrodisco de 0.22 µm, el filtrado se colocó en un tubo de 1.5 mL estéril y se almacenó a 4° C hasta su uso (nunca excedió la semana de almacenamiento).

### 9.1.5. Estimación de la concentración de ASTX

La concentración de la ASTX fue determinada en placa de 96 pozos (Sarsted, USA) usando una curva patrón de β-caroteno, para ello 1 mg de este carotenoide fue disuelto en 1 mL de DMSO y leído a una longitud de onda de 450 nm usando un espectrofotómetro (Biotek, Vermont, USA) y con regresión lineal simple se estimó la concentración de ASTX en µg/µL a partir de la disposición siguiente (Tabla 7).

Tabla 7. Disposición de volúmenes para curva patrón de  $\beta$ -caroteno

$\beta$ -caroteno ( $\mu$ L)	Agua inyectable ( $\mu$ L)	Total ( $\mu$ L)
0	200	200
2	198	200
4	196	200
6	194	200
8	192	200
X: 2	198	200

X= Muestra de ASTX obtenida

### 9.1.6 Ensayo de toxicidad *in vitro* de la ASTX para *T. cruzi* y células Vero

Se cultivaron tripomastigotes ( $5 \times 10^5$ /pozo) y células Vero ( $2 \times 10^4$ /pozo) por separado en una placa de 96 pozos (Sarstedt, USA) con medio DMEM suplementado (2% de SFB, penicilina-estreptomicina a 10,000 unidades/mL; estreptomicina 10.000  $\mu$ g/mL) y dosis respectivas de ASTX a 1, 5, 10, 20 y 30 $\mu$ g/100  $\mu$ L. El ensayo se realizó por triplicado con los siguientes controles: a) CT (tripomastigotes no tratados), b) CV (células Vero no tratadas, c) DMEM/DMSO en una proporción equivalente a la cantidad de DMSO usada en la dosis más alta de ASTX (99.7/0.33% V/V, respectivamente) (Este control fue necesario, ya que ASTX y NFMX se solubilizaron en este disolvente) y d) Nifurtimox (400  $\mu$ g / 100  $\mu$ l) (Lampit® Bayer). El NFMX se preparó tal como se ha descrito anteriormente (Rolón et al. 2006), para ello se trituró un comprimido de la presentación comercial de NFMX (120 mg) en un mortero estéril y se resuspendió en 1 mL de DMSO. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca superó el 0,3% en una solución V/V. Las placas se incubaron durante 24 horas en condiciones controladas (37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad saturada). Después del tratamiento, se estimó la viabilidad de parásitos y células utilizando MTS (sales de 3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxymetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio), a partir del kit CellTiter 96 kit® Aqueous One Solution (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad metabólica de los parásitos y las células sobre MTS se estimó por colorimetría a 490 nm de longitud de onda. En este ensayo, cuanto mayor sea la DO, mayor será la viabilidad celular.

### 9.1.7 Evaluación morfológica de los cambios inducidos por ASTX en co-cultivo de células

#### Vero y *T. cruzi*

Se sembraron células Vero ( $5 \times 10^3$ /pozo) y se cultivaron durante 24 horas, como se describió anteriormente, y luego fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa NINOA (10 parásitos/célula) (Curty et al. 2016). Una vez que se observaron parásitos intracelulares

(aproximadamente 96 horas después de la infección), el medio antiguo se reemplazó con medio DMEM suplementado fresco con diferentes dosis de ASTX (1, 5, 10, 20 ó 30 µg/100). Como controles del co-cultivo, se empleó el fármaco NFMX (400 µg/100 µl) ó co-cultivo sin tratamiento. Después de 24 horas de incubación, se evaluaron los cambios morfológicos microscópicos en el co-cultivo, tales como pérdida de la forma celular de las células Vero infectadas con *T. cruzi*, cambios en la forma o motilidad de los parásitos y variaciones en la presencia de parásitos intracelulares o extracelulares. Adicionalmente, la viabilidad del parásito se evaluó mediante el ensayo de tinción con azul tripán (Acosta-Viana *et al.*, 2013).

### **9.1.8 Astaxantina como preventivo para infección de *T. cruzi* en células Vero**

Se sembraron  $0.5 \times 10^4$  células por pozo en placa de 96 pozos (83.1835 Sarsted) con DMEM-2 % SFB, 24 horas después, se comenzó a dar tratamiento con ASTX a una dosis única de 1µg/100 µL (ya que dosis posteriores de 3 y 4 µg son perjudiciales para las células), y fue reemplazado por DMEM-ASTX cada tercer día, por 4 ocasiones, pasado este tiempo se infectaron las células con parásitos de *T. cruzi*, cepa NINOA de igual manera cada tercer día se hacía nuevamente cambio de medio y astaxantina, 4 días después se registraron los cambios, en este caso presencia o ausencia de parásitos intracelulares.

## **9.2 Estrategia *in vivo***

**La estrategia *in vivo* constó de 2 experimentos:**

- A) Astaxantina en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi***
- B) TcVac1M y Astaxantina en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi***

### **9.2.1 A) Astaxantina en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi***

#### **9.2.1.1 Animales y desafío**

Ratones hembra BALB/c (N=48), de 4 a 6 semanas de edad, se distribuyeron en 8 grupos (n=6): G1-G8 (Tabla 8). Los animales de los grupos G1 a G4, fueron infectados de manera intraperitoneal con 10 tripomastigotes de la cepa NINOA (TC1) cada uno. Los ratones experimentales fueron evaluados clínicamente todos los días para registrar cambios en la salud del animal, tal como pérdida de peso, hirsutismo, problemas de movilidad, cojera o cualquier otro cambio de comportamiento. Se decidió utilizar ASTX durante la fase aguda de la infección en ratones BALB/c, ya que no hay informes previos sobre el uso de antioxidantes en esta etapa de la infección y porque en experimentos *in vitro* en nuestro laboratorio (descritos anteriormente en metodología) la ASTX mostró efecto antiparasitario,

cuando es evaluado en cultivo solo de *T. cruzi*. También decidimos probar la ASTX como posible agente antiparasitario durante una etapa temprana de la infección en ratones BALB/c, porque esta cepa de ratón es susceptible a la infección con la cepa NINOA de *T. cruzi* con un resultado predecible y la parasitemia es fácilmente detectada. Por tanto, durante la fase aguda de la infección, el nivel de parasitemia se utilizó como indicador del desarrollo de la enfermedad (Diáz-Limay *et al.*, 2004) y podríamos tener un parámetro fácil de evaluar y por tanto estimar los efectos finales de ASTX en la infección mientras los animales estaban vivos.

Tabla 8. Grupos de ratones del experimento A

Grupos de Ratón (n=6)	Dosis infectiva de <i>T. cruzi</i> cepa NINOA	Dosis de ASTX mg/kg/day	Dosis de Nifurtimox mg/kg/day
G1 (Tc)	10 parásitos		
G2 (Tc/ASTX)	10 parásitos	10	
G3 (Tc/ASTX/NFMX)	10 parásitos	10	100
G4 (Tc/NFMX)	10 parásitos		100
G5 (Solución salina)			
G6 (NFMX)			100
G7 (AST/NFMX)		10	100
G8 (ASTX)		10	

Tc: Desafío con *T. cruzi* (control positivo); ASTX: Astaxantina; NFMX: Nifurtimox; G5-G8 (controles). Seis ratones BALB/c fueron usados por grupo.

#### 9.2.1.2 Parasitemia

La parasitemia fue analizada para cada ratón por prueba de gota fresca de sangre. Las muestras fueron colectadas 2 veces a la semana comenzando en el día 5, hasta el día 60 post-infección o cuando los parásitos ya no fueron detectados microscópicamente en preparaciones de gota fresca. El muestreo fue ejecutado de acuerdo con (Brener, 1962) con ligeras modificaciones, brevemente; un corte pequeño fue realizado en la punta de la cola del ratón, y 4  $\mu$ L de sangre fueron colectados con una micropipeta, y colocados en un portaobjetos de vidrio y cubierto con un cubreobjetos de 18 x18 mm. Las muestras fueron observadas bajo un microscopio de campo claro a 400 X, los parásitos de 100 campos aleatorios fueron contados y el número de parásitos/ $\mu$ L fue estimado con protocolos estándar (Rowland & Sibley-Phillips 1984; Kuhn *et al.*, 1975).

#### 9.2.1.3 Suplementación de ASTX y tratamiento con NFMX para ensayos *in vivo*

A partir del día 12, se administraron ASTX y/o NFMX (Lampit, Bayer<sup>TM</sup>) según el grupo de tratamiento (Tabla 1). La ASTX se preparó a partir de 400 mg de perlas de Bioastin®, los cuales se trituraron en un mortero estéril en condiciones asépticas, se resuspendieron y se

homogenizaron en 3 mL de una solución estéril al 20% (V/V) de Tween-20/agua destilada (Anarjan & Tan, 2013) para un volumen final de 3.1 mL. Se administró ASTX vía oral (60 µl de ASTX, equivalente a 10 mg/kg/día de ASTX pura) con una micropipeta hasta el día 60 después de la infección, esta concentración ha mostrado efecto inmuno-modulador y anti-inflamatorios en ratones y otras especies, incluido el hombre (Kuan Hung *et al.*, 2015; Kavitha *et al.*, 2013; Nakao *et al.*, 2010; Park, Kim, *et al.*, 2010). Por su parte el NFMX se preparó en condiciones asépticas triturando un comprimido que contenía 120 mg de NFMX (Lampit, Bayer) en un mortero estéril y resuspendido en 1 mL de agua destilada estéril (Cencig *et al.*, 2012). Se administró por vía oral en una dosis única diaria de 100 /kg/día (Cabeza *et al.*, 1988) (Tabla 1) en un volumen aproximado de 60/µL. El tratamiento se llevó a cabo hasta el día en que no se pudo detectar más la parasitemia mediante preparaciones de gota fresca, tal como se describe anteriormente (Bonney & Engman 2008; Kuhn *et al.*, 1975; Rowland & Sibley-Phillips, 1984).

#### 9.2.1.4 Sacrificio animal y muestreo de tejidos

Tejidos de corazón y bazo de los ratones experimentales se colectaron después de que murieron por la infección o cuando fueron eutanasiados al día 60 después de la infección. La eutanasia se realizó por dislocación cervical siguiendo los protocolos establecidos por Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1999) (NOM, 1999), el comité de bioética de la UAEM-FMVZ y del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (NAS, 2011). Se tomaron muestras de sangre directamente del corazón para obtener sueros el día del sacrificio y los tejidos se fijaron en formaldehído al 10% para estudios histopatológicos.

#### 9.2.1.5 Estudios histopatológicos

Los tejidos fueron fijados en formaldehído al 10 % por 24 horas, deshidratados en etanol absoluto e incluidos en parafina. Secciones de tejido (5 µm) fueron preparadas y teñidos con hematoxilina-eosina para ser observados bajo microscopio de campo claro (Carl Zeiss Axiostar, USA), se documentó con imágenes las cuales fueron registradas con una cámara Tucsen de 5 MP (Tucsen, China) y analizados con el programa Image-Pro Plus 7. Las muestras de tejido fueron observadas microscópicamente a una ampliación de 400 X, para registrar la carga parasitaria (nidios de amastigotes observados en 100 campos aleatorios). La severidad de la inflamación fue estimada por infiltración de linfocitos en tejido, en 400 campos aleatorios usando la escala propuesta por (Barbabosa-Pliego *et al.*, 2009) : (-), ninguna: (+), ligera; (++) , moderada; (+++), severa.

#### 9.2.1.6 Ensayo Malondialdehido (MDA)

Los niveles de MDA fueron determinados en suero, siguiendo las instrucciones del kit OxiSelect™ MDA Adduct ELISA kit (Cell Biolabs, USA). Estándar del kit y muestras fueron incubados en una placa de 96 pozos por 2 horas a 37 ° C, los aductos de proteína-MDA presentes en la muestra y estándar fueron probados con un anticuerpo anti-MDA seguido por un anticuerpo secundario conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) y revelado con 3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) y leído por espectrofotometría a 450 nm. Los aductos proteína-MDA contenidos en cada muestra fueron determinados por comparación con una curva estándar que fue preparado de un estándar MDA-BSA predeterminado (Dittrich et al. 2012) y una regresión lineal simple fue usada para determinar la concentración de MDA en pmol/mL.

#### 9.2.2 B) TcVac1M y Astaxantina en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*

Los experimentos referentes a cultivo y cosecha de parásitos, parasitemia, sacrificio animal y muestreo de tejido, estudio histopatológico y niveles de MDA, fueron descritos previamente en la metodología del experimento A.

##### 9.2.2.1 Clonación y replicación de pcDNA3.0/TcG2 y pcDNA3.0/TcG4

Diez microlitros de un cultivo de bacterias *Escherichia coli* cepa DH5- $\alpha$  transformadas con los vectores de expresión pcDNA3.0/TcG2 ó pcDNA3.0/TcG4, fueron reactivados en 5 mL de medio LB (Sigma, USA) sin antibiótico e incubado por 3 horas a 37°C con agitación constante (220 rpm). Posteriormente, 200  $\mu$ L del cultivo anterior se inocularon en 10 mL de LB y se incubaron a 37°C por 16 horas con agitación, enseguida, 10  $\mu$ L del cultivo se sembraron en placas de cultivo LB-Agar con ampicilina [100mg/mL] (Pentrexil<sup>R</sup> Bristol-Myers Squibb) y se incubaron a 37°C por 16 horas para selección de colonias (Sambrook & Russell, 2001). Se seleccionó una colonia de la placa LB-Agar con bacterias en crecimiento y se inoculó en 10 mL de medio LB con ampicilina e incubó a 37°C por 16 horas con agitación constante para replicación de los plásmidos y producción de TcVac1M.

##### 9.2.2.2 Extracción y purificación de la vacuna TcVac1M

La extracción del ADN plasmídico que contienen los antígenos TcG2 y TcG4, se realizó con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente, tubos de cultivo bacteriano en crecimiento (16

horas) se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y el pellet bacteriano fue resuspendido y lisado. El material genético fue purificado, mediante columnas de filtración. Finalmente, el ADN plasmídico se eluyó en agua desionizada y se estimó la concentración por espectrofotometría (Quawell, USA) a 260 nm.

#### 9.2.2.3 Control de calidad de la purificación de plásmidos

Se realizó una doble digestión al ADN plasmídico extraído para detectar los fragmentos correspondientes a TcG2 ó TcG4 (662 y 276 pb respectivamente), mezclando 12.8 µL de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, USA), 2 µL de Buffer MULTI-CORE (MC) (PROMEGA, USA), 0.5 µL de enzima de restricción Hind III/Xba1; BamHI/Xba1 respectivamente (PROMEGA, USA) y 4 µL de ADN plasmídico, la mezcla se incubó por 1 hora a 37°C para posteriormente visualizarse por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % (Sambrook y Fritsch, 2001).

#### 9.2.2.4 Animales

Se emplearon ratones hembras (N=48) de la cepa BALB/c de 4 a 6 semanas de edad, distribuidos en 8 grupos (n=6) como sigue: A1 (Tc/TcVac1M); A2 (Tc/TcVac1M/ASTX); B (TcVac1M); C (Tc); D (Tc/ASTX); E (Tc/ASTX/NFMX); F (Tc/NFMX); G (SOL\_SAL) (Tabla 1), los grupos de ratones fueron mantenidos bajo condiciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1995 (NOM, 1995) con agua y alimento *ad libitum*.

#### 9.2.2.5 Inmunización, infección y tratamientos

Se determinó la concentración de los plásmidos (TcG2 y TcG4) con ayuda de un espectrofotómetro a 260 nm (Quawell Inc., USA) y para el proceso de inmunización se mezclaron ambos antígenos. Los grupos correspondientes (Ver tabla 9) se vacunaron con 10 µg de TcVac1M (TcG2 y TcG4), administrados por electroporación intradérmica en 3 ocasiones, con espacio de 15 días cada uno. A los 15 días después de la última etapa de inmunización, los grupos de ratones experimentales correspondientes fueron desafiados con 10 parásitos de *Trypanosoma cruzi* de la cepa NINOA por vía intraperitoneal y se evaluaron clínicamente todos los días, para registrar cambios en la salud de los animales, tales como pérdida de peso, hirsutismo, problemas de movilidad, cojera o cualquier otro cambio de comportamiento.



Tabla 9: Grupos Experimentales del experimento B.

Grupos de ratones (n=6)	Dosis de <i>T. cruzi</i> para desafío Cepa: NINOA	Dosis Astaxantina (ASTX) mg/kg/día	Dosis Nifurtimox (NFMX) mg/kg/día	Dosis TcVac1M µg
A1 (Tc/TcVac1M/ASTX)	10 parásitos	8		10
A2 (Tc/TcVac1M)	10 parásitos			10
B (TcVac1M)				10
C (Tc)	10 parásitos			
D (Tc/ASTX)	10 parásitos	8		
E (Tc/ASTX/NFMX)	10 parásitos	8	100	
F (Tc/NFMX)	10 parásitos		100	
G (SOL SAL: Solución salina)				

#### 9.2.2.6 Suplementación con ASTX

A partir del día 12, día en el que se registraron parásitos en sangre, se administraron vía oral 8 mg/kg/día de ASTX (Bioastin®, Cyanotech, USA), según correspondiera a los grupos designados (Tabla 9), hasta el día 60. La ASTX se preparó triturando 400 µg de perlas de ASTX (para asegurar la dosis) en mortero en condiciones de esterilidad y se resuspendió en 3 mL de una solución estéril al 20 % (V/V) Tween 20/agua destilada (Anarjan & Tan, 2013), para un volumen final de 3.1 mL. La suplementación con ASTX (60 µl de preparación de ASTX, equivalente a 8 mg/kg/día de ASTX puro) se administró oralmente con una micropipeta hasta el día 60 después de la infección. Esta concentración ha mostrado efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios en ratones y otras especies, incluido el hombre (Kuan-Jung *et al.*, 2015; Kavitha *et al.*, 2013; Nakao *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010). El fármaco NFMX se empleó como control positivo, para ello se preparó en condiciones asépticas colocando un comprimido que contenía 120 mg de NFMX (Lampit, Bayer) en un mortero y se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril (Cencig *et al.*, 2012). Se administró por vía oral una dosis única diaria de 100 mg/kg/día (Cabeza *et al.*, 1988) (Tabla 9) en un volumen de 60 µL. El tratamiento se llevó a cabo hasta el día en que la parasitemia ya no podía detectarse a través de preparaciones de sangre fresca, tal como se describió anteriormente (Bonney y Egman, 2008; Rowland *et al.*, 1984).

#### 9.2.2.7 Detección de anticuerpos IgG por ELISA

Una placa de 96 pozos (Nunc Maxisorp, Thermo Fisher, USA) fue sensibilizado con lisado de parásitos de Tc (5µg/mL de proteína en buffer NaCO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 6.8) e incubado toda la noche a 4 ° C, para detectar anticuerpos generados por la vacuna TcVac1M (TcG2/TcG4), Las placas fueron lavadas con 200µl de PBS 1X-0.05% Tween-20 (PBS-T) y bloqueados con 5% leche sin grasa-PBS-T por 1 hora a 37 °C. Los sueros experimentales fueron diluidos 1:1000 en 200µl de PBS-T 0.05% agregados a la placa e incubados 1 h a 37 °C. Las placas

fueron posteriormente lavadas 6 veces con PBS-T y se agregó el conjugado peroxidasa-anticuerpo de inmunoglobulinas (IgG: 1:2500) y se incubó por 1 hora a 37 °C. Las placas fueron lavadas nuevamente y se la agrego el sustrato peroxidasa en búfer citrato a pH de 4.5-0.03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El color fue desarrollado con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La reacción se detuvo 15 minutos después adicionando una solución de 5N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La lectura se realizó a 450 nm en espectrofotómetro Epoch, (BioTek, USA).

### **9.3 Análisis estadístico**

La prueba de análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para analizar los resultados de ensayo de viabilidad *in vitro*, parasitemia, niveles de MDA y niveles de IgG. Las diferencias entre grupos para todos los ensayos se evaluaron mediante la prueba de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete de software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc., San Diego, California, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0.05$ .

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Artículo Publicado

#### Resumen

Durante la infección por *Trypanosoma cruzi*, el estrés oxidativo es considerado un factor que contribuye al desarrollo de la cardiomiopatía dilatada. En este estudio, los efectos de la astaxantina (ASTX) se evaluaron como un tratamiento farmacológico alternativo para la enfermedad de Chagas en modelo murino durante la fase aguda de la infección, dadas sus propiedades anti-inflamatorias, inmuno-moduladoras y antioxidantes. La ASTX se evaluó *in vitro* en cultivo axénico de parásitos y en co-cultivo con células Vero. *In vivo* se evaluó el efecto de la suplementación de la ASTX (10 mg/kg/día) y/o Nifurtimox (NFMX, 100 mg/kg/día) en ratones BALB/c (4-6 semanas de edad) infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los resultados muestran que la ASTX tuvo un efecto detrimental sobre el cultivo axénico de parásitos afectando su viabilidad, pero no cuando se cultivó con monocapa de células Vero. *In vivo*, la ASTX no tuvo ningún valor terapéutico frente a la infección aguda por *Trypanosoma cruzi*, ya sea solo o en combinación con NFMX, debido a que los animales infectados y tratados con NFMX o ASTX/NFMX sobrevivieron al período experimental (60 días), mientras que los animales infectados y suplementados sólo con ASTX murieron antes del día 30 post-infección. La ASTX no mostró ningún efecto sobre el control de la parasitemia, sin embargo, se asoció con un incremento de infiltrado linfo-plasmocítico de tipo focal en corazón, con un número reducido de nidos de amastigotes en tejido cardíaco y folículos linfoides del bazo menos hiperplásicos, en comparación con los grupos control. Inesperadamente, la ASTX mostró un efecto negativo en animales infectados co-tratados con NFMX, ya que se observó un incremento en la duración de la parasitemia, posiblemente debido a que la ASTX bloqueó la producción de radicales libres generados por el NFMX, el cual es el mecanismo de acción antiparasitario. En conclusión, la astaxantina no se recomienda durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas ya sea solo o en combinación con Nifurtimox.

• [-PARASITE-] Editorial Decision (Accept) for your Article parasite170020R2

Yahoo  

**em@editorialmanager.com**

mayo 12 a las 1:59 A.M.

Para chema\_coco12@yahoo.com.mx

You are being carbon copied ("cc:d") on an e-mail "To" "Juan Carlos Vázquez-Chagoyán" [jvch@yahoo.com](mailto:jvch@yahoo.com)  
CC: [chema\\_coco12@yahoo.com.mx](mailto:chema_coco12@yahoo.com.mx), [abarbabosa@yahoo.com.mx](mailto:abarbabosa@yahoo.com.mx), [rigoberto\\_ros@hotmail.com](mailto:rigoberto_ros@hotmail.com), [joshkawa@hotmail.com](mailto:joshkawa@hotmail.com),  
[zpepito@hotmail.com](mailto:zpepito@hotmail.com), [hegazi\\_wael@yahoo.com](mailto:hegazi_wael@yahoo.com), [ochoaglau@yahoo.com.mx](mailto:ochoaglau@yahoo.com.mx), [uxua\\_alonso2000@yahoo.com](mailto:uxua_alonso2000@yahoo.com),  
[esvieta@gmail.com](mailto:esvieta@gmail.com)

Ref: Ms. No. parasite170020R2  
Effects of astaxanthin in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*  
Parasite

Dear Vázquez-Chagoyán,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Parasite.

It was accepted on 12/05/2017.

Proofs are usually produced within 3-10 days. You will receive an automatic message from "SAGA".

Papers are usually published within 3-10 days after your corrections are received.

Comments from the Editor and reviewers can be found below. See important comments.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Jean-Lou Justine  
Editor-in-Chief  
Parasite

Comments from the Editors and reviewers:

Editor-in-Chief

=====

Please note that English language usage in your manuscript has been edited by professional editors, including in the title and abstract.

Although all efforts have been made to ensure that the original meaning was kept, the authors are kindly requested to double-check the text on the proofs for accuracy and scientific meaning.

IMPORTANT:

Note that the language editor has found a few terms which need confirmation. I am attaching the Word file with comments. When you check the proofs on PDF, please double-check the parts which are marked "please confirm". If needed, make corrections on the proofs.

===== Parasite - Twitter Account =====

Your paper will be featured on our Twitter account.

<https://twitter.com/ParasiteJournal>

You are of course welcome to retweet and encourage your institution to retweet.

===== Parasite =====

<http://www.parasite-journal.org>

## Effects of astaxanthin in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*

José María Eloy Contreras-Ortiz<sup>1</sup>, Alberto Barbabosa-Pliego<sup>1</sup>, Rigoberto Oros-Pantoja<sup>2</sup>, José Esteban Aparicio-Burgos<sup>3</sup>, José Antonio Zepeda-Escobar<sup>1</sup>, Wael Hegazy Hassan-Moustafa<sup>1</sup>, Laucel Ochoa-García<sup>1</sup>, María Uxúa Alonso-Fresan<sup>4</sup>, Esvieta Tenorio Borroto<sup>1</sup>, and Juan Carlos Vázquez-Chagoyán<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Kilómetro 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlaconulco, C.P. 50200, Toluca, Estado de México

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Avenida Paseo Tollocan S/N, Moderna de la Cruz, C.P. 50180, Toluca de Lerdo, Estado de México

<sup>3</sup> Escuela Superior de Apan de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carr. Apan-Calpulalpan, Km. 8, Chimalpa, Tlalayote S/N, Colonia Chimalpa, Apan Hidalgo, México

<sup>4</sup> Hospital Veterinario de Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México, Jesús Carranza No. 203, Universidad, 50130 Toluca de Lerdo, México

Received 4 February 2017, Accepted 12 May 2017, Published online 31 May 2017

**Abstract** – During *Trypanosoma cruzi* infection, oxidative stress is considered a contributing factor for dilated cardiomyopathy development. In this study, the effects of astaxanthin (ASTX) were evaluated as an alternative drug treatment for Chagas disease in a mouse model during the acute infection phase, given its anti-inflammatory, immunomodulating, and anti-oxidative properties. ASTX was tested *in vitro* in parasites grown axenically and in co-culture with Vero cells. *In vivo* tests were performed in BALB/c mice (4–6 weeks old) infected with *Trypanosoma cruzi* and supplemented with ASTX (10 mg/kg/day) and/or nifurtimox (NFMX; 100 mg/kg/day). Results show that ASTX has some detrimental effects on axenically cultured parasites, but not when cultured with mammalian cell monolayers. *In vivo*, ASTX did not have any therapeutic value against acute *Trypanosoma cruzi* infection, used either alone or in combination with NFMX. Infected animals treated with NFMX or ASTX/NFMX survived the experimental period (60 days), while infected animals treated only with ASTX died before day 30 post-infection. ASTX did not show any effect on the control of parasitemia; however, it was associated with an increment in focal heart lymphoplasmacytic infiltration, a reduced number of amastigote nests in cardiac tissue, and less hyperplastic spleen follicles when compared to control groups. Unexpectedly, ASTX showed a negative effect in infected animals co-treated with NFMX. An increment in parasitemia duration was observed, possibly due to ASTX blocking of free radicals, an anti-parasitic mechanism of NFMX. In conclusion, astaxanthin is not recommended during the acute phase of Chagas disease, either alone or in combination with nifurtimox.

**Key words:** Astaxanthin, Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Oxidative stress, Nifurtimox.

**Résumé** – Effets de l'astaxanthine chez la souris infectée par *Trypanosoma cruzi*. Pendant l'infection par *Trypanosoma cruzi*, le stress oxydatif est considéré comme un facteur contribuant au développement de la cardiomyopathie dilatée. Dans cette étude, les effets de l'astaxanthine (ASTX) ont été évalués comme un traitement médicamenteux alternatif pour la maladie de Chagas chez un modèle de souris pendant la phase d'infection aiguë, compte tenu de ses propriétés anti-inflammatoires, immunomodulantes et anti-oxydantes. L'ASTX a été testée *in vitro* sur des parasites cultivés axéniquement et en co-culture avec des cellules Vero. Des tests *in vivo* ont été effectués chez des souris BALB/c (âgées de 4-6 semaines) infectées par *T. cruzi* et traitées par ASTX (10 mg/kg/jour) et/ou nifurtimox (NFMX, 100 mg/kg/jour). Les résultats montrent que l'ASTX a des effets néfastes sur les parasites cultivés axéniquement, mais pas lorsqu'ils sont cultivés avec des monocouches de cellules de mammifères. *In vivo*, l'ASTX n'a eu aucune valeur thérapeutique contre l'infection aiguë par *T. cruzi*, utilisée seule ou en association avec NFMX. Les animaux infectés traités par NFMX ou

\*Corresponding author: [jvch@yahoo.com](mailto:jvch@yahoo.com)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ASTX/NFMX ont survécu à la période expérimentale (60 jours), tandis que les animaux infectés traités uniquement avec ASTX sont morts avant le 30ème jour après l'infection. L'ASTX n'a montré aucun effet sur le contrôle de la parasitémie; cependant, elle a été associée à une augmentation de l'infiltration focale lymphoplasmocytaire du cœur, un nombre réduit de nids d'amastigotes dans le tissu cardiaque et à des follicules de la rate moins hyperplasiques par rapport aux groupes témoins. De manière inattendue, l'ASTX a montré un effet négatif chez les animaux infectés co-traités avec NFMX. Une augmentation de la durée de la parasitémie a été observée, probablement due au blocage par l'ASTX des radicaux libres, un mécanisme antiparasitaire du NFMX. En conclusion, l'astaxanthine n'est pas recommandée pendant la phase aiguë de la maladie de Chagas, seule ou en association avec le nifurtimox.

## Introduction

Chagas disease is a zoonotic health concern in Latin America caused by *Trypanosoma cruzi*, with an estimated 6–7 million people infected. The infection is not limited to vectorial transmission, since it can be transmitted through blood transfusion or organ or tissue transplantation, and many cases of non-vectorial transmission have been reported in non-endemic areas [52].

The drugs available for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in institutional health systems in Latin America are nifurtimox and benznidazole. However, these drugs have limited therapeutic value since they are effective only during the acute stages of the disease, and because these drugs may induce severe side effects in people undergoing long-term treatment [10, 50]. Furthermore, resistance to NFMX and benznidazole has been reported in parasites of different genotypes in endemic zones [9]. These therapeutic drawbacks leave people of all ages at risk [46, 47], and therefore, new strategies should be studied if an effective treatment is to be found.

During the acute phase of Chagas disease, an excessive production of free radicals in the heart has been correlated with irreversible oxidative stress (OS)-induced cardiomyocyte damage. Recent studies that analyzed the condition of the heart in Chagas disease have suggested that factors other than myocardial parasitism and autoimmune aggression are involved. It is unclear whether the tissue destruction is caused directly by factors related to the parasite, or indirectly by an immuno-inflammatory response amplified by the systemic overgeneration of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) [14, 6, 53]. Chagasic cardiomyopathy develops in 30–40% of chronically infected people. Cardiomyopathy may progress to cardiac insufficiency and sudden death because of progressive damage to cardiomyocytes and the ventricular intertruncal plexus [23].

Several studies in chronic chagasic patients suggest that the use of antioxidants, such as vitamin E and C, decreases free radical levels and the OS associated with the disease [30, 42], protecting the myocardium and preventing the progression of chagasic cardiomyopathy into more severe syndromes [51]. Astaxanthin (ASTX), a reddish carotenoid that belongs to the xanthophyll class, is a potent antioxidant naturally found in several sea animals (*Haematococcus pluvialis*) and plant species [18, 22]. It has anti-inflammatory [25] and immunomodulatory properties [12], which can stabilize free

radicals and decrease oxidative stress damage, protecting biologically important molecules. Studies have shown that ASTX counteracts OS caused by some heart diseases, preventing tissue damage caused by cell oxidation and contributing to a healthier myocardium [17, 34]. Here, we evaluated the effects of ASTX supplementation during the acute phase of Chagas disease in an induced infection with a pathogenic strain (*Ninoa*) of *Trypanosoma cruzi* in BALB/c mice.

## Materials and methods

### Ethics

Mice were kept, fed, and reared under standard conditions (18–23 °C, 50–60% relative humidity), according to the guidelines of the Bioethics Committee of the FMVZ-UAEM, the Official Mexican Standard regarding technical specifications for the care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1995) [37], and the standards of the National Academy of Science [35].

### Parasite culture

Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Ninoa* strain (TCI) (kindly donated by Dr. Pedro Reyes from the *Instituto Nacional de Cardiología* “Ignacio Chávez”), were used to infect Vero cell monolayers, which were maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM [Gibco Laboratories, USA]), supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS [Gibco Laboratories, USA]) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco Laboratories, USA), under controlled conditions (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, and saturated humidity) [31].

### Parasite harvest from cell culture

Parasites were cultured for 1–2 weeks on Vero cell monolayers, when they started to break out from the infected cells. The medium with free-swimming parasites was then collected in 15 mL sterile conical tubes and centrifuged at 2700 rpm for 7 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 mL of DMEM (Gibco Laboratories, USA). Parasites were counted using a hemocytometer, and the number of parasites was adjusted to the specific needs of each assay (*in vitro* or *in vivo*).



### Astaxanthin preparation for *in vitro* assays

In order to purify astaxanthin from the commercial preparation for the *in vitro* assay, one gram of microencapsulated astaxanthin (AstaPure<sup>®</sup>, Algatechnologies, Israel) was ground in a sterile mortar, placed in a 15 mL sterile conical tube, and suspended in 6 mL of extraction solution (petroleum ether:acetone:water, [15:75:10]) [33]. The suspension was mixed by inversion several times and gently vortexed for 15 min. The tube was centrifuged at 7500 rpm for 10 min at 4 °C, and the supernatant collected in a fresh sterile 15 mL tube. The solvents were evaporated at 40 °C for 12 h in dark conditions and the astaxanthin was resuspended in 2 mL of DMEM-dimethyl sulfoxide (DMSO [Sigma-Aldrich, USA]) (99.7/0.3% V/V solution). This suspension was gently vortexed for 10 min, and then filtered using an acrodisc syringe filter (0.22 µm) in a 1.5 mL sterile tube and kept at 4 °C until use. The ASTX concentration was determined in a 96-well plate using a β-carotene (Sigma-Aldrich, USA) standard curve and read at 450 nm in a spectrophotometer (BioTek, USA). A simple linear regression was used to determine ASTX concentrations in µg/µL.

### Astaxanthin *in vitro* toxicity assay for *T. cruzi* and Vero cells

Trypomastigotes ( $5 \times 10^5$ /well) or Vero cells ( $2 \times 10^4$ /well) were cultured in a 96-well plate (Sarstedt, USA) in supplemented DMEM (2% FBS, penicillin 10,000 units/mL, and streptomycin 10,000 µg/mL) and astaxanthin at 1, 5, 10, 20, or 30 µg/100 µL. The assay was performed in triplicate with the following controls: a) C-T (untreated trypomastigotes), b) C-V (untreated Vero cells), c) DMEM/DMSO in a proportion equivalent to the amount of DMSO used in the highest ASTX dose (99.7/0.33% V/V, respectively) (this control was necessary since ASTX and NFMX were solubilized in this solvent), and d) nifurtimox (400 µg/100 µL) (Lampit<sup>®</sup>, Bayer). NFMX was prepared as previously described by Rolón et al. [43]. One tablet of the commercial presentation of NFMX (120 mg) was ground in a sterile mortar and resuspended in 1 mL of DMSO. The final DMSO concentration in the culture media never exceeded 0.3% in a V/V solution. Plates were incubated for 24 h in controlled conditions (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, and saturated humidity). After treatment, the viability of parasites and cells was estimated using MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt) from CellTiter 96 kit<sup>®</sup> Aqueous One Solution (Promega, USA), following the manufacturer's instructions. The metabolic activity of parasites and cells over MTS was estimated by colorimetry at 490 nm wavelength. In this assay, the higher the optical density (OD) values, the higher the cell viability.

### Morphologic evaluation of changes induced by ASTX on Vero cells and *T. cruzi* co-cultures

Vero cells ( $5 \times 10^3$ /well) were seeded and cultured for 24 h as previously described and then infected with trypomastigotes

(10 parasites/cell) [13]. Once intracellular parasites were observed (about 96 h after infection), the old medium was replaced with fresh supplemented DMEM with different ASTX doses (1, 5, 10, 20, or 30 µg/100 µL). As a control, co-cultures were kept with NFMX (400 µg/100 µL) or with no ASTX or NFMX supplementation. After 24 h of incubation, microscopic morphological changes in the co-culture, such as loss of normal shape of *T. cruzi* infected Vero cell, changes of normal parasite shape or motility, and variations in the presence of intra- or extra-cellular parasites were evaluated by a trained technician. Additionally, parasite viability was evaluated by Trypan blue stain assay [2].

### Animals and challenge

BALB/c female mice ( $N = 48$ ), 4–6 weeks old, were distributed in eight groups ( $n = 6$ ): G1 (Tc); G2 (Tc/ASTX); G3 (Tc/ASTX/NFMX); G4 (Tc/NFMX) and four non-infected controls: G5 (saline solution); G6 (NFMX); G7 (ASTX/NFMX); and G8 (ASTX). Animals from groups G1 to G4 were infected intraperitoneally with 10 trypomastigotes each. Specimens were clinically evaluated on a daily basis; any animal health changes, such as weight loss, hirsutism, morbidity, lameness, or any other behavioral changes, were recorded. We decided to use ASTX during the acute phase of infection in BALB/c mice because there are no previous reports on the use of antioxidants at this stage of infection and because in *in vitro* experiments in our laboratory, ASTX had some antiparasitic effect. We also decided to test ASTX as an antiparasitic agent during an early stage of infection in BALB/c mice because this mouse strain is susceptible to infection with *Ninoa* strain of *T. cruzi* with a predictable outcome and the parasitemia is easily detected. Therefore, during the acute phase of infection, the level of parasitemia was used as an indicator of disease development [15], providing an easy-to-evaluate parameter, to determine the possible effects of ASTX on the infection while animals were alive.

### Parasitemia

Parasitemia was analyzed for each mouse, by fresh blood smear test. Samples were collected twice a week starting on day 5, until day 60 post-infection, or when parasitemia was undetectable microscopically in fresh blood preparations. Sampling was performed according to Brener [7] with slight modifications. Briefly, a small cut was performed on the tip of the tail of the mouse, blood (4 µL) was collected with a micropipette, placed on a glass slide, and covered with a coverslip (18 × 18 mm). Samples were observed under light microscopy at 400x. Parasites in 100 fields were counted, and the number of parasites/µL was estimated with standard protocols [28, 45].

### ASTX supplementation and NFMX treatments for *in vivo* assays

From day 12 onwards, ASTX and/or NFMX (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) were administered according to the animals' treatment

**Table 1.** Description of treatments used in *in vivo* experiments.

Mice groups (n = 6)	<i>T. cruzi</i> Ninoa strain (Infection dose)	Astaxanthin dose (mg/kg/day)	Nifurtimox dose (mg/kg/day)
G1 (Tc)	10 parasites		
G2 (Tc/ASTX)	10 parasites	10	
G3 (Tc/ASTX/NFMX)	10 parasites	10	100
G4 (Tc/NFMX)	10 parasites		100
G5 (saline solution)			
G6 (NFMX)			100
G7 (AST/NFMX)		10	100
G8 (ASTX)		10	

Tc: Challenge with *T. cruzi* (positive control); ASTX: Astaxanthin; NFMX: Nifurtimox; G5–G8 (controls). Six BALB/c mice were used per group.

group (Table 1). ASTX was prepared from 400 mg beadlets of AstaPure®. Beadlets were ground in a sterile mortar in aseptic conditions and resuspended and homogenized in 3 mL of a 20% (V/V) sterile solution of Tween-20/distilled water [36] for a final volume of 3.1 mL. ASTX supplementation (60 µL of ASTX preparation, equivalent to 10 mg/kg/day of pure ASTX) was orally administered with a micropipette until day 60 post-infection. This concentration has exhibited immunomodulatory and anti-inflammatory effects in mice and other species, including humans [24, 27, 34, 40]. NFMX was prepared in aseptic conditions by grinding one tablet containing 120 mg of NFMX (Lampit®, Bayer) in a mortar and resuspending it in 1 mL of sterile distilled water [11]. This solution was administered orally at a single daily dose of 100 mg/kg/day [8] (Table 1) in a 60 µL volume. Treatment was carried out until the day when parasitemia could no longer be detected through fresh blood preparations, as described above [6, 28, 45].

#### Animal sacrifice and tissue sampling

Heart and spleen tissues were collected from mice after they died from infection or when they were euthanized. Mice were sacrificed either because they were very ill or on day 60 after infection. Euthanasia was performed by cervical dislocation following protocols established by *Norma Oficial Mexicana* (NOM-033-ZOO-1999) [38], the Bioethics Committee from UAEM-FMVZ, and from the Council for International Organizations of Medical Sciences [35]. Blood samples were taken directly from the heart to obtain sera on the day of sacrifice and tissues were fixed in 10% formaldehyde for histopathological studies.

#### Histopathological study

Tissues were fixed in 10% formaldehyde for 24 h, dehydrated in absolute ethanol, and included in paraffin. Tissue sections (5 µm) were prepared and stained with hematoxylin-eosin and observed under light microscope (Carl Zeiss Axiostar, USA). Images were recorded with a Tucsen 5 MP camera (Tucsen, China) with the Image-Pro Plus 7 software. Tissue samples were studied microscopically at 400× magnification to assess parasite burden (amastigote nests observed in 100 random fields). The severity of inflammation was estimated by the severity of lymphocyte infiltration in the

tissue, in 400 random fields, using the scale proposed by Barbabosa-Pliego et al. [5]: (–), none; (+), light; (++) , moderate; and (+++) , severe.

#### Malondialdehyde (MDA) assay

Malondialdehyde levels were determined in sera following the instructions of an OxiSelect™ MDA Adduct ELISA Kit (Cell Biolabs, USA). Standards and samples were incubated in a 96-well plate for 2 h, at 37 °C. The MDA-protein adducts present in the sample and in the standards were probed with an anti-MDA antibody followed by the HRP-conjugated secondary antibody, revealed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and read by spectrophotometry at 450 nm. The MDA-protein adducts content in each sample was determined by comparison with a standard curve that was prepared from predetermined MDA-BSA standard [16]. A simple linear regression was used to determine the MDA concentration in pmol/mL.

#### Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to analyze results from the *in vitro* viability assay, parasitemia, and MDA. Mean differences for all assays were assessed by a Tukey test, except for parasitemia where a Bartlett's test was used. Statistical analyses were conducted with the GraphPad Prism 5.0 software package (GraphPad Software Inc., USA). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

#### *In vitro* Trypanosoma cruzi and Vero cell viability after exposure to ASTX

Trypomastigote and Vero cell viability was evaluated 24 h after treatment. Figure 1 shows parasite and Vero cell survival after treatment, either with ASTX (1, 5, 10, 20, or 30 µg/100 µL), NFMX (400 µg/100 µL), DMSO (0.33% V/V), or untreated (C-). Parasite viability was progressively affected ( $p < 0.05$ ) as ASTX doses were increased; from nearly 100% parasite survival (with no ASTX) down to 18% survival at the higher doses (20–30 µg/100 µL) of ASTX. Vero cell



viability was only significantly compromised at 20 and 30  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  ASXT doses ( $p < 0.05$ ). NFMX affected parasite viability ( $p < 0.05$ ) at a 400  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  dose and did not compromise Vero cell survival. No apparent viability of parasites or Vero cells was affected after the use of DMSO (0.3% V/V).

Parasites were not affected by ASTX (1–20  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ) when evaluated in co-culture with Vero cells, unlike the results observed in axenic culture (Table 2). These results call into question whether the effects of ASTX would be detrimental or not to the parasite in an *in vivo* model, and therefore we decided to continue testing ASTX as a therapeutic treatment in an experimental animal model.

### Parasitemia in BALB/c mice infected with *T. cruzi*

Experimental groups showed differences in the number of blood trypomastigotes (Fig. 2). Challenged groups G1 (Tc) and G2 (Tc/ASTX) showed the highest parasitemia and did not survive beyond day 23 post-infection. It is worth mentioning that ASTX supplementation on its own, in infected animals, did not show any survival advantage over the control group. Challenged groups G3 and G4, treated with ASTX/NFMX or just NFMX, respectively, developed low levels of parasitemia. This was controlled by days 28 and 22 post-infection, respectively (Figs. 2A and 2B). Parasitemia levels in groups G3 ( $33 \pm 12.7$  parasites/ $\mu\text{L}$ ) and G4 ( $10 \pm 5$  parasites/ $\mu\text{L}$ ) were statistically different ( $p < 0.05$ ) from those found in animals in groups G1 ( $321 \pm 138.2$  parasites/ $\mu\text{L}$ ) and G2 ( $362 \pm 156.2$  parasites/ $\mu\text{L}$ ) around day 20 post-infection. All non-infected animals were in good health until the day of sacrifice (day 60 post-infection).

### Anatomopathologic findings

#### Heart

The size of the heart in all experimental groups (G1–G8) did not show differences. Hearts were measured in sagittal position and average length was  $0.79 \pm 0.036$  cm. No apparent morphological changes were found macroscopically.

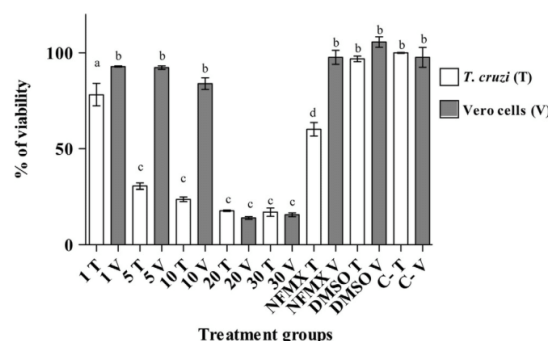
#### Spleen

Spleens were clearly enlarged in all *T. cruzi*-challenged groups (G1–G4), where splenomegaly was observed (Fig. 3). The average size of the spleen was  $2.4 \pm 0.26$  cm for animals from groups G1 (Tc) and G2 (Tc/ASTX), and  $2 \pm 0.17$  and  $1.8 \pm 0.26$  cm in groups G3 and G4, respectively. All control groups (G6–G8) had an average spleen size of  $1.5 \pm 0.08$  cm, similar in size and appearance to mice treated with saline solution (G5), which was considered normal.

### Histopathologic findings

#### Heart

Left ventricle sections displayed differences among treatment groups. Group G1 (*T. cruzi*) had the largest number



**Figure 1.** *Trypanosoma cruzi* trypomastigote and Vero cell survival after treatment with five different doses of astaxanthin (ASTX, 1, 5, 10, 20, or 30  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ). Nifurtimox (NFMX, 400  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ), dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.03%), or no treatment was used as control for the MTS viability assay. Samples were evaluated after 24 h of treatment. Each bar represents the absorbance mean value  $\pm$  SD. Differences ( $p < 0.05$ ) among groups, according to Tukey's test, are indicated with characters on top of treatment bars.

of amastigote nests ( $n = 35 \pm 3.9$ ), and the myocardium displayed diffuse inflammatory infiltrates, represented mainly by lymphoplasmacytes (Fig. 4A). In G2 (Tc/ASXT) the number of amastigotes ( $n = 24 \pm 3.05$ ) was significantly lower ( $p < 0.05$ ), but these animals had increased local inflammation and a higher number of necrotic cardiomyocytes (Fig. 4B). The G3 and G4 groups showed light focal lymphoplasmacytes infiltrate and necrotic cardiomyocytes, with no amastigote nests present. Non-infected control groups (G5–G8) were normal (Figs. 4C and 4D, Table 3).

#### Spleen

Morphological changes in the spleen were observed mainly as hyperplasia of lymphoid follicles and loss of characteristic shape. The G1 (Tc) group showed very diffuse and extended follicles with severe hyperplasia of lymphoid follicles (Fig. 5A). In animals from the G2 group (Tc/ASTX supplementation), slight hyperplasia of lymphoid follicles was observed (Fig. 5B). In groups G3 (Tc/ASTX/NFMX) and G4 (Tc/NFMX), as well as in control groups (G5–G8), lymphoid follicles appeared normal, with no pathological changes (Figs. 5C and 5D).

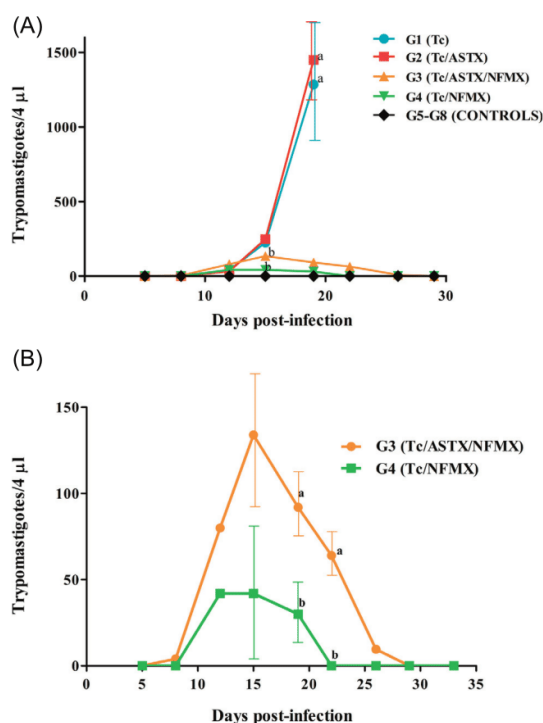
### Malondialdehyde (MDA) test

It is important to note that groups G1 (Tc) and G2 (Tc/ASTX) were not incorporated in the assay because these animals did not survive the acute phase of the disease, and blood samples could not be collected. From the remaining groups, the highest levels of MDA in sera were found in animals from groups G3 (Tc/ASTX/NFMX) and G4 (Tc/NFMX) with  $18.5 \pm 2.8$  pmol/mL and  $22.2 \pm 1.7$  pmol/mL, respectively. Control groups, G5 (saline solution), G6 (NFMX),

**Table 2.** Effects of ASTX in *T. cruzi* infected Vero cell culture (24 h post-treatment).

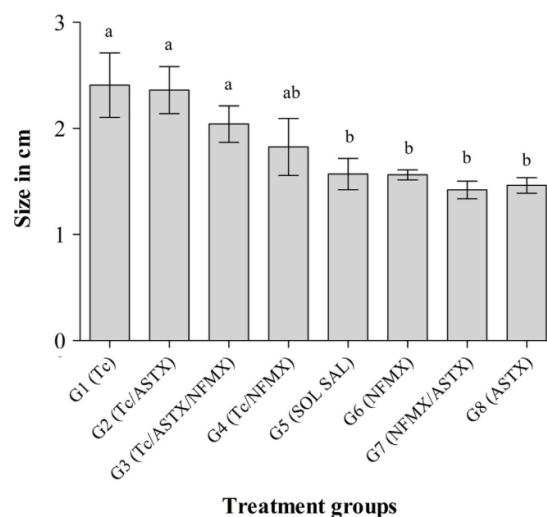
ASTX or NFMX doses	1 µg		5 µg		10 µg		20 µg		30 µg		NFMX 400 µg	
	Tc	Vc	Tc	Vc	Tc	Vc	Tc	Vc	Tc	Vc	Tc	Vc
IP	+		+		+		+		–		–	
EP	+		+		+		+		–		–	
Motility	+		+		+		+		–		–	
Viability	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–		+
Loss of cellular form	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+		+
Integrity of the cell membrane	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–		+

ASTX dose (astaxanthin, 1–40 µg); NFMX (nifurtimox 400 µg); IP (intracellular parasite); EP (extracellular parasite); + (presence); – (absence); Tc (*Trypanosoma cruzi*); Vc (Vero cell). Integrity of the cell membrane was evaluated through Trypan Blue assay [28, 45].



**Figure 2.** (A): Blood parasitemia observed in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi* (Tc) and treated with astaxanthin (ASTX) and/or nifurtimox (NFMX). Controls included infected animals with no treatment at all (G1), or animals treated with ASTX and/or NFMX without *T. cruzi* infection (G5–G8). Blood samples (4 µL) were collected and microscopically analyzed every other day from days 5 to 30 post-infection. Mean number of parasites ± SD. (B): Detail of parasitemia for groups G3 (Tc/ASTX/NFMX) and G4 (Tc/NFMX). Different characters above lines show statistical differences ( $p < 0.05$ ) among treatments within the same day of sampling according to Tukey's test.

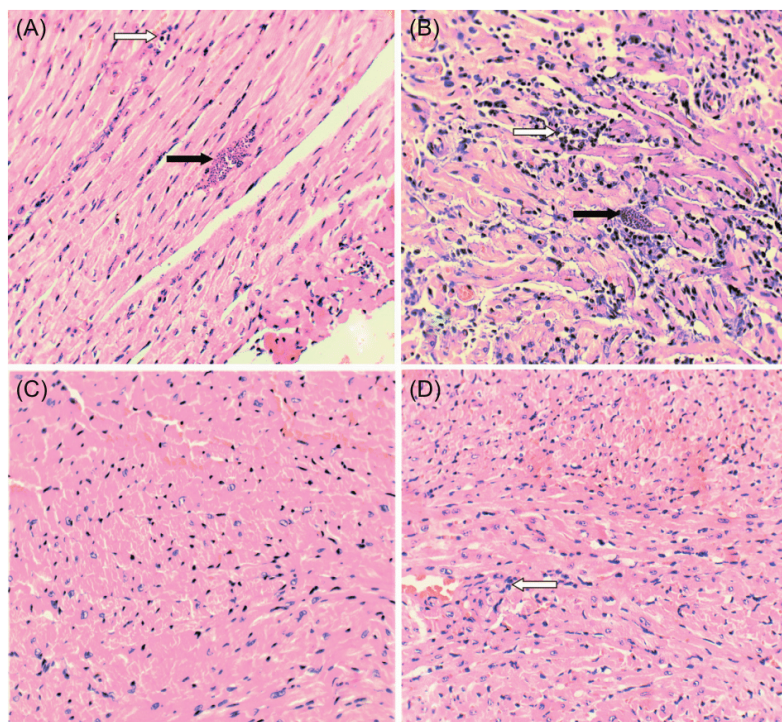
G7 (NFMX/ASTX), and G8 (ASTX), showed  $6.3 \pm 1.7$ ,  $6.8 \pm 0.5$ ,  $8.7 \pm 2.2$ , and  $8.9 \pm 2$  pmol/mL of MDA, respectively, while the basal levels (mouse sera without manipulation and treatment) were  $4.0 \pm 0.4$  pmol/mL (Fig. 6).



**Figure 3.** Spleen size of animals experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Spleens were collected immediately after the animal died due to infection or on the day of sacrifice (60 days post-infection). Each bar represents the mean size value ± SD. Statistical differences ( $p < 0.05$ ) among groups are shown with different characters above the bars according to Tukey's test.

## Discussion

Several *in vitro* research studies have reported that the antioxidants found in some plants might have a detrimental effect on the viability of different parasites [1, 19] including Trypanosomatids [29, 32, 48, 49]. In our laboratory, initial *in vitro* results showed that ASTX induced *T. cruzi* trypomastigote death in a dose-dependent manner (Fig. 1). Therefore, we wanted to address the question of whether ASTX would be able to control an *in vivo* *T. cruzi* infection using a mouse model. Results did not support our hypothesis, since ASTX did not control *in vivo* parasitemia loads (Fig. 2A), and the infected animals treated only with the antioxidant (G2) died during the acute phase of infection, as occurred with infected animals with no treatment (G1 group). Furthermore, ASTX seemed to interfere with the efficacy of NFMX against



**Figure 4.** Histological analysis of heart tissue sections from acutely *Trypanosoma cruzi* infected mice, treated with astaxanthin and/or nifurtimox. Heart tissue sections from the left ventricle were processed on the day animals died (either due to infection or when euthanized on day 60 post-infection). Tissue sections (5  $\mu$ m) were stained with hematoxylin-eosin. Representative micrographs are shown for mice from the following groups: (A) G1 (Tc); (B) G2 (Tc/ASTX); (C) G5 (saline solution); (D) G8 (ASTX). The micrograph from G5 could represent all groups from G3 to G7; all of them were considered histologically normal. Black arrow, amastigote nests; white arrow, lymphoplasmacytic infiltrate. (400 $\times$  amplification).

**Table 3.** Myocardial histopathological abnormalities found in mice during the acute phase of *T. cruzi* experimental infection (60 days post-infection)

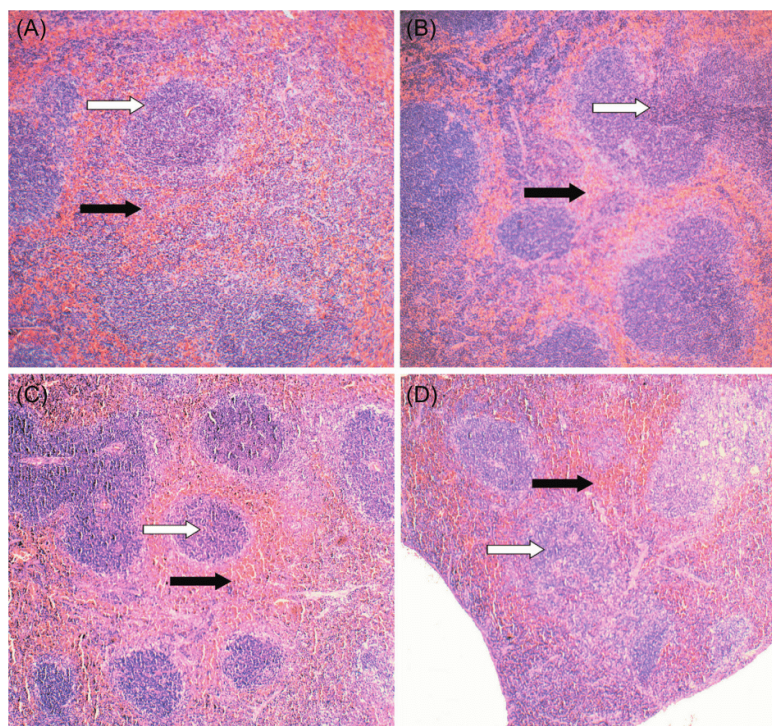
Parameters/group	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Focal lymphoplasmacytes	-	++	+	+	-	-	-	-
Diffuse lymphoplasmacytes	+	-	-	-	-	-	-	-
Cardiomyocyte necrosis	+	++	+	+	-	-	-	-
Amastigote nests (mean $\pm$ SD)	35 $\pm$ (3.9)	24 $\pm$ (3.05)	0	0	0	0	0	0

Treatment groups: G1: *T. cruzi*; G2: *T. cruzi*/ASTX; G3: *T. cruzi*/ASTX/NFMX; G4: *T. cruzi*/NFMX; G5: saline solution; G6: NFMX; G7: ASTX/NFMX; G8: ASTX. Abnormality scale: -, none; +, light; ++, moderate; and +++, severe [5];  $\pm$ : standard deviation.

the parasites *in vivo*, since parasitemias observed in animals from group G3 (Tc/ASTX/NFMX) were significantly higher ( $p < 0.05$ ) and longer ( $p < 0.05$ ), than parasitemias found in infected animals from group G4 treated only with NFMX (Fig. 2B). Therefore, also considering the results reported by Wen et al. [51], who found that PBN (phenyl- $\alpha$ -tert-butyl-nitrene), a synthetic antioxidant, used in Sprague Dawley rats infected with *T. cruzi*, did not decrease parasite load during the acute phase of infection, it could be concluded that the use of antioxidants is not indicated during this phase of

Chagas disease. However, strong antioxidants, such as ASTX, could still be useful during the chronic phase of Chagas disease. This idea is supported by the findings of Maçao et al. [30] and Ribeiro et al. [42], who found that supplementation with vitamins E and C after the use of benznidazole for the treatment of Chagas disease in humans reduced oxidative stress, and contributed to minimizing the risk of chagasic cardiomyopathy in chronically infected patients. If we consider that ASTX is a stronger antioxidant than vitamins E and C, and additionally that it has anti-inflammatory and





**Figure 5.** Histological analysis of spleen tissue sections in acutely *Trypanosoma cruzi* infected mice, treated with astaxanthin and/or nifurtimox. Spleen tissue sections (5  $\mu$ m) were obtained at 60 days post-infection or at the time the animals died due to infection, and stained with hematoxylin-eosin. Representative micrographs of mice (BALB/c) from the following groups are shown: (A) G1 (Tc); (B) G2 (Tc/ASTX); (C) G5 (saline solution); (D) G8 (ASTX). The micrograph from G5 could represent all groups from G3 to G7; all of them were considered histologically normal. White arrow: lymphoid follicles; Black arrow: red pulp.

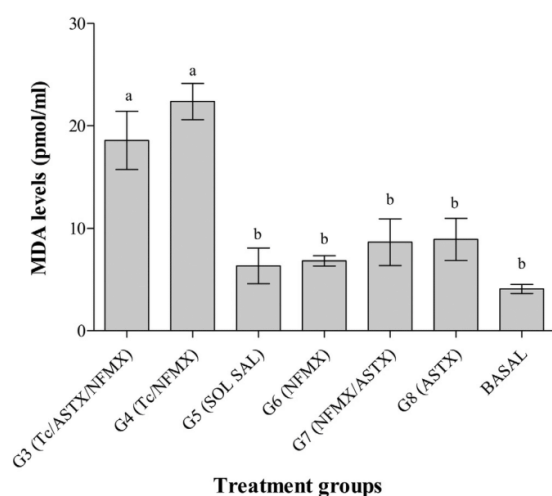
immunomodulatory properties [17, 34, 40], the question that remains to be answered is whether ASTX supplementation, after the administration of anti-chagasic agents such as benznidazole or nifurtimox during the chronic phase of Chagas disease, would be beneficial to improve chronic chagasic cardiomyopathy.

When comparing the histopathological appearance of the left ventricle from animals in groups G1 (Tc) and G2 (Tc/ASTX), it was observed that G2 animals had an increment in the number of focal lymphoplasmacytic infiltrations and necrotic cardiomyocytes, and a lower number of amastigote nests (Figs. 4A, 4B and Table 3). These differences suggest that ASTX had an immunomodulatory effect, which would promote the strong immune reaction observed, accompanied by a lower number of amastigote nests in cardiac tissue. It has been reported that the immunomodulatory properties of ASTX include the stimulated proliferation of T and B lymphocytes and NK cells, production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ , as well as promoting an increment in antibody production against various antigens [4, 12, 39, 40]. Therefore, it would be interesting to further study whether ASTX could be used as a therapeutic drug in Chagas disease, either in combination with an anti-*T. cruzi* non-oxidative stress-inducing drug or in

combination with antiparasitic (prophylactic or therapeutic) vaccines.

Splenomegaly has been reported in animals and humans infected with *T. cruzi*. This reaction is related to host inflammatory responses to the parasitic infection [41], and reactive oxygen species (ROS) generated by neutrophils and macrophages in the spleen [3, 4, 44], which induce the expression of inflammatory genes that contribute to inflammation [26]. In the present study, animals from non-infected groups had an average spleen size of 1.5 cm with normal histology. In comparison, animals from all infected groups (G1–G4) showed splenomegaly. The average spleen size for groups G1 (Tc) and G2 (Tc/ASTX) (Fig. 3) was 2.3 cm, i.e. 53% larger in comparison with the non-infected control groups. These spleens displayed hyperplastic lymphoid follicles (Fig. 5A). Animals from group G3 (Tc/ASTX/NFMX) and G4 (Tc/NFMX) showed 33% (2.1 cm) and 20% (1.8 cm) larger spleens than normal animals, respectively (Fig. 3). This inflammatory response could be partially explained by the fact that, before infection was controlled by NFMX, there was a period when parasites proliferated in the animals and inflammation was triggered.

Oxidative stress is one of the main features of the immune system that is triggered during the development of chagasic



**Figure 6.** Malondialdehyde serum levels in animals after experimental *Trypanosoma cruzi* infection under treatments G3–G8 at the day of sacrifice (60 days post-infection). Each bar represents the mean pmol/mL value  $\pm$  SD. Statistical differences ( $p < 0.05$ ) among groups are shown with different characters above the bars. Groups G1 and G2 were not included because the mice died before day 30 post-infection.

cardiomyopathy [20]. Oxidative stress induced by *T. cruzi* infection in the myocardium can be studied through markers such as MDA [16]. Our results showed statistical differences between serum MDA from infected (G3 and G4 groups) and non-infected animals (G5–G8 groups) (Fig. 6). However, unlike what was expected, no differences were observed in non-infected animals among groups receiving NFMX, ASTX/NFMX, and ASTX or saline solution. This outcome is difficult to explain as NFMX was expected to increase MDA values and ASTX to reduce them. A possible explanation could be that the MDA assay used to detect OS was not sensitive enough to identify small differences, and that the effects of NFMX and ASTX on mouse physiology were not large enough to be detected. *T. cruzi* infection did induce OS and was detected by the MDA assay. However, no statistical differences were observed between serum MDA levels from groups G3 and G4. We had hypothesized that animals receiving ASTX would have lower levels of OS [17], but this could not be proven. This outcome could probably also be explained if we assume that the doses of ASTX used in this experiment were not sufficiently high to promote an antioxidant effect detectable by the MDA assay. As a whole, the findings of the present study do not support the idea that ASTX has a positive effect during an acute *T. cruzi* infection and the question that remains to be answered is whether ASTX could be used in chronic Chagas infections to possibly improve the results observed with other antioxidants, such as vitamins E and C or synthetic antioxidants such as PNB, in chronically infected chagasic human patients [30] and rats [51], considering that ASTX is a more active antioxidant than those previously described [21].

## Conclusions

The use of ASTX during the acute phase of *T. cruzi* infection is not recommended, whether alone or in combination with therapeutic drugs that induce oxidative stress, such as NFMX. However, the potential beneficial effects of ASTX if used in the chronic phase of Chagas disease, or in combination with non-OS-inducing antiparasitic drugs, or with prophylactic or therapeutic vaccines, remain to be studied.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

**Acknowledgements.** The authors thank Universidad Autónoma del Estado de México (Grant No. 3326/2012) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for financial support (Grant No. 156701). They also thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the scholarship granted to Contreras-Ortiz who carried out the experimental work in this research (Scholarship No. 252794) and Gerald R. Cysewsky, Ph.D. Executive Vice President of Cyanotech for the kind donation of the AstaPure® necessary for this study.

## References

1. Abdel-Mageed WM, Backheet EY, Khalifa AA, Ibraheim ZZ, Ross SA. 2012. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia*, 83, 500–507.
2. Acosta-Viana YK, Huchin-Cetz J, Jimenez-Coello M, Guzman-Marin E, Rosales-Encina JL. 2013. Antibody delivery into viable epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* as a tool to study the parasite biology. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 719–726.
3. Antúnez MI, Cardoni RL. 2000. IL-12 and IFN- $\gamma$  production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunology Letters*, 71, 103–109.
4. Aw TY. 1999. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 557–565.
5. Barbabosa-Pliego A, Díaz-Albiter HM, Ochoa-García L, Aparicio-Burgos E, López-Heydeck SM, Velásquez-Ordoñez V. 2009. *Trypanosoma cruzi* circulating in the southern region of the State of Mexico (Zumpahuacán) are pathogenic: a dog model. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 390–395.
6. Bonney KM, Engman DM. 2008. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Current Molecular Medicine*, 8, 510–518.
7. Brener Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4, 389–396.
8. Cabeza MP, Chambo JG, Laguens JG. 1988. Differences in resistance to reinfection with low and high inocula of *Trypanosoma cruzi* in chagasic mice treated with nifurtimox and relation to immune response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 241–245.
9. Camandaroba EL, Reis EA, Goncalves MS, Reis MG, Andrade SG. 2003. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 201–209.



10. Castro JA. 2000. Contribution of Toxicology to the problem of Chagas disease (American Trypanosomiasis). A year 2000 update. Biomedical and Environmental Sciences, 13, 271–279.
11. Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. 2012. Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or Am Bisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. International Journal of Antimicrobial Agents, 40, 527–532.
12. Chew BP, Mathison BD, Hayek MG, Massimino S, Reinhart GA, Park JS. 2011. Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs. Veterinary Immunology and Immunopathology, 140, 199–206.
13. Curty LG, Borges JC, Magalhaes CC, Pinheiro de Araújo H, Araujo ZA, Braga do Nascimento S, Machado MC, Rolim-Bernardino AM, De Souza Pereira MC, Cabral BS. 2016. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 6, 154–164.
14. Dhiman M, Coronado YA, Vallejo CK, Petersen JR, Ejilemele A, Nuñez S, Zago MP, Spratt H, Garg NJ. 2013. Innate immune responses and antioxidant/oxidant imbalance are major determinants of Human Chagas disease. PLoS Neglected Tropical Diseases, 7(8), e2364.
15. Diaz-Limay E, Escalante H, Jara AC. 2004. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad – Perú. Parasitología Latinoamericana, 9, 153–158.
16. Ditrich R, Schibel A, Hoffman I, Mueller A, Beckman M, Cupisti S. 2012. Influence of maternal smoking during pregnancy on oxidant status in amniotic fluid. In Vivo, 26, 813–818.
17. Fassett GR, Coombes JS. 2012. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. Molecules, 17, 2030–2048.
18. Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, Terada H. 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid Astaxanthin. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, 1512(2), 251–258.
19. Graziöse R, Rojas-Silva P, Rathinasabapathy T, Dekock C, Grace MH, Poulev A, Lila MA, Smith P, Raskin I. 2012. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. Journal of Ethnopharmacology, 142, 456–461.
20. Gupta S, Jian-Jun W, Nisha JG. 2009. Oxidative stress in Chagas Disease. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2009, 1–8.
21. Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. Journal of Natural Products, 69, 443–449.
22. Iwabayashi M, Fujioka N, Keitaro N, Ryo M, Takahashi H, Hibino S, Takahashi Y, Nishikawa K, Nishida M, Yonei Y. 2009. Efficacy and safety of eight-week treatment with astaxanthin in individuals screened for increased oxidative stress burden. Anti-Aging Medicine, 6(4), 15–21.
23. James TN, Rossi MA, Yamamoto S. 2005. Postmortem studies of the intertruncal plexus and cardiac conduction system from patients with Chagas disease who died suddenly. Progress in Cardiovascular Diseases, 47, 258–275.
24. Kavitha K, Kowshik J, Kiran KK, Basit BB, Nagini S. 2013. Astaxanthin inhibits NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. Biochimica et Biophysica Acta, 1830, 4433–4444.
25. Kim HY, Koh HK, Doo-Sik K. 2010. Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF- $\kappa$ B-mediated signals in activated microglia. International Immunopharmacology, 10, 1560–1572.
26. Kishimoto Y, Tani M, Uto-Kondo H, Iizuka M, Saita E, Sone H, Kurata H, Kondo K. 2010. Astaxanthin suppresses scavenger receptor expression and matrix metalloproteinase activity in macrophages. European Journal of Nutrition, 49(2), 119–126.
27. Kuan-Hung L, Kao-Chang L, Wan-Jung L, Philip-Aloysius T, Thanasekaran J, Joen-Rong S. 2015. Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN- $\gamma$  and IL-2 Secretion in primary cultured lymphocytes *in vitro* and *ex vivo*. International Journal of Molecular Sciences, 17(44), 1–10.
28. Kuhn RE, Vaughn RT, Herbst GA. 1975. The effect of BCG on the course of experimental Chagas' disease in mice. International Journal for Parasitology, 5, 557–560.
29. Leite J, Oliveira A, Lombardi J, Filho J, Chiari E. 2006. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29, 2307–2309.
30. Mação BL, Wilhelm FD, Coury PR, Pereira A, Backes P, Aloisio TM, Silva FT. 2007. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. International Journal of Cardiology, 123, 43–49.
31. Manning-Cela R, Cortes A, Gonzales-Rey E, Wesley CV, Swindle J, Gonzales A. 2001. LYT1 protein is required for efficient *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity, 73(11), 7356–7365.
32. Maya J, Cassels B, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N. 2006. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comparative Biochemistry and Physiology, 146, 601–620.
33. Meyers PS, Bligh D. 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 29(3), 505–508.
34. Nakao R, Nelson OL, Park JS, Mathison BD, Thompson PA, Chew BP. 2010. Effect of astaxanthin supplementation on inflammation and cardiac function in BALB/c mice. Anticancer Research, 30, 2721–2726.
35. National Academic of Science. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edn.. National Academic Press: Washington DC.
36. Navideh A, Chin PT. 2013. Effects of selected polysorbate and sucrose ester emulsifiers on the physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. Molecules, 18, 768–777.
37. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1995. 1995. Especificaciones y característica zoosanitarias para el transporte de animales, sus productos y subproductos, productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Mexico City, Mexico: Diario Oficial de la Federación. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4883147&fecha=16/10/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883147&fecha=16/10/1995)
38. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Mexico City, Mexico: Diario Oficial de la Federación. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>.

39. Okai Y, Higashi-Okai K. 1996. Possible immunomodulating activities of carotenoids in *in vitro* cell culture experiments. *International Journal of Immunopharmacology*, 18, 753–758.
40. Park JS, Chyun JH, Kim YK, Line LL, Chew BP. 2010. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & Metabolism*, 7(18), 1–10.
41. Pereira AL, Rocha-Rodriguez D, Costa Da Cunha E, Dos-Reis MA, Antúnez V. 2002. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 401–403.
42. Ribeiro MC, Coury PR, Sinfroni FM, Bennedetti PE, Monguillhott DE, Silva FT, Oliveira-Silva D, Colepicolo P, Wilhelm FD. 2010. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benznidazole in chronic Chagas heart disease. *International Journal of Cardiology*, 145, 27–33.
43. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. 2006. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 99, 103–107.
44. Rose S, Misharin A, Perlman H. 2012. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry A*, 81(4), 343–350.
45. Rowland CE, Sibley-Phillips S. 1984. Bone marrow eosinophil levels in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Journal of Parasitology*, 70(5), 819–820.
46. Silveira AC, Dias JC. 2011. The control of vectorial transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 52–63.
47. Silveira AC. 2011. New challenges and the future of control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 122–124.
48. Uchiyama N, Kabututu Z, Kubata B, Kiuchi F, Ito M, Nakajima-Shimada J. 2005. Antichagasic activity of komaroviquinone is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12), 5123–5126.
49. Ukachi EI, Igoli JO, Onyiriuka SO, Ejele AE, Ojukwe CE, Ayuk AA, Elemo GN, Gray AI. 2015. Antitrypanosomal and antioxidant activities of *Moringa oleifera* lam leaf extracts. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3(1), 17–23.
50. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Álvarez M, Petti M, Bertochi G. 2009. Side effects of benznidazole as treatment of Chagas disease: fears and realities. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 14(7), 157–163.
51. Wen JJ, Gupta S, Guan Z, Dhiman M, Condon D, Lui C, Garg NJ. 2010. Phenyl- $\alpha$ -tert-butyl-nitron and benznidazole treatment controlled the mitochondrial oxidative stress and evolution of cardiomyopathy in chronic chagasic rats. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(22), 2499–2508.
52. WHO. 2017. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
53. Zacks MA, Wen JJ, Vyatkina G, Bhatia V, Garg N. 2005. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 77(4), 695–715.

**Cite this article as:** Contreras-Ortiz JME, Barbabosa-Pliego A, Oros-Pantoja R, Aparicio-Burgos JE, Zepeda-Escobar JA, Hassan-Moustafa WH, Ochoa-García L, Alonso-Fresan MU, Tenorio Borroto E & Vázquez-Chagoyán JC: Effects of astaxanthin in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite*, 2017, 24, 17.



An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

**Parasite** (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:  
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at  
<http://parasite.edmgr.com/>

## 10.2 Segundo artículo enviado

• Manuscript submitted to Parasitology - PAR-2017-0274

Yahoo★

**Parasitology** <onbehalf+parasitology+cambridge.org@manuscriptcentral.com>

Hoy a las 1:21

Para chema\_coco12@yahoo.com.mx

01-Jul-2017

Dear Professor/Dr Contreras-Ortiz:

A manuscript titled Astaxanthin supplementation has no beneficial effects during the acute phase of infection with *T. cruzi* in BALB/C mice that had been previously immunized with TcVac1M (PAR-2017-0274) has been submitted by Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán to Parasitology.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/par>

USER ID: [chema\\_coco12@yahoo.com.mx](mailto:chema_coco12@yahoo.com.mx)

PASSWORD: [https://mc.manuscriptcentral.com/par?URL\\_MASK=1b50c3858e9a46418f7ecd869ffb4f33](https://mc.manuscriptcentral.com/par?URL_MASK=1b50c3858e9a46418f7ecd869ffb4f33)

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. This password is case-sensitive and temporary. Please log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/par> to update your account information and change your password.

Thank you for your participation.

Sincerely,  
Parasitology Editorial Office

### Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

**Submitted to**  
Parasitology

**Manuscript ID**  
PAR-2017-0274

**Title**  
Astaxanthin supplementation has no beneficial effects during the acute phase of infection with *T. cruzi* in BALB/C mice that had been previously immunized with TcVac1M

**Authors**  
Contreras-Ortiz, José María Eloy  
Barbosa-Pliego, Alberto  
Oros-Pantoja, Rigoberto  
Aparicio-Burgos, José Esteban  
Zepeda-Escobar, José Antonio  
Hassan-moustafa, Wael Hegazy  
Ochoa-García, Laucel  
Garg, Nisha  
Rivas-Santiago, Bruno  
Vázquez Chagoyán, Juan Carlos

**Date Submitted**  
01-Jul-2017



## Resumen

No existe vacuna disponible contra la enfermedad de Chagas y los tratamientos actuales basados en los fármacos Nifurtimox y Benznidazol no son completamente efectivos. La OMS reporta 8 millones de personas infectadas en el mundo, 25 millones más están en riesgo de contraer la infección y hay reportes de 50,000 nuevos casos y 10,000 muertes por la enfermedad cada año. En este estudio, los efectos de la inmunización con una vacuna recombinante TcVac1M y la suplementación con ASTX fueron evaluados en una infección aguda con *T. cruzi* en modelo murino, como nueva estrategia para tratar la enfermedad de Chagas. Para ello, ratones BALB/c de 4-6 semanas de edad, fueron inmunizados con 10 µg de TcVac1M por electroporación intradérmica como vacuna profiláctica, posteriormente infectados con tripomastigotes y suplementados con 8 mg/kg/día de Astaxantina. Los resultados muestran que la suplementación con Astaxantina en ratones vacunados, no controló la carga parasitaria, ni mejoró el porcentaje de supervivencia de los ratones infectados, comparado con el grupo vacunado/no suplementado. A nivel histológico, se observó que el grupo suplementado/vacunado indujo moderado infiltrado linfo-plasmocítico difuso y focal con registro de nido de amastigotes, el grupo vacunado/no suplementado por su parte, no registro nidos de amastigotes e indujo leve infiltrado linfo-plasmocítico y altos títulos de anticuerpos. Podemos concluir que la vacuna por si sola, tiene una mejor respuesta al aumentar la supervivencia de los ratones y no cuando es empleada la ASTX, por lo que no recomendamos el uso de este antioxidante en fase aguda.

Parasitology



**Astaxanthin supplementation has no beneficial effects during the acute phase of infection with *T. cruzi* in BALB/C mice that had been previously immunized with TcVac1M**

Journal:	<i>Parasitology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Article - Standard
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Contreras-Ortíz, José María Eloy; Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Barbabosa-Pliego, Alberto; Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Oros-Pantoja, Rigoberto; Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina, Facultad de Medicina Aparicio-Burgos, José Esteban; Escuela Superior de Apan de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Escuela Superior de Apan de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Zepeda-Escobar, José Antonio; Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Hassan-moustafa, Wael Hegazy; Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Ochoa-Garcia, Laucel; Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Garg, Nisha; University of Texas Medical Branch at Galveston, Departments of Microbiology & Immunology; and Pathology Rivas-Santiago, Bruno; Unidad de Investigación Médica Zacatecas-IMSS, Unidad de Investigación Médica Zacatecas-IMSS Vázquez Chagoyán, Juan Carlos; Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal
Key Words:	Chagas disease, TcVac, Oxidative stress, Astaxanthin, <i>Trypanosoma cruzi</i>

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Cambridge University Press

1 **Astaxanthin supplementation has no beneficial effects during the acute phase of infection with *T. cruzi***  
2 **in BALB/C mice that had been previously immunized with TcVac1M**

3  
4 José María Eloy Contreras-Ortiz<sup>1</sup>

5 Alberto Barbabosa-Pliego<sup>1</sup>

6 Rigoberto Oros-Pantoja<sup>2</sup>

7 José Esteban Aparicio-Burgos<sup>3</sup>

8 José Antonio Zepeda-Escobar<sup>1</sup>

9 Wael Hegazy Hassan-moustafa<sup>1</sup>

10 Laucel Ochoa-García<sup>1</sup>

11 Nisha Jain Garg<sup>4</sup>

12 Bruno Rivas Santiago<sup>5</sup>

13 Juan Carlos Vázquez-Chagoyán<sup>1\*</sup>

14

15 1- Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y  
16 Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México, Kilómetro 15.5 Carretera Panamericana  
17 Toluca-Atlaconulco, Toluca, Estado de México, C.P. 50200.

18 2- Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Avenida Paseo Tolloca S/N,  
19 Moderna de la Cruz, C.P. 50180, Toluca de Lerdo, Estado de México.

20 3- Escuela Superior de Apan de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carr. Apan Calpulalpan,  
21 Km. 8, Chimalpa, Tlalayote S/N, Colonia Chimalpa, Apan Hidalgo, México.

22 4- Departments of Microbiology & Immunology and Pathology. University of Texas Medical Branch at  
23 Galveston. 301 University Boulevard MRB, Route 1070 Galveston, TX.

24 5- Unidad de Investigación Médica Zacatecas-IMSS. Interior de la Alameda, 45, Centro C. P. 98000,  
25 Zacatecas, Zacatecas, México.

26

27 \* Corresponding author: Juan Carlos Vázquez-Chagoyán

28 E-mail address: jcvch@yahoo.com.mx

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

1 **ABSTRACT**

2  
3 Chagas is a vector transmitted parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*. Vector control has reduced  
4 incidence in endemic areas. WHO estimates, indicate that infection affects about 8 million people in Latin  
5 America and other countries that 25 million people are at risk of infection. Drugs available to control  
6 infection are not completely effective, and cause adverse side effects. No effective vaccines are still available  
7 to prevent infection. Recently, the use of antioxidants has been reported encouraging, during the chronic  
8 phase of Chagas infection, to reduce chronic chagasic cardiomyopathy development. However, there are no  
9 reports about the use of antioxidants during the acute phase of infection. Here, we study the effects of an  
10 antioxidant (astaxanthin, 8 mg/kg/day), on BALB/c mice (4-6 weeks old) previously immunized with  
11 TcVac1M vaccine (10 µg) and infected with *T. cruzi*. Results demonstrated that ASTX supplementation does  
12 not contribute to parasite burden control or host survival. Histologically, vaccinated/infected/supplemented  
13 mice developed higher levels of lymphoplasmacytic infiltrates and amastigotes nests than  
14 vaccinated/infected/non-supplemented animals. In conclusion, TcVac1M vaccine controls *T. cruzi* infection  
15 better, when used alone than when used along with ASTX. It remains to test ASTX during the chronic phase  
16 of the infection.

17  
18 **KEYWORDS**

19  
20 Chagas disease, astaxanthin, TcVac, oxidative stress, *Trypanosoma cruzi*

21  
22 **INTRODUCTION**

23  
24 Chagas disease, caused by a flagellate protozoan called *Trypanosoma cruzi*, is a zoonotic disease transmitted  
25 by blood sucking insects from the *Triatominae* family commonly known as kissing bugs. It has been  
26 estimated that 6-7 million people are infected around the world with this parasite. Nifurtimox (NFMX) and  
27 Benznidazol (BNZ) are the only approved chemicals for treating this infection. However, the efficacy of these  
28 drugs is limited to acute phase of the disease (OMS, 2017), they may cause severe secondary effects after  
29 long term therapy (Viotti *et al.*, 2009) and some parasite resistance has been reported for both substances  
30 (Campos *et al.*, 2009). At present, there are no available effective vaccines, neither for preventive or  
31 therapeutic treatment, however, experimental new generation vaccines based on recombinant DNA, show  
32 stimulation of humoral and cellular immune response that is translated in partial protection against disease,  
33 reducing parasitemia and/or increasing surviving rate of experimentally vaccinated and *T. cruzi* infected mice  
34 and dogs (Cazorla *et al.*, 2008; Salgado-Jiménez *et al.*, 2013; Aparicio-Burgos *et al.*, 2015). Our research  
35 group has previously reported the use of two *T. cruzi* GPI membrane anchored proteins as vaccines, either as  
36 DNA or recombinant proteins. These proteins are antigenic and abundantly expressed on the cellular  
37 membrane of *T. cruzi* trypomastigotes and amastigotes. Both proteins induce specific trypanolytic antibodies  
38 and cytotoxic T cells (Gupta and Garg, 2010, 2013). Despite good advances in the development of new  
39 vaccines, no vaccine has yet produce sterile immunization. Therefore, it is imperative to develop more  
40 effective, either preventive or therapeutic treatments.

41  
42 On the other hand, along with the development of the infection, the patient's heart is subject of constant  
43 oxidative stress (OS). This is caused by the invasion and replication of the parasite in cardiomyocytes and  
44 also due to cytotoxic reactions of the host immune system. These factors are responsible irreversible  
45 cardiomyocyte cell damage, a process that contributes to dilated chagasic cardiomyopathy (DCC), from the  
46 chronic phase of the infection. Along the years, the infection may cause sudden death due to the cardiac  
47 insufficiency derived from the progressive destruction of the cardiac tissue (Wen *et al.*, 2006, 2008; Gupta *et*  
48 *al.*, 2009). Unfortunately, tissue damage is not controlled neither by anti-Chagas drugs or vaccines.

49 Recently it has been shown that therapy with anti-oxidants such as vitamins E or C reduce free radical (FR)  
50 levels and OS associated to Chagas disease (Maçao *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010), protecting the  
51 myocardium and controlling chagasic cardiomyopathy development (Wen *et al.*, 2010). It has also been  
52 shown that over-expression of glutathione peroxidase (GPX) associated with vaccination with TcG2 and  
53 TcG4 antigens in mice infected with *T. cruzi*, reduced the parasitic load, inflammation, OS and controlled  
54 myocarditis and cardiac remodeling caused by Chagas disease (Gupta *et al.*, 2015).

55



1 Astaxanthin (ASTX) is a powerful antioxidant (Goto *et al.*, 2001; Iwabayashi *et al.*, 2009), with anti-  
2 inflammatory (Kim *et al.*, 2010) and immuno-modulatory properties, that has shown to control the OS caused  
3 by different cardiac diseases, and has contributed to prevent the oxidative damage caused to cardiac cells  
4 (Fassett and Coombes, 2012) helping to maintain general cardiac health. In a previous study, we observed  
5 some beneficial effects of this antioxidant, when used during the acute phase of an experimental *T. cruzi*  
6 infection in Balb/C mice, where ASTX contributed to the reduction of amastigotes nests counts in cardiac  
7 tissue, and enhanced local immuno-modulatory response, by increasing limpho-plasmacytic infiltrate reaction  
8 in heart tissue (Contreras-Ortiz *et al.*, 2017). In the present report, we evaluated the effects of astaxanthin  
9 supplementation in *T. cruzi* experimentally infected BALB/c mice, that had been previously vaccinated with  
10 TcVac1M, to find out if the use of astaxanthin would improve vaccine response to the infection.

## 11 MATERIAL AND METHODS

### 12 Amplification of pcDNA3.0/TcG2 and pcDNA3.0/TcG4 plasmids

13  
14 Escherichia coli, strain DH5-a was transformed with mammalian expression plasmids pcDNA3.0/TcG2 or  
15 pcDNA3.0/TcG4 as described elsewhere (Bhatia *et al.*, 2004). Transformed bacteria were grown in LB  
16 medium with ampicillin (100mg/ml of medium) and plasmid extracted and purified with GeneJET Plasmid  
17 Miniprep (Thermo Fisher Scientific, USA), following supplier's instructions. Pure plasmids were diluted in  
18 sterile deionized water. Plasmid identity was confirmed by extracting the inserts of pcDNA3.0/TcG2 (662bp)  
19 and pcDNA3.0/TcG4 (276 bp) with a double digest (Hind III/Xba1; BamH1/Xba1) and visualized in a 3%  
20 agarose gel electrophoresis.

### 21 Parasites

22  
23 *Ninoo* strain (kindly donated by Dr. Pedro Reyes, from the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio  
24 Chavez") *T. cruzi* trypomastigotes, were used to infect a Vero cell monolayer culture and kept in DMEM  
25 supplemented medium (2% fetal bovine serum [FBS] and 1% penicillin-streptomycin (Gibco Laboratories,  
26 USA) under controlled conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub> and saturated humidity) (Manning-Cela *et al.*, 2001). After  
27 one to two weeks of infection, parasites started to break out the cells, then, freely swimming trypomastigotes  
28 were collected in 15 ml conical tubes and centrifuged at 2700 rpm for seven minutes. Supernatant was  
29 discarded and pellet resuspended in one ml of fresh DMEM medium. Trypomastigotes were counted with  
30 hemocytometer and parasite doses were adjusted for specific assay necessities.

### 31 Animals

32  
33 Balb/c mice (n=48), 4-6 weeks of age were distributed in 8 groups (n=6) as follows: A1 (Tc/TcVac1M); A2  
34 (Tc/TcVac1M/ASTX); B (TcVac1M); C (Tc); D (Tc/ASTX); E (Tc/ASTX/NFMX); F (Tc/NFMX); G (SOL  
35 SAL) (Table 1). Animals were kept in the conditions established under the Mexican Official Norm for Care  
36 and Use of Laboratory Animals (Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1995) (NOM, 1995) and protocols were  
37 approved by the Bioethics and animal welfare committee of the School of Veterinary Medicine of The  
38 Mexico State University (Comité de Bioética y Bienestar Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y  
39 Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México). Animals were maintained with free access to water  
40 and balanced diet.

### 41 Immunization, infection and treatments

42  
43 Animals were immunized three times, 15 days apart, by intradermal electroporation (Hegazy-Hassan,  
44 personal communication) of 10 µg each of pcDNA3.0/TcG2 and pcDNA3.0/TcG4 plasmids (modified  
45 TcVac1 vaccine), as described in Table 1. Mice were observed daily for signs of disease such as hirsutism,  
46 weight loss, lameness, or any behavioral change.

### 47 Parasitemia

48  
49 Tail tip blood (4 µl) was collected from mice, a slide with a coverslip (18 x 18 mm) was prepared and  
50 parasites counted in a light microscope at 400x magnifications, 100 fields were observed and the number of  
51

1 parasites per mL were estimated according to standard protocols (Brener, 1962; Rowland and Sibley-Phillips,  
2 1984). Parasitemia was evaluated twice a week from days 5 to 60 post-infection (pi).

#### 3 4 ASTX and Nifurtimox treatments

5  
6 From the day parasitemia was detected (day 12 pi, until day 60), ASTX (Bioastin®, Cyanotech, USA; 8  
7 mg/kg/day) was supplied orally to mice, according to the treatment group (table 1). ASTX was prepared by  
8 grinding 400mg of Bioastin® ASTX with mortar and pestle in aseptic conditions. The grinded ASTX was  
9 resuspended in 3ml of 20% (V/V) Tween 20/deionized water (Anarjan and Tan, 2013), for a final volume of  
10 3.1 mL. Then 60 µl of the described ASTX preparation, equivalent to 8 mg of pure ASTX was supplemented  
11 on daily bases until the end of the experiment. This ASTX dose has shown immunomodulatory and anti-  
12 inflammatory effects in mice, as well as in other species, including men (Nakao *et al.*, 2010; Park *et al.*,  
13 2010a; b; Kavitha *et al.*, 2013; Kuan Hung *et al.*, 2015). Nifurtimox (NFMX) was used as tripanomicidal  
14 control. It was prepared by grinding a commercial tablet (120 mg, Lampit®, Bayer) with mortar and pestle in  
15 aseptic conditions, the powder was suspended in one mL of sterile deionized water (Cencig *et al.*, 2012).  
16 Treatment was orally administered on daily bases at a dose of 100 mg/kg/day in a 60 µl volume (Cabeza  
17 *et al.*, 1988; Contreras-Ortiz *et al.*, 2017) (table 1), from day 12, until the day parasitemias were detected no  
18 more in fresh blood preparations, as above described (Rowland and Ritter, 1984; Rowland and Sibley-  
19 Phillips, 1984; Bonney and Engman, 2008).

#### 20 21 Animal sacrifice and sample collection

22  
23 Animals were euthanized according to the Mexican Official Norm for Care and Use of Laboratory Animals  
24 (Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1995) (NOM, 1995) with protocols approved by the Bioethics and  
25 Animal Welfare Committee from the Veterinary Medicine School from the Autonomous University of the  
26 State of Mexico (COBYBA-FMVZ-UAEM) and according to the guidelines of the National Academy of  
27 Science (NAS, 2011). Tissue samples and blood (heart and femoral skeletal muscle) were collected  
28 immediately after animals were euthanized (day 60 pi) or died due to infection. Blood samples were collected  
29 through heart puncture from animals previous to sacrifice to obtain blood serum. Tissues samples were fixed  
30 in 10% formaldehyde solution and then processed for histopathology (Aparicio-Burgos *et al.*, 2015).

#### 31 32 Histopathology

33  
34 Tissue samples were fixed in 10% formaldehyde for 24 hours, then it was dehydrated in absolute ethanol,  
35 cleared with xylene and embedded in paraffin. Tissue sections (5-µm thick) were stained with hematoxylin  
36 and eosin and evaluated by light microscopy at 100x and 400x magnifications in a Carl Zeiss Axiostar  
37 microscope (Carl Zeiss, USA). Images were captured with a Tucsen 5MP camera (Tucsen, China) and  
38 processed with Image-Pro Plus 7 software. Severity of inflammation was evaluated through lymphocyte  
39 infiltration in 400 microscopic random fields and graded as negative (-), light (+), Moderate (++) and severe  
40 (+++) (Barbabosa-Pliego *et al.*, 2009). Parasite burden was estimated through the number of amastigotes nests  
41 observed in the same microscopic fields where infiltration was evaluated.

#### 42 43 Malondialdehyde (MDA) assay

44  
45 Serum samples MDA levels were determined for all experimental animals, with the OxiSelect™ MDA  
46 Adduct ELISA kit (Cell Biolabs, USA) following supplier's instructions. Experimental and standard samples  
47 were incubated in a 96 well plate for 2 hours at 37°C. MDA-protein Adducts were identified with primary  
48 anti-MDA antibodies which is recognized with secondary HPR-conjugated antibodies. Color was developed  
49 with 3,3',5,5'-tetrametilbenzidín (TMB) and change in color monitored at 450 nm in an Epoch microplate  
50 reader and Gene 5 (v.2.0) software (Biotek, VT, USA). Pre-determined MDA-BSA standard was used to  
51 estimate the MDA-protein adducts content from samples (Dittrich *et al.*, 2012).

#### 52 53 Serology

54  
55 Flat bottom 96-well plates (High binding, Costar) were coated with soluble fraction of *T. cruzi* Ninoa strain  
56 trypanomastigotes lysate (5 µg protein/100-µl/well, diluted in NaOHCO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> buffer, pH 6.8) and



1 incubated overnight at 4°C. Plates were washed with 200 µl of PBS-0.05% Tween-20 (PBS-T), and blocked  
2 with dried skim-milk in PBS-T (5% solution W/V) for one hour at 37°C. Experimental sera (1:1000 dilution  
3 in 200 µl of PBS-T 0.05% per well) were added and incubated 1 h at 37°C. Plates were rinsed six times with  
4 PBS-T 0.05% and horseradish peroxidase-conjugated rabbit polyclonal-anti-mouse IgG (1:2500 dilution, 100-  
5 µl/well) were added and incubated for one additional h. Plates were rinsed six times again and color was  
6 developed by incubation with 100-µl/well Sure Blue TMB substrate (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; Kirkegaard  
7 & Perry Labs) at room temperature for 10 min, reaction was stopped with 2N sulfuric acid, and change in  
8 color monitored at 450 nm using an Epoch microplate reader and Gene 5 (v.2.0) software (Biotek, VT,  
9 USA)(Aparicio-Burgos *et al.*, 2011).

10  
11 Statistical analysis

12  
13 Data from parasitemia, survival, IgG and total MDA were analyzed with ANOVA. Mean differences were  
14 determined with Tukey test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad  
15 software Inc., San Diego, Ca). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 16 17 RESULTS

### 18 19 Parasitemia

20  
21 Experimental groups showed differences in the number of blood trypomastigotes, the figure 1 shows  
22 that parasitemia levels (10,000, 3100, and 4106 parasites/µl, respectively), from groups A1, A2 and C were  
23 not different at any time during the acute phase of infection. All animals from groups C and D had succumbed  
24 to infection before day 30 pi. All non-infected animals were in good health until the day of sacrifice (day  
25 60 post-infection).

### 26 27 Survival to infection

28  
29 Survival during the acute phase of infection showed some differences among groups. Figure 2 shows that,  
30 non-infected animals, groups B (TcVac1M) and G (Sal Sol) had 100% survival rate and were non-different  
31 from infected groups E (Tc/ASTX/NFMX) and F (Tc/NFMX) that also had 100% survival rate and were  
32 different ( $p < 0.05$ ) from all other groups. Groups C (Tc) and D (Tc/ASTX) suffered 100% mortality and were  
33 different ( $p < 0.05$ ) groups A1 (Tc/TcVac1M/ASTX) and A2 (Tc/TcVac1M), who showed 20% and 50%  
34 survival rates and were different in between ( $p < 0.05$ ).

### 35 36 Oxidative stress levels

37  
38 Malonaldehyde (MDA) levels, as oxidative-stress marker from mice serum at 60 days post-infection, shows  
39 increments as compared with serum from non-infected animals. MDA serum values of animals from A1  
40 (Tc/TcVac1M/ASTX) and A2 (Tc/TcVac1M) E (Tc/ASTX/NFMX) and F (Tc/NFMX) groups were 3.9, 11.9,  
41 7.3 and 11.2 pmol/mL, respectively. Animals from groups C (Tc) and D (Tc/ASTX) produced 3.3 and 3.5  
42 pmol/mL of MDA, however, these animals were sampled early during the infection (because they died  
43 between days 22 and 23 pi.) and their values cannot be compared with those from other groups. It is important  
44 to mention animals from group B (TcVac1M), which were vaccinated but not infected had significantly lower  
45 ( $p < 0.05$ ) MDA values that all other groups (Fig. 3).

### 46 47 Serology

48  
49 IgG antibodies detected in infected mice previously immunized with TcVac1M (groups A1, A2) 60 days pi,  
50 and vaccinated/non-infected animals showed the larger antibody increments ( $p < 0.05$ ) when compared with  
51 non-vaccinated/infected animals from group G. Animals from groups C (Tc) and D (Tc/ASTX) did not show  
52 high IgG titers (0.32 and 0.25, respectively). However, it should be noted that these animals died early during  
53 the acute phase of infection (between days 23 and 27) when antibodies had not yet reached their highest peak.  
54 Animals from groups E (Tc/ASTX/NFMX) and F (Tc/NFMX), who received NFMX treatment, didn't  
55 develop high levels of antibodies and they were not different ( $p > 0.05$ ) from animals from groups C and D  
56 (Graph 4: A and B).

1 Histopathologic findings

2  
3 Histopathologic analysis of heart tissue showed some differences in lymphocyte infiltrate and amastigotes  
4 nests numbers in different groups. Group A1 (Tc/TcVac1M/ASTX) had moderate diffuse and focal  
5 lymphoplasmacytic infiltrate and necrotic cardiomyocytes. This group had an average of 33±12 amastigotes  
6 nest. The group A2 also had moderate lymphoplasmacytic infiltration and necrotic cardiomyocytes, however  
7 no amastigotes nests were found in this group of animals. Animals from groups C (Tc) and D (Tc/ASTX)  
8 mild to moderate lymphoplasmacytic infiltration, and necrotic cardiomyocytes with 35 and 24 mean number  
9 of amastigotes, respectively. Animals from non-infected groups, as well as those where animals were treated  
10 with NFMX, that is mice from groups B (TcVac1M), E (Tc/ASTX/NFMX), F (Tc/NFMX) y G (SOL SAL)  
11 showed normal heart tissue (Table2).

12  
13 DISCUSSION

14  
15 No studies have reported yet the use of DNA vaccines combined with the exogenous use of antioxidants  
16 during the acute phase of infection with *T. cruzi*. Few reports that study the use of exogenous antioxidants  
17 evaluate the infection during the chronic phase and their influence on the control of chagasic cardiomyopathy  
18 (Maçao *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010). The present report studies the use of TcVac1M, as from candidate  
19 vaccine against *T. cruzi* (Bhatia and Garg, 2008; Gupta and Garg, 2010) and ASTX, a powerful antioxidant  
20 obtained from the algae *Haematococcus pluvialis*, in BALB/c mice infected with *Ninoa* strain of *T. cruzi*, and  
21 demonstrated that the combined use of the antioxidant and the vaccine does not have a beneficial effect in  
22 infected BALB/c mice during the acute phase of infection. Animals from this treatment had a parasitemia four  
23 times higher than animals vaccinated without antioxidant supplementation (A2: Tc/TcVac1M) (Graph 1). The  
24 use of TcVac2, a vaccine candidate composed of the same DNA antigens used in TcVac1 (TcG2 and TcG4)  
25 plus recombinant proteins for these antigens, in transgenic C57BL/6 mice that overexpressed Glutathione  
26 peroxidase, was previously reported by (Gupta *et al.*, 2015), and found that these mice had an increased  
27 control of a established infection when vaccinated 45 days post infection, in comparison with non-transgenic  
28 C57BL/6 mice. The relatively good efficacy of TcG2 and TcG4 (*T. cruzi* antigens) used as vaccine in mouse  
29 model, had been previously studied (Bhatia and Garg, 2008; Gupta and Garg, 2010) in C57BL/6 mice  
30 experimentally infected with *Sylvio* strain of *T. cruzi* and reported a parasitemia control between 50-90%  
31 during the acute phase of infection. On the other hand, in a recent publication our reported that the use of  
32 ASTX in BALB/c mice experimentally infected with *Ninoa* strain of *T. cruzi*, did not have a positive effect  
33 over the level parasitemia, and did not have a detrimental effect over the parasites in an *in-vivo* trial  
34 (Contreras-Ortiz *et al.*, 2017). Similar results were published by Wen *et al.*, (2010) when using PBN (Phenyl-  
35  $\alpha$ -tert-butyl-nitrona) a synthetic antioxidant, used in Sprague Dawley rats infected with *T. cruzi* (Wen *et al.*,  
36 2010).

37  
38 In the present study, survival of mice from groups A2 (Tc/TcVac1M) and A1 (Tc/TcVac1M/ASTX), 60 days  
39 pi were 50% and 25 %, respectively (Graph 2). These results suggest that in vaccinated mice, oral  
40 supplementation of ASTX does not favor health, nor it increase survival of experimentally vaccinated and  
41 infected BALB/c mice. These findings demonstrate that the use of the TcVac1M used as prophylactic has  
42 better results in reducing infection damage than the combined use of prophylactic vaccine followed using  
43 ASTX during the acute phase of an experimental infection with *T. cruzi*. When comparing our results with  
44 other studies where TcVac vaccine candidate series were used (Bhatia and Garg, 2008; Gupta and Garg,  
45 2010), it seems that the vaccine in the present study had lower efficacy. However, the differences could be  
46 due to the distinct *T. cruzi* strains used in these studies; *Sylvio* vs *NINOA*. We have worked with both strains,  
47 and in our hands *Ninoa* is more aggressive than *Sylvio* in the mouse model, and therefore we chose it for the  
48 present study.

49 Several studies have as well reported relatively good survival rates of mice vaccinated with DNA vaccines  
50 expressing different *T. cruzi* antigens, in experimentally infected animals. Here we report 50% survival rate in  
51 mice vaccinated with TcVac1M. In comparison with other studies, we found better survival results that trans-  
52 lialidase protein as TSSA and ANYNFTLV (epitope of CD8+ T derived from *T. cruzi* antigen) (Miyahira *et al.*,  
53 2003, 2005). Our results are not as good as those reported for ASP-2 (Boscardin *et al.*, 2003), TcSP  
54 (Salgado-Jiménez *et al.*, 2013) or TcSSP4 (Arce-Fonseca *et al.*, 2011) which reached survival values close to  
55 100% in vaccinated infected mice. Other vaccines of the TcVac series (TcVac2 and TcVa3) have shown an  
56 almost complete control of infection in C57BL/6 mouse with no mortality of vaccinated/infected animals



1 (Gupta and Garg, 2010, 2013). Outcome differences could be the result of changes in vaccination protocols;  
2 TcVac2 and TcVac3 vaccines use two intramuscular boost of plasmid DNA (25µg each) plus two doses of  
3 either recombinant proteins or MVA vector for the same antigens. Those studies used C57BL/6 mice and  
4 Sylvio strain of *T. cruzi* for the challenge infection, while in the present study some adjustments to the  
5 experimental protocol were made: the vaccine administration dose (intradermal electroporation), the number  
6 of boost vaccines (n=3), mice strain (BALB/c), and *T. cruzi* strain (*Ninoa*).  
7  
8 On the other hand, during the development of Chagas disease, the host's heart is under the severe attack  
9 caused by the invasion and replication of the parasite and by the aggression of its own immune system, which  
10 induces oxidative stress, which in turn is produced by high levels of reactive oxygen species (ROS) induced  
11 by the release of inflammatory mediators (cytokines and chemokines), which damage and kills  
12 cardiomyocytes and can contribute to chagasic cardiomyopathy (Wen *et al.*, 2006, 2008; Gupta *et al.*, 2009).  
13 Oxidative stress in animals can be indirectly estimated in animal's serum through markers such as MDA,  
14 which is produced from lipid peroxidation derived from OS (Dittrich *et al.*, 2012). In the present report, the  
15 group of animals that was vaccinated/infected and supplemented with ASTX (A1: Tc/TcVac1M/ASTX)  
16 showed low levels of MDA (3.97 pmol/mL) although these levels are not different from those found in the A2  
17 (TcVac1M/Tc) group where levels reached 11.9 pmol/mL which also not different from the animals from the  
18 groups E and F treated with NFMX, that showed levels of 7.3 y 11.2 pmol/mL, respectively (Fig. 3). It has  
19 been reported that NFMX increases OS levels because it releases free radicals that result in damaging the  
20 parasite (Castro, 2014). It is important to mention that animals from the group B (TcVac1M), the only vaccine  
21 control, no MDA was detected (Fig. 3). Our findings agree with other reports where it was found that  
22 antioxidant oral supplementation can reduce OS levels (Fassett and Coombes, 2012). Antioxidants such as  
23 Vitamins E and C have been used in human Chagasic patients (Maçao *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010) and  
24 PNB (fenil- $\alpha$ -terbutil-nitrona) in experimentally *T. cruzi* infected rats (Wen *et al.*, 2010) to reduce OS. These  
25 findings support the idea that the use of antioxidants in *T. cruzi* infected patients could reduce the risk of  
26 chronic chagasic cardiomyopathy (CCM). Therefore, even if during the acute phase of infection ASTX does  
27 not seem to be of any help fighting *T. cruzi* infection, considering that it is a strong antioxidant, the possibility  
28 still remains that, as it happens with antioxidant Vitamins (E and C) and PBN, it would be of use during the  
29 chronic phase of infection to protect against CCM. However, further studies should be conducted in order to  
30 test such hypothesis. It is difficult to explain why, despite the influence that ASTX has on the OS, the  
31 parasitemia levels and the survival were not improved in the present report. A possible explanation could  
32 come from findings reported by other research groups, who found that the endogenous antioxidant system  
33 (GPx, MnSOD, GSR y GSH) become insensitive in cardiomyocytes and therefore an adequate response  
34 cannot be observed during the development of chronic Chagas disease after the first oxidative load developed  
35 during the acute phase of infection (Wen *et al.*, 2004). It could be speculated that something similar happened  
36 with ASTX in the present study during the acute phase of infection, and therefore the antioxidant effects of  
37 the product were not encouraging enough. A less optimistic speculation could be that the antioxidant activity  
38 of ASTX, when fighting the free radicals produced during the infection, favors the conditions for the parasite  
39 survival, reducing harsh conditions created by the immune system, since we observed higher parasitemias in  
40 ASTX treated infected animals from group A1 (Tc/ASTX) than those observed in the control group C (Tc).  
41  
42 Prophylactic treatment with 3 doses of intradermal electroporation of TcVac1M vaccine without DNA  
43 adjuvants resulted in partial protection of the animals against experimental *T. cruzi*. Since among groups of  
44 animals vaccinated/infected (A1: Tc/TcVac1M/ASTX and A2: Tc/TcVac1M) without NFMX treatment, 20%  
45 and 50% survived the acute phase of infection was observed, respectively, while all non-vaccinated/infected  
46 animals (groups C: Tc and D: Tc/ASTX) died before day 30 pi. Vaccinated animals also showed higher IgG  
47 antibody titers after infection than all other infected groups. It is worth to note that other experiments where  
48 vaccines of the TcVac series (Bhatia and Garg, 2008; Gupta and Garg, 2010) have been tested with mice  
49 show higher survival rates, as well as lower parasite loads (parasitemia and amastigotes nests in heart tissue),  
50 than vaccinated animals from the present study. This result was unexpected, however these differences could  
51 be explained by the experimental differences i.e., in the present study *Ninoa* strain of *T. cruzi* was used on  
52 BALB/c mice, while (Gupta and Garg, 2013) used *Sylvio* X/10 strain of *T. cruzi* and C57BL/6 mouse strains.  
53 In our hands, when used in mice, *Ninoa* strain is more lethal than *Sylvio* X/10 in BALB/c mouse, however we  
54 did not test *Ninoa* strain infection on C57BL/6. Susceptibility differences to different strains of *T. cruzi* have  
55 been reported for BALB/c and C57BL/6 mouse strains, where BALB/c could be more susceptible to one  
56 strain of *T. cruzi* than C57BL/6 but more resistant or other strain (Wrightsmann *et al.*, 1982; Andrade *et al.*,

1 1985; Silva *et al.*, 1992). In a previous study (Wael *et al.*, submitted for publication), we studied the immune  
2 response of mice to TcVac1 vaccine by intradermal electroporation, in animals infected with Sylvio strain,  
3 and found an improved immune response in these animals when compared with those vaccinated  
4 intramuscularly. In that study animals were infected with Sylvio strain of *T. cruzi* and found no lethality in  
5 any animals, neither, vaccinated or non-vaccinated, therefore, for the present report we chose to use *Ninoa*  
6 strain.  
7

8 On the other hand, we found no advantage in supplementing vaccinated/infected mice with ASTX, since  
9 results demonstrate that addition of the antioxidant does not improve IgG production in response to infection,  
10 it seems to interfere in parasite burden control and mortality is higher in animals receiving ASTX, as can be  
11 observed when comparing groups A1 (Tc/TcVac1M/ASTX) and A2 (Tc/TcVac1M) (Figures 1 and 2). Other  
12 research groups, have reported that dogs vaccinated against distemper, and supplemented with ASTX, had an  
13 increased IgM and IgG serum antibodies production (Chew *et al.*, 2011). In that study, ASTX  
14 supplementation modulated humoral levels of IFN- $\gamma$  and IL-2 improving Th1 immune response. In a previous  
15 study we demonstrated that ASTX supplementation, contributes to the formation of diffuse  
16 lymphoplasmacytic infiltrate in heart tissue of BALB/c mice infected with *T. cruzi* associated to a lower  
17 amastigotes load of heart tissue (Contreras-Ortiz *et al.*, 2017), therefore we hypothesized that the use of this  
18 antioxidant in vaccinated animals would contribute to parasite control. Herein we found that ASTX did not  
19 help controlling *T. cruzi* infection in vaccinated animals, and that the use of the vaccine on its own is more  
20 effective than when used with ASTX as antioxidant during the acute phase of disease. In that report, we also  
21 found that when used as a combined therapy ASTX/NFMX, the antioxidant opposes the free radical effects of  
22 NFMX to kill the parasites, reducing the effectiveness of the antiparasitic drug over the infecting parasites.  
23 Therefore, it could be hypothesized that ASTX, when used during the acute phase of infection, when free  
24 radicals are produced by the immune system to control the infection, the use of antioxidants helps the parasite  
25 to resist the immune system attack, favoring infection. Others (Maçao *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010; Wen  
26 *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2015) have found that the use of antioxidants is beneficial to prevent the evolution  
27 of chagasic cardiomyopathy in chronic infection of *T. cruzi*. In individuals with chronic Chagas disease, the  
28 immune system reaches a balance with the parasite where parasites are under control but are not completely  
29 eliminated from the host. Under such condition it would be reasonable to think that the use of antioxidants  
30 have some beneficial effects over the evolution of chronic chagasic cardiomyopathy (CCM) because there  
31 could be a reduction of cardiomyocytes dyeing as stand by effect in tissue areas where the immune system  
32 keeps fighting infection. Therefore, considering the adverse findings about the use of ASTX during the acute  
33 phase of disease and results from others (Maçao *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010), who reported some  
34 beneficial effects of the use of antioxidants in chronic phase of Chagas disease, it would remain to be studied  
35 if ASTX would be of any help to prevent evolution chronic chagasic cardiomyopathy.  
36

### 37 CONCLUSIONS

38  
39 Supplementation of ASTX in immunized mice with TcVac1M vaccine, reduces the OS level in challenged  
40 animals, however the antioxidant does not help to control parasitic infection and it does not contribute to  
41 improve humoral immune response. Therefore, the use of ASTX is not recommended either alone, or in  
42 combination with the use of prophylactic TcVac1M vaccine.  
43

### 44 CONFLICT OF INTEREST

45  
46 The authors declare that they have no conflict of interest  
47

### 48 ACKNOWLEDGEMENTS

49 Gerald R. Cysewsky Ph.D. Excecutive Vice President Cyanotech for his kind donation of ASTX (Bioastin®).  
50

### 51 FINANCIAL SUPPORT

52  
53 This study was conducted to the following financial support: Universidad Autónoma del Estado de México,  
54 Grant 3326/2012; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant number 156701, and for the scholarship  
55 granted to Contreras-Ortiz during his doctoral degree studies (Scholarship No. 252794)



- 1 **References**
- 2
- 3 **Anarjan, N. and Tan, C. P.** (2013). Effects of selected polysorbate and sucrose ester emulsifiers on the
- 4 physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. *Molecules* **18**, 768–777.
- 5 doi:10.3390/molecules18010768.
- 6 **Andrade, V., Barral-Neto, V. and Andrade, V.** (1985). Patterns of resistance of inbred mice to
- 7 *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Braz J Med Biol Res.* **18**, 499–506.
- 8 **Aparicio-Burgos, J. E., Ochoa-García, L., Zepeda-Escobar, J. A., Gupta, S., Dhiman, M., Martínez, J.**
- 9 **S., de Oca-Jiménez, R. M., Arreola, M. V., Barbabosa-Pliego, A., Vázquez-Chagoyán, J. C. and**
- 10 **Garg, N. J.** (2011). Testing the efficacy of a multi-component DNA-prime/DNA-boost vaccine against
- 11 *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**,
- 12 doi:10.1371/journal.pntd.0001050.
- 13 **Aparicio-Burgos, J. E., Zepeda-Escobar, J. A., de Oca-Jimenez, R. M., Estrada-Franco, J. G.,**
- 14 **Barbabosa-Pliego, A., Ochoa-García, L., Alejandro-Aguilar, R., Rivas, N., Peñuelas-Rivas, G.,**
- 15 **Val-Arreola, M., Gupta, S., Salazar-García, F., Garg, N. J. and Vázquez-Chagoyán, J. C.** (2015).
- 16 Immune Protection against *Trypanosoma cruzi* Induced by TcVac4 in a Canine Model. *PLoS Neglected*
- 17 *Tropical Diseases* **9**, 1–16. doi:10.1371/journal.pntd.0003625.
- 18 **Arce-Fonseca, M., Ramos-Ligonio, A., López-Monteón, A., Salgado- Jiménez, B., Talamás-Rohana, P.**
- 19 **and Rosales-Encina, J. L.** (2011). A DNA vaccine encoding for TcSSP4 induces protection against
- 20 acute and chronic infection in experimental Chagas disease. *International Journal of Biological*
- 21 *Sciences* **7**, 1230–1238. doi:doi:10.7150/ijbs.7.1230.
- 22 **Barbabosa-Pliego, A., Díaz-Albiter, H. M., Ochoa-García, L., Aparicio-Burgos, E., López-Heydeck, S.**
- 23 **M., Fajardo-Muñoz, R. and Vázquez-Chagoyán, J. C.** (2009). *Trypanosoma cruzi* Circulating in the
- 24 Southern Region of the State of Mexico (Zumpahuacan) Are Pathogenic: A Dog Model. *Am J Trop Med*
- 25 *Hyg* **81**, 390–395. doi:10.1124/dmd.107.016501.CYP3A4-Mediated.
- 26 **Bhatia, V. and Garg, N. J.** (2008). Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi*
- 27 infection and immunopathology in mice. *Clinical and Vaccine Immunology* **15**, 1158–1164.
- 28 doi:10.1128/CVI.00144-08.
- 29 **Bhatia, V., Mala, S., Luxon, B. and Garg, N.** (2004). Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database
- 30 for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. *Infection and*
- 31 *Immunity* **72**, 6245–6254. doi:10.1128/IAI.72.11.6245-6254.2004.
- 32 **Bonney, K. M. and Engman, D. M.** (2008). Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?
- 33 *Current Molecular Medicine* **8**, doi:10.1124/dmd.107.016501.CYP3A4-Mediated.
- 34 **Boscardin, S. B., Kinoshita, S. S., Adriana, E., Rodrigues, M. M. and Fujimura, A. E.** (2003).
- 35 Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* Elicits Protective Immune
- 36 Response against Experimental Infection Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of
- 37 *Trypanosoma cruzi* Elicits Protective Immune Response against Experiment. **71**, 2744–2757.
- 38 doi:10.1128/IAI.71.5.2744.

- 1 **Brener, Z.** (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with  
2 *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **4**, 389–396.
- 3 **Cabeza, M. P., Chambo, J. G. and Laguens, R. P.** (1988). Differences in resistance to reinfection with low  
4 and high inocula of *Trypanosoma cruzi* in chagasic mice treated with nifurtimox and relation to immune  
5 response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**, 241–245. doi:10.1128/AAC.32.2.241.
- 6 **Campos, F., Liarte, D. B., Renato, A. M., Romanha, A. J. and Murta, S. M. F.** (2009). Characterization of  
7 a gene encoding alcohol dehydrogenase in benznidazole-susceptible and -resistant populations of  
8 *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* **111**, 56–63. doi:10.1016/j.actatropica.2009.02.007.
- 9 **Castro, J.** (2014). EFECTOS TÓXICOS DE LOS FÁRMACOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO  
10 DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Un problema frecuente en la quimioterapia de las  
11 enfermedades tropicales. *CIENCIA E INVESTIGACIÓN* **64**.
- 12 **Cazorla, S. I., Becker, P. D., Frank, F. M., Ebensen, T., Sartori, M. J., Corral, R. S., Malchiodi, E. L.  
13 and Guzmán, C. A.** (2008). Oral vaccination with *Salmonella enterica* as a cruzipain-DNA delivery  
14 system confers protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* **76**, 324–333.  
15 doi:10.1128/IAI.01163-07.
- 16 **Cencig, S., Coltel, N., Truyens, C. and Carlier, Y.** (2012). Evaluation of benznidazole treatment combined  
17 with nifurtimox, posaconazole or AmBisome?? in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains.  
18 *International Journal of Antimicrobial Agents* **40**, 527–532. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.08.002.
- 19 **Chew, B. P., Mathison, B. D., Hayek, M. G., Massimino, S., Reinhart, G. A. and Park, J. S.** (2011).  
20 Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*  
21 **140**, 199–206. doi:10.1016/j.vetimm.2010.12.004.
- 22 **Contreras-Ortiz, J. M. E., Barbabosa-Pliego, A., Oros-Pantoja, R., Aparicio-Burgos, J. E., Zepeda-  
23 Escobar, J. A., Hassan-Moustafa, W. H., Ochoa-García, L., Uxía Alonso-Fresan, M., Tenorio  
24 Borroto, E. and Vázquez-Chagoyán, J. C.** (2017). Effects of astaxanthin in mice acutely infected with  
25 *Trypanosoma cruzi*. *Parasite* **24**, 17. doi:10.1051/parasite/2017018.
- 26 **Dittrich, R., Schibel, A., Hoffmann, I., Mueller, A., Beckmann, M. W. and Cupisti, S.** (2012). Influence  
27 of maternal smoking during pregnancy on oxidant status in amniotic fluid. *In vivo (Athens, Greece)* **26**,  
28 813–8. doi:https://doi.org/10.1177/0960327107082229.
- 29 **Fassett, R. G. and Coombes, J. S.** (2012). Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules* **17**,  
30 2030–2048. doi:10.3390/molecules17022030.
- 31 **Goto, S., Kogure, K., Abe, K., Kimata, Y., Kitahama, K., Yamashita, E. and Terada, H.** (2001). Efficient  
32 radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent  
33 antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*  
34 **1512**, 251–258. doi:10.1016/S0005-2736(01)00326-1.
- 35 **Gupta, S. and Garg, N. J.** (2010). Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in mice.  
36 *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**, 9–13. doi:10.1371/journal.pntd.0000797.
- 37 **Gupta, S. and Garg, N. J.** (2013). TcVac3 Induced Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Chronic  
38 Myocarditis in Mice. *PLoS ONE* **8**,. doi:10.1371/journal.pone.0059434.

- 1 **Gupta, S., Wen, J.-J. and Garg, N. J.** (2009). Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdisciplinary*  
2 *Perspectives on Infectious Diseases* **2009**, 1–8. doi:10.1155/2009/190354.
- 3 **Gupta, S., Smith, C., Auclair, S., Delgadillo, A. D. J. and Garg, N. J.** (2015). Therapeutic efficacy of a  
4 subunit vaccine in controlling chronic *Trypanosoma cruzi* infection and chagas disease is enhanced by  
5 glutathione peroxidase over-expression. *PLoS ONE* **10**, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0130562.
- 6 **Iwabayashi, M., Fujioka, N., Nomoto, K., Miyazaki, R., Takahashi, H., Hibino, S., Takahashi, Y.,**  
7 **Nishikawa, K., Nishida, M. and Yonei, Y.** (2009). Efficacy and safety of eight-week treatment with  
8 astaxanthin in individuals screened for increased oxidative stress burden. *Anti-Aging Medicine* **6**, 15–  
9 21. doi:10.3793/jaam.6.15.
- 10 **Kavitha, K., Kowshik, J., Kishore, T. K. K., Baba, A. B. and Nagini, S.** (2013). Astaxanthin inhibits NF-  
11  $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce  
12 intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*  
13 **1830**, 4433–4444. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.032.
- 14 **Kim, Y.-H., Koh, H.-K. and Kim, D.-S.** (2010). Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via  
15 ERK-, MSK-, and NF- $\kappa$ B-mediated signals in activated microglia. *International Immunopharmacology*  
16 **10**, 1560–1572. doi:10.1016/j.intimp.2010.09.007.
- 17 **Kuan Hung, L., Lin, K. C., Lu, W. J., Thomas, P. A., Jayakumar, T. and Sheu, J. R.** (2015).  
18 Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN- $\gamma$  and IL-2 secretion in  
19 primary cultured lymphocytes in Vitro and ex Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1–  
20 10. doi:10.3390/ijms17010044.
- 21 **Maçao, L. B., Filho, D. W., Pedrosa, R. C., Pereira, A., Backes, P., Torres, M. A. and Fröde, T. S.**  
22 (2007). Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas'  
23 disease. *International Journal of Cardiology* **123**, 43–49. doi:10.1016/j.ijcard.2006.11.118.
- 24 **Manning-Cela, R., Cortés, A., González-rey, E., Voorhis, W. C. Van, Swindle, J. and González, A.**  
25 (2001). LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and ...*  
26 **69**, 3916–3923. doi:10.1128/IAI.69.6.3916.
- 27 **Miyahira, Y., Katae, M., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Kobayashi, S., Takeuchi, T.,**  
28 **Kamiyama, T., Fukuchi, Y. and Aoki, T.** (2003). Activation of natural killer T cells by alpha-  
29 galactosylceramide impairs DNA vaccine-induced protective immunity against *Trypanosoma cruzi*.  
30 *Infect. Immun.* **71**, 1234–1241. doi:10.1128/IAI.71.3.1234.
- 31 **Miyahira, Y., Takashima, Y., Kobayashi, S., Matsumoto, Y., Takeuchi, T., Yoshida, A., Ohwada, A.,**  
32 **Yagita, H., Okumura, K., Ogawa, H., Ohyanagi-hara, M. and Akiba, H.** (2005). Immune  
33 Responses against a Single CD8 + T-Cell Epitope Induced by Virus Vector Vaccination Can  
34 Successfully Control *Trypanosoma cruzi* Infection Immune Responses against a Single CD8  $\alpha$  T-Cell  
35 Epitope Induced by Virus Vector Vaccination Can Successfully C. **73**, 7356–7365.  
36 doi:10.1128/IAI.73.11.7356.
- 37 **Nakao, R., Nelson, O. L., Park, J. S., Mathison, B. D., Thompson, P. A. and Chew, B. P.** (2010). Effect of  
38 astaxanthin supplementation on inflammation and cardiac function in BALB/c mice. *Anticancer*



- 1 *Research* **30**, 2721–2725. doi:30/7/2721 [pii].
- 2 **NAS** (2011). *GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS*. doi:10.1163/1573-
- 3 3912\_islam\_DUM\_3825.
- 4 **NOM** (1995). *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1995*.
- 5 **OMS** (2017). *La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*.
- 6 **Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L. and Chew, B. P.** (2010a). Astaxanthin decreased
- 7 oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & metabolism*
- 8 **7**, 18. doi:10.1186/1743-7075-7-18.
- 9 **Park, J. S., Kim, H. W., Mathison, B. D., Hayek, M. G., Massimino, S., Reinhart, G. A. and Chew, B. P.**
- 10 (2010b). Astaxanthin uptake in domestic dogs and cats. *Nutrition & metabolism* **7**, 52.
- 11 doi:10.1186/1743-7075-7-52.
- 12 **Ribeiro, C. M., Budni, P., Pedrosa, R. C., Farias, M. S., Parisotto, E. B., Dalmarco, E. M., Fröde, T. S.,**
- 13 **Oliveira-Silva, D., Colepicolo, P. and Filho, D. W.** (2010). Antioxidant therapy attenuates oxidative
- 14 insult caused by benznidazole in chronic Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*
- 15 **145**, 27–33. doi:10.1016/j.ijcard.2009.06.033.
- 16 **Rowland, E. C. and Ritter, D. M.** (1984). Corpus Christi strain-induced protection to *Trypanosoma cruzi*
- 17 infection in C3H(He) mice: transfer of resistance to Brazil strain challenge with lymphocytes. *The*
- 18 *Journal of parasitology* **70**, 760–766. doi:10.2307/3281759.
- 19 **Rowland, E. C. and Sibley-Phillips, S.** (1984). Bone marrow eosinophil levels in *Trypanosoma cruzi*
- 20 infected mice. *The Journal of parasitology* **70**, 819–820. doi:10.2307/3281771.
- 21 **Salgado-Jiménez, B., Arce-Fonseca, M., Baylón-Pacheco, L., Talamás-Rohana, P. and Rosales-Encina,**
- 22 **J. L.** (2013). Differential immune response in mice immunized with the A, R or C domain from TcSP
- 23 protein of *Trypanosoma cruzi* or with the coding DNAs. *Parasite Immunology* **35**, 32–41.
- 24 doi:10.1111/pim.12017.
- 25 **Silva, J. S., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Mohler, K. M., Anderson, D. and Reed, S. G.** (1992).
- 26 Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *The*
- 27 *Journal of experimental medicine* **175**, 169–74. doi:10.1084/jem.175.1.169.
- 28 **Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G. and Armenti, A.** (2009). Side
- 29 effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert review of*
- 30 *anti-infective therapy* **7**, 157–163. doi:10.1586/14787210.7.2.157.
- 31 **Wen, J. J., Vyatkina, G. and Garg, N.** (2004). Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy
- 32 development: Role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radical*
- 33 *Biology and Medicine* **37**, 1821–1833. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.018.
- 34 **Wen, J. J., Yachelini, P. C., Sembaj, A., Manzur, R. E. and Garg, N. J.** (2006). Increased oxidative stress
- 35 is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radical Biology and Medicine*
- 36 **41**, 270–276. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.009.
- 37 **Wen, J.-J., Dhiman, M., Whorton, E. B. and Garg, N. J.** (2008). Tissue-specific oxidative imbalance and
- 38 mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Microbes Infect.* **10**, 214–220.

1 doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations.

2 **Wen, J.-J., Gupta, S., Guan, Z., Dhiman, M., Condon, D., Lui, C. and Garg, N. J.** (2010). Phenyl- $\alpha$ -tert-  
3 butyl-nitron and Benzimidazole Treatment Controlled the Mitochondrial Oxidative Stress and  
4 Evolution of Cardiomyopathy in Chronic Chagasic Rats. *J Am Coll Cardiol* **55**, 2499–2508.

5 doi:10.1016/j.jacc.2010.02.030.Phenyl-

6 **Wrightsmann, R., Krassner, S. and Watson, J.** (1982). Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in  
7 mice: Multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infection and Immunity* **36**, 637–644.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

For Peer Review

Table 2. Myocardium histopathological abnormalities found in experimental mice 60 days post-infection

Parameter / Groups	A1 Te/TcVac1M/ASTX	A2 Te/TcVac1M	B TcVac1M	C Tc	D Te/ASTX	E Te/ASTX/NFMX	F Te/NFMX	G SAL SOL
<b>Focal lymphoplasmacytic infiltration</b>	++	++	-	-	++	+	+	-
<b>Diffuse lymphoplasmacytic infiltration</b>	++	+	-	+	-	-	-	-
<b>Necrotic cardiomyocytes</b>	++	+	-	+	++	+	+	-
<b>Amastigotes nests average number ±S.D.</b>	33±12.8	0	0	35±3.9	24±3.05	0	0	0

Lesions grading: -, none; +, light; ++, moderate; +++, severe (Barbabosa-Pliego *et al.*, 2009).

For Peer Review



Table 1. TcVac1M Vaccine, Astaxanthin, Nifurtimox and Parasite treatment groups

Mice groups (n=6)	<i>T. cruzi</i> infection dose ( <i>Ninoa</i> Strain)	Astaxanthin (ASTX) mg/kg/day	Nifurtimox (NFMX) mg/kg/day	TcVac1M dose in µg
A1 (Tc/TcVac1M/ASTX)	10 parasites	8	-	10
A2 (Tc/TcVac1M)	10 parasites	-	-	10
B (TcVac1M)	-	-	-	10
C (Tc)	10 parasites	-	-	-
D (Tc/ASTX)	10 parasites	8	-	-
E (Tc/ASTX/NFMX)	10 parasites	8	100	-
F (Tc/NFMX)	10 parasites	-	100	-
G (Saline Solution: SS)	-	-	-	-

All vaccination and treatment doses were standardized to 30 µl.

For Peer Review

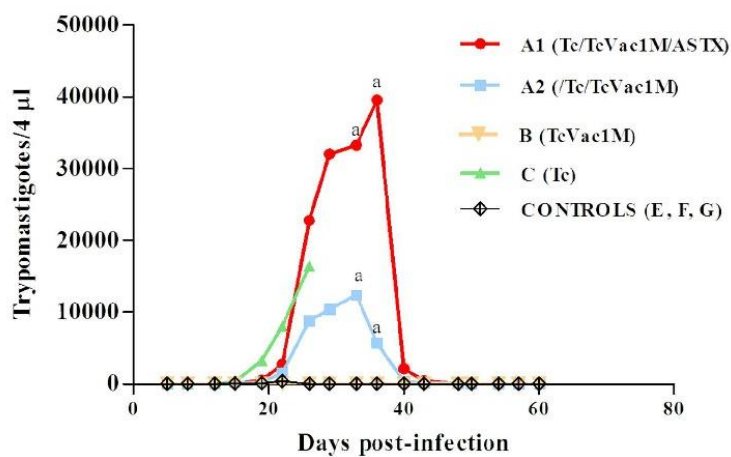


Figure 1. Parasitemia found in experimental infection of *T. cruzi* in BALB/c mice. Animals were infected after a prophylactic vaccination with TcVac1M vaccine and then supplemented or not with ASTX. Blood samples (4µl) were collected and analyzed twice a week, from day 5 to 60 post-infection. Although some tendencies are shown, no statistical differences were found among groups at a  $p < 0.05$ .

109x71mm (300 x 300 DPI)

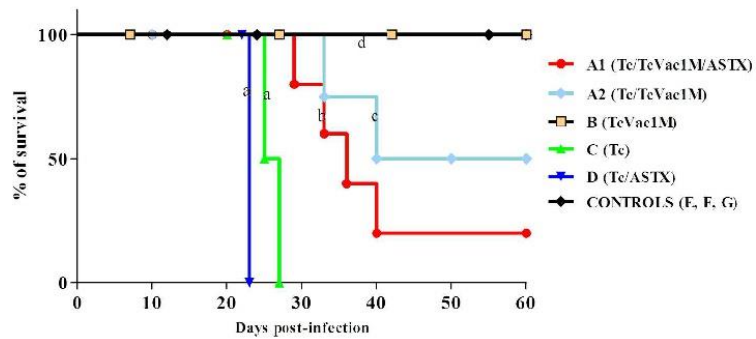


Figure 2. Survival percent found in BALB/c mice experimentally infected with *T. cruzi*. Animals were infected after a prophylactic vaccination with TcVac1M vaccine and then supplemented or not with ASTX. Statistical differences ( $p < 0.05$ ) among groups are shown with different literals.

171x82mm (300 x 300 DPI)

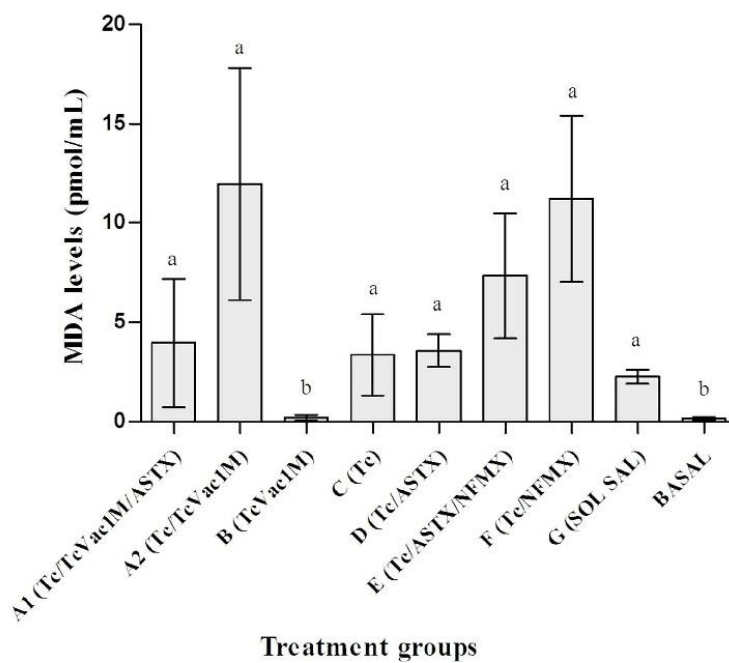


Figure 3. Malondialdehyde (MDA) serum levels in BALB/c mice 60 days after experimental infection with *T. cruzi*. Animals were infected after a prophylactic vaccination with TcVac1M vaccine and then supplemented or not with ASTX. Bars on each column represent standard deviation. Different alphabetical characters among groups indicate differences ( $p < 0.05$ ). Data was analyzed by ANOVA and Tukey test.

99x91mm (300 x 300 DPI)

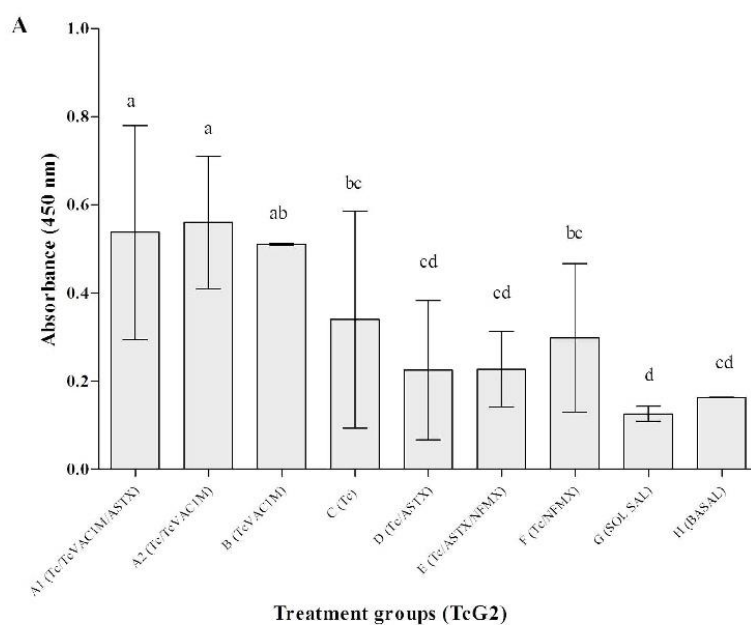


Figure 4. IgG serum levels against TcVac1M antigens in BALB/c mice 60 days after experimental infection with *T. cruzi*. Animals were infected after a prophylactic vaccination with TcVac1M vaccine and then supplemented or not with ASTX. A, IgG antibodies against TcG2 antigen; B, IgG antibodies against TcG4 antigen. Columns show mean values and bars show standard deviation. Data was analyzed through ANOVA and Tukey test. Differences are considered at a  $p < 0.05$ .

158x132mm (300 x 300 DPI)

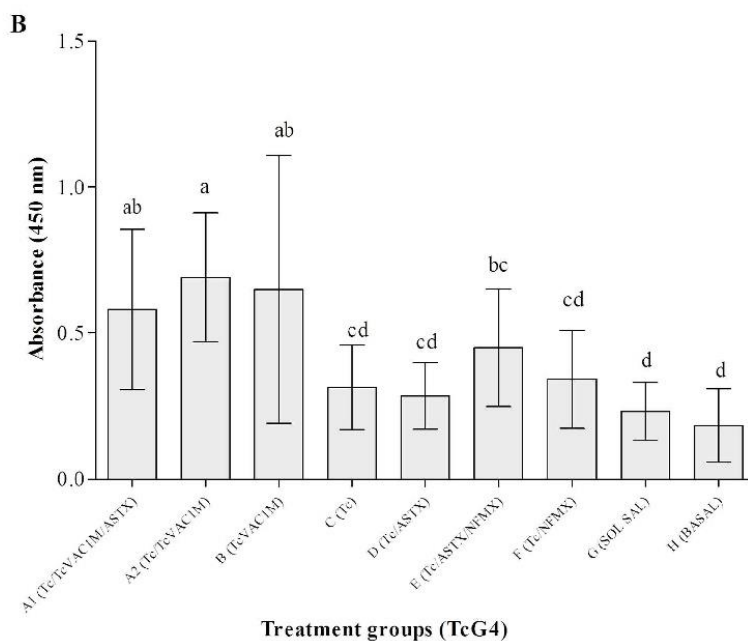


Figure 4. IgG serum levels against TcVac1M antigens in BALB/c mice 60 days after experimental infection with *T. cruzi*. Animals were infected after a prophylactic vaccination with TcVac1M vaccine and then supplemented or not with ASTX. A, IgG antibodies against TcG2 antigen; B, IgG antibodies against TcG4 antigen. Columns show mean values and bars show standard deviation. Data was analyzed through ANOVA and Tukey test. Differences are considered at a  $p < 0.05$ .

150x129mm (300 x 300 DPI)



## 11. DISCUSIÓN

Distintas investigaciones *in vitro* han reportado que antioxidantes presentes en extractos de algunas plantas muestran efecto detrimental sobre la viabilidad de diferentes parásitos (Abdel-Mageed *et al.*, 2012; Grazioplene *et al.*, 2012), esto incluye el orden de los tripanosomatidos (Ukachi *et al.*, 2015; Leite *et al.*, 2006; Uchiyama *et al.*, 2005; Maya *et al.*, 2007). De acuerdo con lo anterior, en nuestro laboratorio resultados iniciales *in vitro*, demostramos que la ASTX es capaz de inducir muerte celular a tripomastigotes de *T. cruzi* de manera dosis dependiente (Figura 24 y 35), con mecanismo de acción desconocido y donde células Vero son menos sensibles a las mismas dosis de ASTX empleadas, observando que solo a dosis superiores de ASTX (40 µg) la viabilidad en esta línea celular es comprometida (Figura 14). Sin embargo, al evaluar co-cultivo de células Vero y *T. cruzi* la respuesta a la ASTX es distinta, pues la viabilidad de *T. cruzi* (intracelular y extracelular) es comprometida solo a dosis de 30 µg, pero también las células Vero son afectadas (Tabla 11). Al observar este comportamiento se abordó la cuestión, si la ASTX sería capaz de controlar una infección experimental con *T. cruzi* utilizando como modelo biológico el ratón BALB/c. Los resultados no apoyaron nuestra hipótesis, ya que la ASTX a la dosis estimada empleada, no controló la carga parasitaria (Figura 15 A), mostrando incluso ser mayor en los ratones suplementados. Interesantemente la ASTX pareció interferir con la eficacia del fármaco NFMX contra la carga parasitaria, ya que los niveles de parasitemia observados en animales del grupo G3 (Tc/ASTX/NFMX) fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) y registrados por periodos más largos ( $p < 0.05$ ), que las registradas en los animales infectados y tratados sólo con NFMX (G4) (Figura 15B). Estudios similares efectuados por Wen *et al.* 2010, demostraron que la suplementación con PBN (fenil- $\alpha$ -tert-butil-nitrona) un antioxidante sintético, utilizado en ratas Sprague Dawley infectadas con *T. cruzi*, no disminuyó la carga parasitaria durante la fase aguda de la infección, por tanto podemos concluir que el uso de antioxidantes como la ASTX u otro conocido, no está indicado durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Contreras-Ortiz *et al.*, 2017). Empero, si tenemos en cuenta que la ASTX es un antioxidante más potente que las vitaminas E y C y además que muestra propiedades anti-inflamatorias e inmuno-moduladoras (Fassett & Coombes, 2012; Nakao *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010), podrían evaluarse durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, esta idea está apoyada por los hallazgos de Maçao *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010, quienes encontraron que la suplementación con vitaminas E y C después del uso de Benznidazol, redujo los niveles de estrés oxidativo y el riesgo de desarrollar cardiomiopatía chagásica en pacientes crónicos. Una pregunta que queda por responder es si la suplementación con ASTX, después de la administración de agentes anti-chagásicos como el Benznidazol o el Nifurtimox durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, sería de

alguna ayuda para evitar la progresión hacia cardiomiopatía chagásica crónica de los pacientes.

Por su parte, al evaluar la propuesta de la vacuna recombinante TcVac1M y la suplementación con el antioxidante exógeno ASTX en el mismo modelo biológico, soportamos los primeros resultados donde demostramos que la suplementación con ASTX no afecta al parásito y no disminuye los niveles de parasitemia, incluso, fue 4 veces mayor en que en el grupo vacunado con TcVac1M y desafiado con *T. cruzi* (Figura 20), en contraparte, en un trabajo reciente reportado por (Gupta *et al.*, 2015), demostraron que el uso de una vacuna compuesta de plásmidos que codifican para TcG2, TcG4, IL-12 y GM-CSF, y un refuerzo de proteína recombinante TcG2, TcG4 y saponina en ratones transgénicos que sobre-expresaban GPx (Glutación peroxidasa), fue capaz de disminuir la carga parasitaria y proteger a los ratones contra la infección de *T. cruzi*. Otros estudios aislados como los efectuados por Bathia & Garg en el 2008, empleando los antígenos TcG2, TcG4 y la cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* en ratones C57BL/6 reportaron control en un 50 a 90 % de la carga parasitaria en fase aguda. Evidentemente, en nuestro experimento con TcVac1M demostramos que no hay reducción en la carga parasitaria, pero la vacuna TcVac1M por si sola aplicada por electroporación intradérmica registró aumento en la sobrevida de los ratones BALB/c desafiados con la cepa NINOA de *T. cruzi*. Lo anterior nos va a permitir en un futuro rediseñar nuevas estrategias de vacunación y modo de liberación de los antígenos TcG2 y TcG4, así como dosis efectivas del antioxidante.

Derivado de los niveles de parasitemia, distintos porcentajes de sobrevida fueron registrados en los grupos de ratones de las dos estrategias experimentales, en el primero, donde se evaluó la suplementación con ASTX en ratones BALB/c desafiados con *T. cruzi*, los resultados muestran que el porcentaje de sobrevida (incluyendo el grupo de ratones suplementados con ASTX) fue del 0 % para los grupos G1 (Tc) y G2 (Tc/ASTX) a los días 22 y 23 post-infección, comparado con los controles no desafiados con *T. cruzi* que fue del 100 % para el día 60. En la segunda estrategia que involucra el uso de la vacuna recombinante TcVac1M, se registraron en los grupos A1 (Tc/TcVac1M/ASTX) y A2 (Tc/TcVac1M), porcentajes de sobrevida del 50 % y 25 % respectivamente para el día 60 post-infección (Figura 21). Sugiriendo que la suplementación con ASTX, no favorece en la mejora de salud de los ratones BALB/c infectados experimentalmente, ni aumenta la sobrevida de los mismos en ninguna de las dos estrategias experimentales. De hecho, la vacuna TcVac1M en ratones desafiados con el parásito, tiene una mejor respuesta contra la enfermedad, aunque con eficacia limitada contra *T. cruzi*. Al respecto, diversos estudios han evaluado el porcentaje de sobrevida en ratones desafiados con Tc a partir de antígenos distintos de *T. cruzi* en forma de vacunas de ADN con resultados prometedores, pero para TcVac1M no ha sido



previamente determinado el porcentaje de sobrevida en ratones BALB/c desafiados con el parásito. En la presente investigación reportamos porcentajes de sobrevida del 50% con TcVac1M, mayor a los logrados con antígenos pertenecientes a la familia de las transglucosidasas, como TSSA, epítotope ANYNFTLV (epítotope de célula T CD8+, derivado de un antígeno de *T. cruzi*) (Miyahira *et al.*, 2003; Miyahira *et al.*, 2005), pero menores a ASP-2 (proteína 2 de superficie de amastigote) (Boscardin *et al.*, 2003), TcSP (Salgado-Jiménez *et al.*, 2013) y TcSSP4 (Arce-Fonseca *et al.*, 2011; Arce-Fonseca *et al.*, 2013) con porcentajes de sobrevida cercanos al 100 % (Tabla 2). Pese al éxito obtenido en la sobrevida de los ratones con los antígenos mencionados anteriormente, Gupta & Garg, 2010 sugieren que TcG2 y TcG4 son buenos candidatos como antígenos vacunales, debido a que pueden activar el MHC de tipo I y II, elicitar una buena respuesta de los anticuerpos tripanolíticos y de las células T.

Ambas estrategias experimentales, en estudios histopatológicos del corazón mostraron resultados similares, en los ratones desafiados y suplementados con ASTX, se observó en ventrículo izquierdo, incremento en el número de infiltrado linfo-plasmocítico de tipo focal y necrosis de cardiomiocitos con menor registro en el número de nidos de amastigotes (Figuras 17A y Tabla 10). Estas diferencias sugieren que la ASTX tuvo un efecto inmunomodulador, lo que promovería la fuerte reacción inmunitaria observada. Por su parte la estrategia vacunal, demostró que TcVac1M tiene una mejor respuesta al inducir ligero infiltrado linfo-plasmocítico de tipo difuso y moderado de tipo focal, sin registro de nidos de amastigote (Tabla 12), que comparado con el grupo vacunado y suplementado con ASTX hubo registro de nidos de amastigotes e infiltrado moderado de tipo difuso y focal. Se ha informado que la ASTX al ser inmunomodulador induce la estimulación de la proliferación de los linfocitos T y B y las células NK, la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- $\alpha$ , así como incremento en la producción de anticuerpos contra diversos antígenos (Chew *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2010a; Aw, 1999; Okai & Higashi-Okai, 1996). Lo anterior nos sugiere que el uso de TcVac1M es adecuado para reducir los efectos patológicos de la infección aguda de *T. cruzi*, y que el antioxidante no debe ser usado durante la infección aguda de la enfermedad de Chagas. Sería interesante, por tanto, estudiar más a fondo si la ASTX podría ser empleado como fármaco terapéutico en la enfermedad de Chagas, ya sea en combinación con drogas anti-*T. cruzi* no inductoras de estrés oxidativo, o en combinación con el uso de vacunas antiparasitarias (profilácticas o terapéuticas). A partir de esta idea una nueva estrategia experimental empleando ASTX y la vacuna TcVac1M fue desarrollada y corresponde a la segunda etapa experimental de este trabajo.

Una característica de la enfermedad de Chagas es que se haya presencia de esplenomegalia en animales y humanos infectados con *T. cruzi*. Esta característica se debe a la respuesta

inflamatoria del huésped a la infección parasitaria (Pereira *et al.*, 2002), y a las especies reactivas de oxígeno (ERO) generado por neutrófilos y macrófagos en el bazo (Antunez & Cardoni, 2000; Aw, 1999), que inducen la expresión de genes inflamatorios que contribuyen a la inflamación (Kishimoto *et al.*, 2010). En el presente estudio, en referencia a la estrategia experimental que incluye animales desafiados con *T. cruzi* y suplementados con ASTX, se demostró que en los grupos control (no desafiados [G5-G8] ) no hay incremento en el tamaño promedio de bazo, el cual fue de 1,5 cm y con histología normal, no así en los animales de los grupos infectados (G1-G4) los cuales mostraron esplenomegalia y donde el tamaño promedio del bazo (Figura 16) fue de 2,3 cm, 53 % más largo en comparación con los grupos control no infectados. Otra característica observada a nivel microscópico en bazo fueron folículos linfoides hiperplásicos en todos los grupos desafiados (figura 18). Esta condición pudo haber ocurrido como un reflejo de la respuesta sistémica de la infección con *T. cruzi*, o posiblemente por la persistencia del parásito o sus antígenos en el bazo, tal como se ha observado en otros órganos, este fenómeno, implicaría la formación y recirculación de leucocitos que contribuyen al incremento de tamaño de los folículos linfoides (Pereira *et al.* 2002).

Por otra parte, durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas, el corazón del hospedero está expuesto a invasión y replicación del parásito y debido a las reacciones citotóxicas del propio sistema inmune hay presencia de estrés oxidativo, el cual es causado por altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos a partir de la estimulación de mediadores inflamatorios (Citocinas y quimiosinas), lo que causa lesión y muerte de cardiomiocitos y puede contribuir al desarrollo de cardiomiopatía chagásica (Wen *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2009). El estrés oxidativo es una de las principales características del sistema inmunológico que se activa durante el curso de la enfermedad de Chagas y conduce al desarrollo de cardiomiopatía chagásica (Gupta *et al.*, 2009). El nivel de estrés oxidativo puede ser medido de forma indirecta en suero a través de marcadores como el MDA, que es generado durante la peroxidación lipídica derivado del EO (Dittrich *et al.*, 2012). Nuestros resultados para la estrategia experimental de ratones suplementados con el antioxidante y desafiados con *T. cruzi*, mostraron diferencias estadísticas entre los niveles de MDA en suero de los grupos infectados (G3 y G4 grupos) y no infectados (G5-G8 grupos) (Figura 19). La infección por *T. cruzi* indujo EO y fue detectada por el ensayo de MDA. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre los niveles séricos de MDA de los grupos G3 (Tc/ASTX/NFMX [grupo suplementado]) y G4 (Tc/NFMX). Hemos planteado la hipótesis de que los animales que reciben ASTX tendría niveles más bajos de EO (Fassett & Coombes, 2012), pero no pudimos probarlo. Este resultado probablemente también podría explicarse si asumimos que las dosis de ASTX utilizadas en este experimento no fueron suficientemente altas para promover un efecto antioxidante detectable por el ensayo de MDA. En los

resultados de la estrategia vacunal, nuestra investigación demostró que el grupo suplementado con el antioxidante ASTX (A1: Tc/TcVac1M/ASTX) mostró niveles bajos de MDA (3.7 pmol/mL) estadísticamente diferentes ( $p < 0.0571$ ) al nivel de MDA del grupo A2 (TcVac1M/Tc), (11.9 pmol/mL), por lo que hay una disminución del estrés oxidativo. Los grupos tratados con NFMX (grupos E y F) registraron niveles de MDA de 7.3 y 11.2 pmol/mL respectivamente (Figura 22). En este sentido, se ha reportado, que el fármaco NFMX eleva los niveles de EO, porque su mecanismo de acción está basado en la producción de radicales libres que afectan al parásito (Castro, 2014). Es importante mencionar que el grupo control vacunal (B) no muestra niveles de MDA (Figura 22). Lo observado en el presente estudio concuerda con lo reportado en varios trabajos, donde mencionan que la ingesta de antioxidantes puede disminuir los niveles de EO (Fasset *et al.*, 2012), tal como observamos en las dos estrategias experimentales. Otros investigadores, han reportado que la suplementación con vitamina E y C en pacientes humanos chagasicos crónicos (Ribeiro *et al.*, 2010; Macao *et al.*, 2007) y la suplementación con antioxidantes sintéticos como PNB (fenil- $\alpha$ -terbutil-nitrona) en ratas evaluadas durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas (Wen *et al.*, 2010), reducen los niveles de EO y esto podría reducir el riesgo hacia el desarrollo de cardiomiopatía chagásica crónica (CMCC). Por tanto, sugerimos que la ASTX al disminuir los niveles de EO posiblemente prevenga el riesgo de progresión a CMCC, sin embargo, son necesarios más estudios al respecto. La ASTX aparentemente disminuye los niveles de EO, pero no reduce los niveles de parasitemia y el porcentaje de sobrevida no son mejorados. Se ha mencionado que en el sistema de antioxidantes endógenos (GPx, MnSOD, GSR y GSH) los cardiomiocitos se hacen insensibles y no tiene una respuesta adecuada y suficiente durante el progreso de la enfermedad de Chagas hacia fase crónica, después de que se generó una primera carga oxidativa en fase aguda (Wen *et al.*, 2004), por lo que es probable que suceda lo mismo con la ASTX. Otra posibilidad para explicar que la parasitosis no se controlada es que, se ha reportado que durante la infección con *T. cruzi* en etapa temprana, las células NK, linfocitos Th1 CD4+ y CD8+, comienzan a producir INF- $\gamma$ , lo que estimularía la producción de óxido nítrico (ON) por los macrófagos, la cual, en turno va a inhibir el desarrollo de la forma intracelular de *T. cruzi* (Alvarez *et al.*, 2011). Aparentemente el antioxidante ASTX está actuando como inhibidor en la producción del ON y en la actividad de los macrófagos, lo que resultaría en la ausencia del control de la carga parasitaria, tal como se detectó en los grupos G1 y A1.

Respecto a los niveles de anticuerpos IgG totales detectados en los ratones experimentales inmunizados con TcVac1M, podemos indicar que el tratamiento profiláctico con la vacuna de ADN recombinante a la dosis de 10  $\mu$ g, aplicada por el sistema de electroporación intradérmica, es capaz de elicitar una buena respuesta inmune ante la infección contra el parásito *T. cruzi*, sin necesidad del uso de adyuvantes, ya que se puede observar en todos los

grupos vacunados, incluido el control vacunal (A1, A2 y B), niveles altos de anticuerpos IgG para TcVac1M (89.9, 100, 92.5 % respectivamente), comparado con los grupos no vacunados C, D, E, F con valores de 53.04, 52.69, 51.23 % respectivamente (Figura 23 A y B), generando una respuesta protectora contra el parásito, que aunque no totalmente eficaz, logró aumentar la supervivencia de los ratones experimentales a los 60 días post-infección (Figura 21). Varios trabajos recientes reportan que el uso de la vacunación por electroporación intradérmica como método para liberar una vacuna, potencializa su efecto y estimula una respuesta inmune durable (Kulkarni *et al.*, 2014), Hegazi-Hassan *et al.*, (en proceso) demostraron, buena respuesta inmunológica por altos títulos de anticuerpos para grupos de ratones vacunados por electroporación intradérmica con TcG2 y TcG4, y un cambio de perfil inmunitario de Th1 (IgG2b / IgG1 > 1) a Th2 (IgG2b / IgG1 < 1) después del desafío con *T. cruzi*. Este sistema de vacunación también facilita a las células presentadoras de antígenos (CPA), células de Langerhans (CL) y células dendríticas (CD) su captación, además de ser poco invasiva y bien tolerada (Lamolinara *et al.*, 2015). Esto es respaldado por estudios realizados en perros, en bovinos, en primates y en humanos, que indican que las vacunas de ADN desnudo aplicadas intramuscularmente tienen un bajo nivel de expresión y por lo tanto una respuesta inmune sub-óptima, ya que el músculo no es un sitio eficiente para la presentación de antígenos, por la falta de cantidades adecuadas de células dendríticas (DCs), macrófagos y linfocitos, por lo que se necesitarían dosis de ADN hasta de 1000 veces más alta que la utilizada en ratones para inducir una respuesta inmune adecuada (Liu & Ulmer, 2005; Mumper & Ledebur, 2001) en perros u otros animales de tamaño grande (Aparicio-Burgos *et al.*, 2011). Por lo que de acuerdo con Hegazi-Hassan *et al.*, (en proceso) sugerimos que la vacunación por electroporación intradérmica es una buena estrategia de vacunación en infecciones experimentales contra *T. cruzi* y podría utilizarse en otros modelos biológicos como el canino. Por su parte el grupo de ratones a los cuales se le suplementa con ASTX (A1) tal como se demostró en los resultados, no mejora la respuesta inmune en la generación de anticuerpos para ambos antígenos (TcG2 y TcG4) y además permite la presencia de nidos de amastigotes en el corazón del grupo respectivo (A1) por lo que no recomendamos su uso durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Tabla 12), a pesar de que Chew *et al.*, en el 2010, reportara incremento de IgG e IgM en perros vacunados con Vanguard5™ y suplementados con ASTX, el cual moduló la respuesta humoral e incrementando los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-2, misma respuesta observada en ratones BALB/c al ser inoculado con lipopolisacáridos, mejorando la respuesta Th1 (Kuan Hung *et al.*, 2015). Nuestro grupo de trabajo demostró que la suplementación con ASTX, induce infiltrado linfoplasmocítico de tipo difuso en corazón de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (Contreras-Ortiz *et al.*, 2017), Gupta & Garg, 2010 demostraron que el uso de la vacuna TcVac2 en ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* cepa Sylvio X10/4 induce una buena respuesta antígeno específico de tipo IgG2 y elicita una buena respuesta de células T CD+8 asociadas con citosinas tipo 1,

además de que indujo un menor infiltrado inflamatorio y redujo la fibrosis en corazón. Al respecto nosotros determinamos que TcVac1M induce leve infiltrado linfo-plasmocítico de tipo focal en el corazón de los ratones experimentales, lo que permite la ausencia de nidos de amastigotes en dicho órgano, por lo que afirmamos que el uso de TcVac1M es adecuado en una infección contra *T. cruzi*, más no del antioxidante, debido a que el uso de este último permite la presencia de nidos de amastigotes ( $33 \pm 12.8$ ) en corazón (A1) (Tabla 12). La tendencia a presentar procesos inflamatorio moderados, altos títulos de anticuerpos IgG y ningún nido de amastigote, puede confirmar la fuerte estimulación de la respuesta inmune de tipo 1 por la TcVac1M, que podría ser necesaria para controlar la infección en tejidos de ratones chagasicos crónicos, esta respuesta puede ser útil durante la fase crónica para evitar el desarrollo patológico de la enfermedad, tal como se ha observado en perros inmunizado con TcVac4 (Aparicio-Burgos *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario considerar que la respuesta inmune de tipo 1 puede ser perjudicial si es persistente, esta interpretación es consistente con estudios en ratones deficientes de IL-4 los cuales tenían una fuerte respuesta inmune sesgada a Th1 que dio como resultado el control de la carga parasitaria en la infección aguda de *T. cruzi*, pero indujo una inflamación exacerbada en el tejido cardiaco (Soares *et al.*, 2001).

## 12. CONCLUSIONES

No se sugiere el uso de ASTX durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, ya sea solo, ni en combinación con fármacos terapéuticos que inducen estrés oxidativo, como NFMX. Sin embargo, podrían existir efectos benéficos potenciales de ASTX si se usan en fase crónica de la enfermedad de Chagas o en combinación con fármacos antiparasitarios no inductores de EO. Demostramos que el uso de la vacuna TcVac1M induce una buena respuesta inmune de tipo Th1, contra una infección inducida por *T. cruzi* cepa NINOA en ratones BALB/c, con un 50 % de sobrevivencia de los ratones inmunizados con TcVac1M por vía intradérmica a partir del método de electroporación, induciendo leve infiltrado linfoplasmocítico moderado sin registro de nidos de amastigotes en corazón. La suplementación con ASTX en ratones inmunizados con TcVac1M reduce los niveles de EO en los ratones desafiados. Sin embargo, éste no controla o reduce la carga parasitaria, ni mejora la respuesta en la producción de anticuerpos y permite la presencia de nidos de amastigotes en corazón, por lo que no recomendamos su uso en conjunto con TcVac1M.

### 13. REFERENCIAS

- Abd Ellah, M.R., 2010. Involvement of free radicals in animal diseases. *Comparative Clinical Pathology*, 19(6), pp.615–619.
- Abdel-Mageed, W.M. et al., 2012. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia*, 83(3), pp.500–507. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.025>.
- Abuhab, A. et al., 2013. Chagas' cardiomyopathy: The economic burden of an expensive and neglected disease. *International Journal of Cardiology*, 168(3), pp.2375–2380. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.262>.
- Acosta-Viana, K. et al., 2013. Antibody delivery into viable epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* as a tool to study the parasite biology. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(6), pp.719–726. Available at: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/abb.2013.46095>.
- Algatechnologies, 2010. *Astaxanthin and Human Health*, Available at: <http://www.algatech.com/>.
- Alvarez, M.N. et al., 2011. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: Consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), pp.6627–6640.
- Anarjan, N. & Tan, C.P., 2013. Effects of selected polysorbate and sucrose ester emulsifiers on the physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. *Molecules*, 18(1), pp.768–777.
- Andrade, J.P. de et al., 2010. I Latin American Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas' Heart Disease . Executive Summary. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 96(6), pp.434–442. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2011000600002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2011000600002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt).
- Andrade, Z., 1983. Mechanisms of myocardial damage in *T. cruzi* infection, Ciba Foundation Symposium 99. In *Cytopathology of parasitic diseases*.
- Antunez, M.I. & Cardoni, R.L., 2000. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett*, 71(2), pp.103–109. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10714437](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10714437).
- Aparicio-Burgos, J.E. et al., 2015. Immune Protection against *Trypanosoma cruzi* Induced by TcVac4 in a Canine Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(4), pp.1–16.
- Aparicio-Burgos, J.E. et al., 2011. Testing the efficacy of a multi-component DNA-prime/DNA-boost vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5).
- Arce-Fonseca, M. et al., 2011. A DNA vaccine encoding for TcSSP4 induces protection against acute and chronic infection in experimental Chagas disease. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), pp.1230–1238.



- Arce-Fonseca, M. et al., 2015. Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. *Parasites & vectors*, 8, p.121. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4343048&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Arce-Fonseca, M. et al., 2013. Specific humoral and cellular immunity induced by *Trypanosoma cruzi* DNA immunization in a canine model. *Veterinary Research*, 44(1), pp.1–9.
- Aufderheide, A.C. et al., 2004. A 9 , 000-year record of Chagas ' disease.
- Avello, M. & Suwalsky, M., 2006. Radicales libres , antioxidantes naturales y mecanismos de protección \*. , pp.161–172.
- Aw, T.Y., 1999. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes. *The American journal of clinical nutrition*, 70, pp.557–565.
- Barbosa-Piiego, A. et al., 2009. *Trypanosoma cruzi* Circulating in the Southern Region of the State of Mexico (Zumpahuacan) Are Pathogenic: A Dog Model. *Am J Trop Med Hyg*, 81(3), pp.390–395.
- Barros, M. V et al., 2001. Tissue Doppler imaging enables the identification of diastolic dysfunction of pseudonormal pattern in Chagas' disease. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 14(5), pp.353–359.
- Benvenuti, L. et al., 2008. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 102(6), pp.481–487.
- Bhatia, V. et al., 2004. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. *Infection and Immunity*, 72(11), pp.6245–6254.
- Bhatia, V. & Garg, N.J., 2008. Previously unrecognized vaccine candidates control *Trypanosoma cruzi* infection and immunopathology in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(8), pp.1158–1164.
- Bogitsh, B., Carter, C. & Oeltmann, T., 2005. *Human parasitology* E. A. Press, ed.,
- Bonney, K.M. & Engman, D.M., 2008. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? *Current Molecular Medicine*, 8(6).
- Boscardin, S.B. et al., 2003. Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* Elicits Protective Immune Response against Experimental Infection Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* Elicits Protective Immune Response against Experiment. , 71(5), pp.2744–2757.
- Brener, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4, pp.389–396.
- Brigelius-Flohe, R. et al., 2002. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *The American journal of clinical nutrition*, 76(4), pp.703–716. Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=12324281>.
- Cabeza, M.P., Chambo, J.G. & Laguens, R.P., 1988. Differences in resistance to reinfection with low and high inocula of *Trypanosoma cruzi* in chagasic mice treated with

- nifurtimox and relation to immune response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(2), pp.241–245.
- Camandaroba, E.L. et al., 2003. Trypanosoma cruzi: Susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(2), pp.201–209.
- Camandaroba, E.L.P., Pinheiro Lima, C.M. & Andrade, S.G., 2002. Oral transmission of Chagas disease: Importance of Trypanosoma cruzi biotome in the intragastric experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(2), pp.97–103.
- Carlomagno, M. et al., 1989. *Informe sobre Chagas*,
- Castro, J., 2014. EFECTOS TÓXICOS DE LOS FÁRMACOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Un problema frecuente en la quimioterapia de las enfermedades tropicales. *CIENCIA E INVESTIGACIÓN*, 64(5).
- Cazorla, S.I. et al., 2008. Oral vaccination with Salmonella enterica as a cruzipain-DNA delivery system confers protective immunity against Trypanosoma cruzi. *Infection and Immunity*, 76(1), pp.324–333.
- Cazorla, S.I., Frank, F.M. & Malchiodi, E.L., 2009. Vaccination approaches against Trypanosoma cruzi infection. *Expert review of vaccines*, 8(7), pp.921–935.
- CDC-DPDx, 2015. American Trypanosomiasis: Biology. Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> [Accessed January 1, 2017].
- Cencig, S. et al., 2012. Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome?? in mice infected with Trypanosoma cruzi strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(6), pp.527–532. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.08.002>.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), pp.159–218.
- Chauhan, A. & Chauhan, V., 2006. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*, 13(3), pp.171–181.
- Chew, B.P. et al., 2011. Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140(3–4), pp.199–206. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.12.004>.
- Contreras-Ortiz, J.M.E. et al., 2017. Effects of astaxanthin in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi. *Parasite*, 24, p.17. Available at: <http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2017018>.
- Curty, L. et al., 2016. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising mechanism against Trypanosoma cruzi. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), pp.154–164.
- Dhiman, M. et al., 2013. Innate Immune Responses and Antioxidant/Oxidant Imbalance Are Major Determinants of Human Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8).
- Diáz-Limay, E., Escalante, H. & Jara, C.A., 2004. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en Mus musculus BALB / c infectado con Trypanosoma cruzi obtenido de Panstrongylus chinai del Valle Chamán , La Libertad - Perú. *Parasitol*

- Latinoam*, 53, pp.153–158.
- Dittrich, R. et al., 2012. Influence of maternal smoking during pregnancy on oxidant status in amniotic fluid. *In vivo (Athens, Greece)*, 26(5), pp.813–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949594>.
- Donnelly, J.J., Wahren, B. & Liu, M.A., 2005. DNA Vaccines: Progress and Challenges. *the Journal of immunology*, 175, pp.633–639.
- Drabick, J.J. et al., 2001. Cutaneous Transfection and Immune Responses to Intradermal Nucleic Acid Vaccination Are Significantly Enhanced by in Vivo Electropermeabilization. *Molecular Therapy*, 3(2), pp.249–255. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001600902570>.
- Duthie, G. & Crozier, A., 2000. Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology*, 11(1), pp.43–47.
- El-Sayed, N.M. et al., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), pp.409–415.
- Estrada-Franco, J.G. et al., 2006. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), pp.624–630.
- Fassett, R.G. & Coombes, J.S., 2012. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules*, 17(2), pp.2030–2048.
- Ferrans, V.J. et al., 1988. Basement membrane thickening in cardiac myocytes and capillaries in chronic Chagas' disease. *The American Journal of Cardiology*, 61(13), pp.1137–1140.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), pp.239–247.
- Frei, B., Stocker, R. & Ames, B.N., 1988. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), pp.9748–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3200852>.
- Fumadó, V. et al., 2014. Chagas pedi??trico en zona no end??mica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(5), pp.293–296.
- García-Alvarez, A. et al., 2010. Chagas cardiomyopathy: The potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9).
- Garg, N. & Tarleton, R.L., 2002. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*, 70(10), pp.5547–5555.
- Gascon, J., Bern, C. & Pinazo, M.J., 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*, 115(1–2), pp.22–27.
- German, J.B., 1999. Food processing and lipid oxidation. *Advances in experimental medicine and biology*, 459, pp.23–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10335367>.
- Giese, M., 1998. DNA-antiviral vaccines: new developments and approaches--a review. *Virus genes*, 17(3), pp.219–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9926398>.
- Goto, S. et al., 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid

- membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1512(2), pp.251–258.
- Graziose, R. et al., 2012. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(2), pp.456–461. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.017>.
- Griendling, K.K., 2004. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart*, 90(5), pp.491–493. Available at: <http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/hrt.2003.029397>.
- Guerin, M., Huntley, M.E. & Olaizola, M., 2003. Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), pp.210–216.
- Gupta, S. et al., 2015. Therapeutic efficacy of a subunit vaccine in controlling chronic *Trypanosoma cruzi* infection and chagas disease is enhanced by glutathione peroxidase over-expression. *PLoS ONE*, 10(6), pp.1–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130562>.
- Gupta, S. & Garg, N.J., 2010. Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), pp.9–13.
- Gupta, S., Wen, J.-J. & Garg, N.J., 2009. Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, pp.1–8.
- Henderson, N., 2000. The Discovery of Organic Free Radicals by Moses Gomberg. , pp.1–8. Available at: <http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/freeradicals.html>.
- Hensley, K. et al., 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), pp.1456–1462. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584900002525>.
- Hotez, P.J. et al., 2008. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9).
- Hussein, G. et al., 2006. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. , pp.443–449.
- Huygen, K., 2005. Plasmid DNA vaccination. *Microbes and Infection*, 7(5–6), pp.932–938.
- Iwabayashi, M. et al., 2009. Efficacy and safety of eight-week treatment with astaxanthin in individuals screened for increased oxidative stress burden. *Anti-Aging Medicine*, 6(4), pp.15–21.
- Johnson, E. & Schroeder, W., 1995. Microbial carotenoids. In A. in biochemical Engineering/biotechnology, ed. *Microbial carotenoids*. Berlin Heidelberg New York: Springer, pp. 297–326.
- Kavitha, K. et al., 2013. Astaxanthin inhibits NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(10), pp.4433–4444. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.032>.
- Kishimoto, Y. et al., 2010. Astaxanthin suppresses scavenger receptor expression and matrix metalloproteinase activity in macrophages. *European Journal of Nutrition*,

- 49(2), pp.119–126.
- Knight, J.A., 1998. Free radicals: Their history and current status in aging and disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 28(6), pp.331–346.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. & Nagai, S., 1991. Astaxanthin production by a green-alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate medium. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(5), pp.335–339. Available at: <http://isi02.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Frame>.
- Kowalska, A., Kowalski, P. & Torres, M. & Angel T., 2011. Chagas disease - American trypanosomiasis. *Polish Annals of Medicine*, 18(1), pp.156–167. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1230-8013\(11\)70035-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1230-8013(11)70035-2).
- Kuan Hung, L. et al., 2015. Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN- $\gamma$  and IL-2 secretion in primary cultured lymphocytes in Vitro and ex Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), pp.1–10.
- Kuhn, R.E., Vaughn, R.T. & Herbst, G.A., 1975. The effect of bcg on experimental cutaneous Leishmaniasis in mice. *International journal of parasitology*, 5, pp.557–560. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0017645481&partnerID=40&md5=14539a0b55023123bb249cd6f3ad4a79>.
- Kulkarni, V. et al., 2014. DNA vaccination by intradermal electroporation induces long-lasting immune responses in rhesus macaques. *Journal of Medical Primatology*, 43(5), pp.329–340.
- Kurashige, M. et al., 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiological chemistry and physics and medical NMR*, 22(1), pp.27–38.
- Kutzler, M.A. & Weiner, D.B., 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet*, 9(10), pp.776–788.
- Lamolinará, A. et al., 2015. Intradermal DNA Electroporation Induces Cellular and Humoral Immune Response and Confers Protection against HER2 / neu Tumor. , 2015.
- Lee, B.Y. et al., 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. , 13(4), pp.342–348.
- Leite, J.P. V et al., 2006. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29(11), pp.2307–2309.
- Leslie M., 2011. A Neglected Disease. *Science*, 333(August), pp.933–935.
- Lightfoot, T.J. et al., 2006. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 91(9), pp.1222–1227.
- Liu, M.A. & Ulmer, J.B., 2005. Human Clinical Trials of Plasmid DNA Vaccines. *Advances in Genetics*, 55(5), pp.25–40.
- Liu, T. et al., 1999. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Journal of biomedical science*, 6(4), pp.226–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10420080>.
- Lobo, V. et al., 2010. Free radicals , antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8).
- Lopez, M. et al., 2004. Vacunas de Nueva Generación. *Genoma España*.
- Maçao, L.B. et al., 2007. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic

- cardiopathy associated with Chagas' disease. *International Journal of Cardiology*, 123(1), pp.43–49.
- Manning-Cela, R. et al., 2001. LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and ...*, 69(6), pp.3916–3923. Available at: <http://iai.asm.org/content/69/6/3916.short>.
- Marin-Neto, J.A. et al., 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115(9), pp.1109–1123.
- Martínez-Ibarra, J.A. et al., 2012. The biology of three Mexican-American species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): *Triatoma recurva*, *Triatoma protracta* and *Triatoma rubida*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5), pp.659–663. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0074-02762012000500013&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0074-02762012000500013&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- Mattill, H.A., 1947. Antioxidants. *Annual review of biochemistry*, 16, pp.177–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20259061>.
- Maussalem, J. et al., 2006. Adjuvant effect of the Propionibacterium acnes and its purified soluble polysaccharide on the immunization with plasmidial DNA containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Microbiol Immunol*, 50(4), pp.253–263. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16625047](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16625047).
- Maya, J.D. et al., 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 146(4), pp.601–620.
- Meyers, S.P. & Bligh, D., 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 29(3), pp.505–508. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00105a017>.
- Miyahira, Y. et al., 2003. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide impairs DNA vaccine-induced protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infect.Immun.*, 71(3), pp.1234–1241.
- Miyahira, Y. et al., 2005. Immune Responses against a Single CD8 + -T-Cell Epitope Induced by Virus Vector Vaccination Can Successfully Control *Trypanosoma cruzi* Infection Immune Responses against a Single CD8 2 -T-Cell Epitope Induced by Virus Vector Vaccination Can Successfully C. , 73(11), pp.7356–7365.
- Mota-Sánchez, J., 2009. Vacunas de ADN: Inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Publica de Mexico*, 51(SUPPL.3), pp.463–469.
- Mumper, R.J. & Ledebur, H.C., 2001. Dendritic cell delivery of plasmid DNA. Applications for controlled genetic immunization. *Molecular biotechnology*, 19(1), pp.79–95.
- Nakao, R. et al., 2010. Effect of astaxanthin supplementation on inflammation and cardiac function in BALB/c mice. *Anticancer Research*, 30(7), pp.2721–2725.
- NAS, 2011. *GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS*, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595115>.
- NOM, 1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Nom-062-Zoo*, pp.1–58.
- NOM, 1995. *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1995*,

- Okai, Y. & Higashi-Okai, K., 1996. Possible immunomodulating activities of carotenoids in in vitro cell culture experiments. *International Journal of Immunopharmacology*, 18(12), pp.753–758. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0192056197855580>.
- OMS, 2017. *La enfermedad de Chagas (triptanosomiasis americana)*, Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.
- OPS, 2002. La salud en las Américas, Volumen I, Edición 2002. *Ops-Oms*, 1(587), p.473.
- Padayatty, S.J. et al., 2003. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), pp.18–35. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2003.10719272>.
- Park, J.S., Chyun, J.H., et al., 2010a. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & metabolism*, 7(18), pp.1–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2845588&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Park, J.S., Chyun, J.H., et al., 2010b. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & metabolism*, 7, p.18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2845588&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Park, J.S., Kim, H.W., et al., 2010. Astaxanthin uptake in domestic dogs and cats. *Nutrition & metabolism*, 7, p.52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2898833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pereira, S.A. et al., 2002. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, 66(4), p.401–3.
- Plotkin, S.A., 2008. Vaccines: Correlates of Vaccine- Induced Immunity. *Clinical Infectious Diseases*, 47(3), pp.401–409. Available at: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/589862>.
- Prata, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet. Infectious diseases*, 1(2), pp.92–100. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309901000652>.
- Rassi, A. et al., 2009. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*, 95(7), pp.524–534. Available at: <http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/hrt.2008.159624>.
- Rassi, A., Rassi, A. & Marcondes de Rezende, J., 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), pp.275–291.
- Rassi, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), pp.1388–1402. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- Rassi, A.J., Rassi, A. & Litle, W., 2000. Chagas' Heart Disease. *Clin. Cardiol*, 23, pp.883–889.
- Renström, B. et al., 1981. Optical purity of (3S,3'S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry*, 20(11), pp.2561–2564.
- Reyes-Sandoval, A. & Hildegun, E., 2001. DNA Vaccine. *Current Molecular Medicine*,



- 1(2), pp.217–243.
- Ribeiro, A.L. et al., 2012. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, 9(10), pp.576–589. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2012.109>.
- Ribeiro, A.L. et al., 2013. Electrocardiographic Abnormalities in *Trypanosoma cruzi* Seropositive and Seronegative Former Blood Donors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2).
- Ribeiro, C.M. et al., 2010. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benznidazole in chronic Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, 145(1), pp.27–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.06.033>.
- Roca, C. et al., 2011. Chagas disease among the latin american adult population attending in a primary care center in Barcelona, Spain. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4).
- Rolón, M. et al., 2006. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 99(2), pp.103–107.
- Rowland, E.C. & Sibley-Phillips, S., 1984. Bone marrow eosinophil levels in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *The Journal of parasitology*, 70(5), pp.819–820.
- Salazar-Schettino, P.M. et al., 2016. Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 59(3).
- Salgado-Jiménez, B. et al., 2013. Differential immune response in mice immunized with the A, R or C domain from TcSP protein of *Trypanosoma cruzi* or with the coding DNAs. *Parasite Immunology*, 35(1), pp.32–41.
- Sambrook, J. & Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Schallreuter, K.U. et al., 2007. Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress disrupts calcium binding on calmodulin: More evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(1), pp.70–75.
- Scheer, H., 2008. *Chlorophylls and Carotenoids, Chemistry of* 2nd ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00134-1> <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470048672.webc083>.
- Scnapp A, Eickhoff C, Sharfstein J, H.D., 2002. Induction of B and T cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes.Infect.*, 4(1286–4579 LA–eng PT–Journal Article), pp.805–813.
- Shedlock, D.J. & Weiner, D.B., 2000. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of leukocyte biology*, 68(6), pp.793–806. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129646>.
- Shimidzu, N., Goto, M. & Miki, W., 1996. Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms. *Fisheries science*, 62(1), pp.134–137.
- Shroff, K.E. et al., 1999. Potential for plasmid DNAs as vaccines for the new millennium. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 2(5), pp.205–212.
- Silva, C.F. et al., 2007. Cellular Effects of Reversed Amidines on *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11).
- Silveira, A.C., 2011. New challenges and the future of control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), pp.122–124. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-)

- 86822011000800016&lng=en&nrm=iso&tlng=en%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0037-86822011000800016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.
- Silveira, A.C. & Dias, J.C.P., 2011. O controle da transmissão vetorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(SUPPL. 2), pp.52–63.
- Simpson, L., 1987. THE MITOCHONDRIAL GENOME OF KINETOPLASTID PROTOZOA: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. *Rev. Microbiol*, 41, pp.363–62.
- Soares, M.B.P. et al., 2001. Modulation of Chagasic Cardiomyopathy by Interleukin-4. *The American Journal of Pathology*, 159(2), pp.703–709. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010617415>.
- Srivastava, I.K. & Liu, M.A., 2003. Gene Vaccines. *Annals of Internal Medicine*, 138(7), p.550–559+I48.
- Stefanis, L., Burke, R.E. & Greene, L.A., 1997. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Current Opinion in Neurology*, 10(4), pp.299–305. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00019052-199708000-00004>.
- Tarleton, R.L., 2007. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), pp.430–434.
- Telmed.org, 2009. Atlas de Parasitología. Available at: <http://www.telmeds.org/atlas/parasitologia/flagelados/trypanosoma-sp/trypanosoma-cruzi/trypanosoma-cruzi-tripomastigote-en-sangre/> [Accessed January 1, 2017].
- Uchiyama, N. et al., 2005. Antichagasic Activity of Komaroviquinone Is Due to Generation of Reactive Oxygen Species Catalyzed by. *Society*, 49(12), pp.5123–5126.
- Ukachi, E. et al., 2015. Antitrypanosomal and Antioxidant Activities of Moringa Oleifera Lam Leaf Extracts. , 3(MAY), pp.17–23.
- Urbina, J.A. & Docampo, R., 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. *Trends in Parasitology*, 19(11), pp.495–501.
- Valenzuela V, C. & Pérez M, P., 2016. Actualización En El Uso De Antioxidantes Naturales Derivados De Frutas Y Verduras Para Prolongar La Vida Útil De La Carne Y Productos Cárneos. *Revista chilena de nutrición*, 43(2), pp.12–12. Available at: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182016000200012&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182016000200012&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- Wen, J.-J. et al., 2010. Phenyl- $\alpha$ -tert-butyl-nitron and Benzonidazole Treatment Controlled the Mitochondrial Oxidative Stress and Evolution of Cardiomyopathy in Chronic Chagasic Rats. *J Am Coll Cardiol*, 55(22), pp.2499–2508.
- Wen, J.-J. et al., 2008. Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Microbes Infect.*, 16(3), pp.214–220.
- Wen, J.J. et al., 2006. Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(2), pp.270–276.
- Wen, J.J., Vyatkina, G. & Garg, N., 2004. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: Role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(11), pp.1821–1833.
- Y.Naguib et al., 2000. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids.

*J.Agric.Food Chem*, 48, pp.1150–1154.

Zacks, M. et al., 2005. An overview of chagasic cardiomyopathy: Pathogenic importance of oxidative stress. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 77(4), pp.695–715.

## 14. ANEXOS

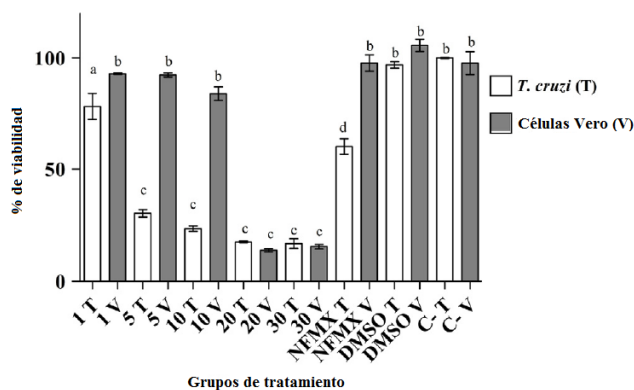


Figura 14. Porcentaje de viabilidad de trypomastigotes de *T. cruzi* y células Vero después del tratamiento con diferentes dosis de ASTX (1, 5, 10, 20 ó 30 µg/100 µl). Se usaron Nifurtimox (NFMX, 400 µg/100 µl), Dimetilsulfóxido (DMSO, 0,03%) ó ningún tratamiento fueron usados como controles para el ensayo de viabilidad del MTS. Las muestras se evaluaron después de 24 horas de tratamiento. Cada barra representa el valor medio de absorbancia  $\pm$  SD. Las diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los grupos, según la prueba de Tukey, se indican con caracteres en la parte superior de las barras de tratamiento.

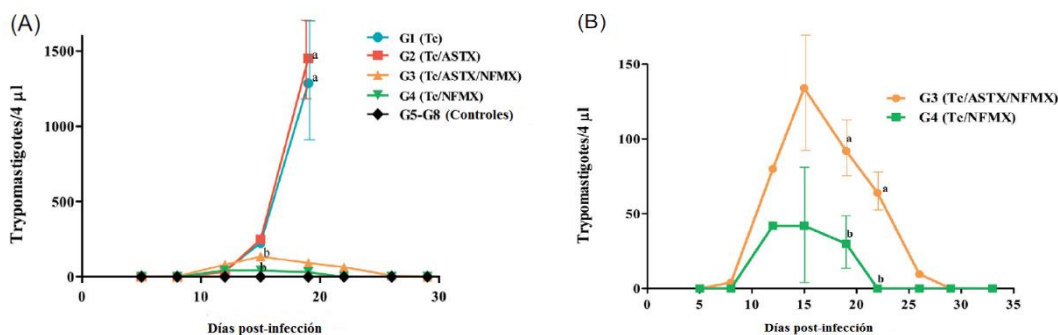


Figura 15. (A):

Parasitemia en sangre observada en ratones infectados con *T. cruzi* (Tc) y tratados con astaxantina (ASTX) y/o Nifurtimox (NFMX). Los controles incluyeron animales infectados sin tratamiento alguno (G1), o animales tratados con ASTX y/ o NFMX sin infección por *T. cruzi* (G5-G8). Se recogieron muestras de sangre (4 µl) y se analizaron microscópicamente cada dos días entre los días 5 y 60 después de la infección. Número promedio de parásitos  $\pm$  SD, (B): Detalle de la parasitemia para los grupos G3 (Tc/ASTX/NFMX) y G4 (Tc/NFMX). Diferentes caracteres encima de las líneas muestran diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, dentro del mismo día de muestreo según la prueba de Tukey.

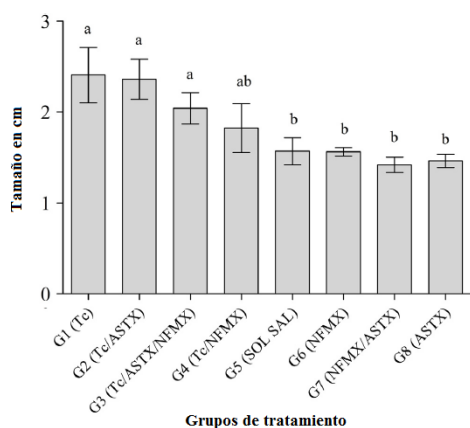


Figura 16. Tamaño de bazo de animales infectados experimentalmente con *T. cruzi*. Los bazos se recogieron inmediatamente después de la muerte de los animales, debido a la infección, o por el día del sacrificio (60 días después de la infección). Cada barra representa el valor del tamaño promedio  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos se muestran con diferentes caracteres por encima de las barras de acuerdo con la prueba de Tukey.

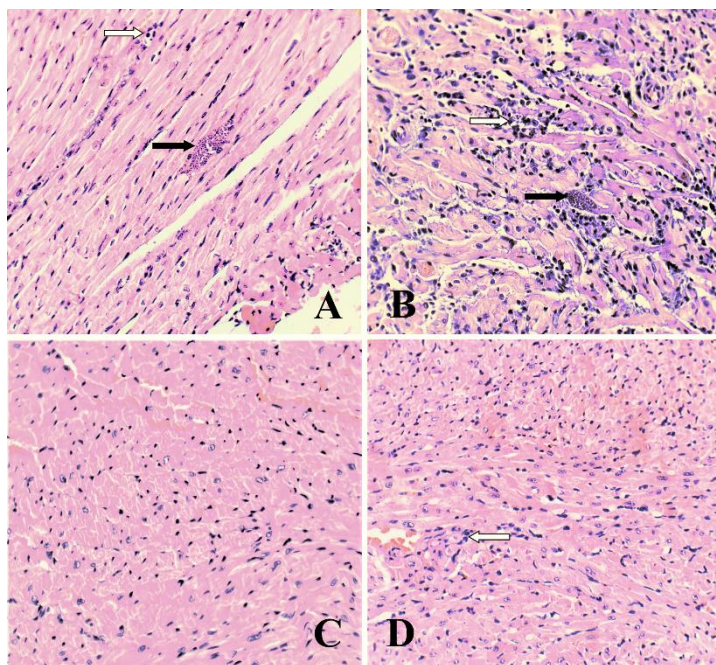


Figura 17. Análisis histológico de secciones de tejidos del corazón de ratones infectados con *T. cruzi*, tratados con astaxantina y/o Nifurtimox. Las secciones de tejido cardiaco del ventrículo izquierdo se procesaron el día en que los animales murieron (ya sea por infección o cuando se sacrificaron al día 60 después de la infección). Se tiñeron secciones de tejido (5  $\mu$ m) con hematoxilina-eosina. Se muestran micrografías representativas de ratones de los grupos: A, G1 (Tc); B, G2 (Tc/ASTX); C, G5 (solución salina); D, G8 (ASTX). La micrografía de G5 representa a los grupos de G3-G7, todos ellos se consideraron histológicamente normales. Flecha negra, nidos amastigotes; Flecha blanca, infiltrado linfo-plasmocítico. (Amplificación de 400X).

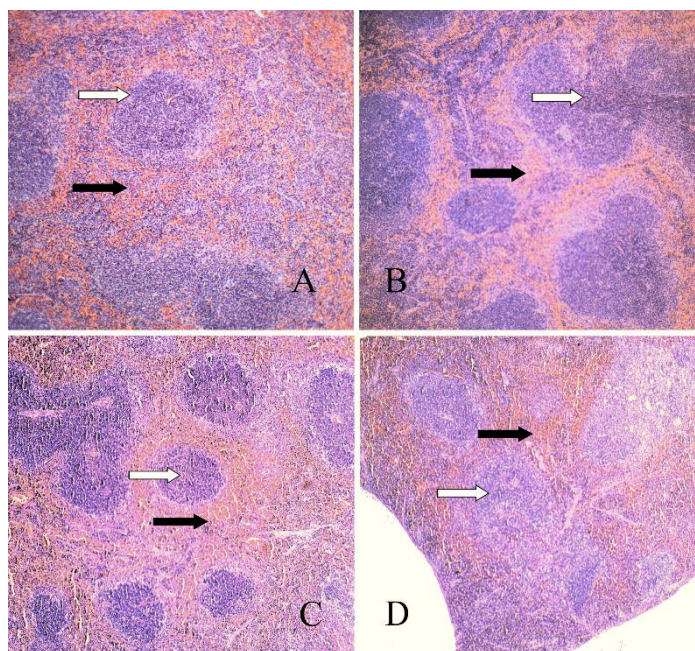


Figura 18. Análisis histológico de secciones de tejido del bazo de ratones infectados con *T. cruzi*, tratados con Astaxantina y/o Nifurtimox. Se obtuvieron secciones de tejido de bazo (5  $\mu$ m) a los 60 días después de la infección o en el momento en que los animales murieron por infección y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se muestran micrografías representativas de ratones (BALB/c) de los siguientes grupos: A: G1 (Tc); B: G2 (Tc/ASTX); C: G5 (solución salina); D: G8 (ASTX). Micrografía de G5 representa a los grupos de G3-G7, todos ellos se consideraron histológicamente normales. Flecha blanca: folículos linfoides; Flecha negra: pulpa roja.

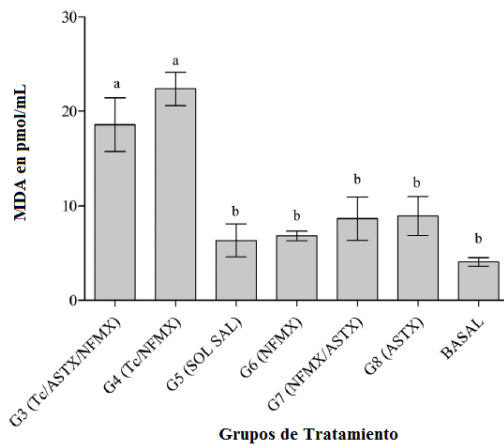


Figura 19. Niveles séricos de MDA en animales post-infección experimental con *T. cruzi* bajo tratamientos (G3-G8) al día del sacrificio (60 post-infección). Cada barra representa el valor promedio en pmol/mL  $\pm$  SD. Las diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos se muestran con diferentes caracteres por encima de las barras. Los grupos G1 y G2 no se incluyeron porque los ratones murieron antes del día 30 después de la infección.

Tabla 10. Anomalías histopatológicas miocárdicas encontradas en ratones durante la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi* (60 días después de la infección).

Parámetros/Grupo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
linfo-plasmocitos focales	-	++	+	+	-	-	-	-
linfo-plasmocitos difusos	+	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de cardiomiocitos	+	++	+	+	-	-	-	-
Nidos de amastigotes (media ± SD)	35 ± (3.9)	24 ± (3.05)	0	0	0	0	0	0

Grupos de tratamiento: G1: *T. cruzi*; G2: *T. cruzi*/ASTX; G3: *T. cruzi*/ASTX/NFMX; G4: *T. cruzi*/NFMX; G5: solución salina; G6: NFMX; G7: ASTX/NFMX; G8: ASTX. Escala de anomalías: -, Ninguna; +, Ligera; ++, moderado; +++, severa; ±: desviación estándar.

Tabla 11. Efecto de ASTX en cultivo de células Vero infectadas con *T. cruzi* (24 h post-tratamiento).

ASTX ó dosis de NFMX	1 µg		5 µg		10 µg		20 µg		30 µg		NFMX 400 µg	
	Tc	Vc	Tc	Vc	Tc	Vc	Tc	Vc	Tc	Vc	Tc	Vc
PI	+		+		+		+		-		-	
PE	+		+		+		+		-		-	
Motilidad	+		+		+		+		-		-	
Viabilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
perdia de forma celular	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
integridad de la membrana celular	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Dosis de ASTX (astaxantina, 1-40 µg); NFMX (nifurtimox 400 µg); PI (parásito intracelular); PE (parásito extracelular); + (Presencia); - (ausencia); Tc (*Trypanosoma cruzi*); Vc (célula Vero). La integridad de la membrana celular se evaluó mediante el ensayo de Azul tripán.

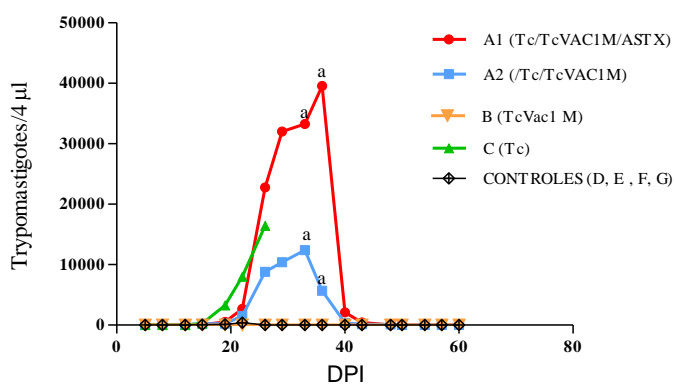


Figura 20: Parásitos en sangre de ratones BALB/c experimentales vacunados con TcVac1M, infectados con *T. cruzi* y/o suplementados con ASTX, 4 µL de sangre fueron colectados y analizados a partir del día 5 al 60 post-infección. No se muestran diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento,  $p > 0.05$  en los picos más altos de parasitemia. DPI: Días post-infección.



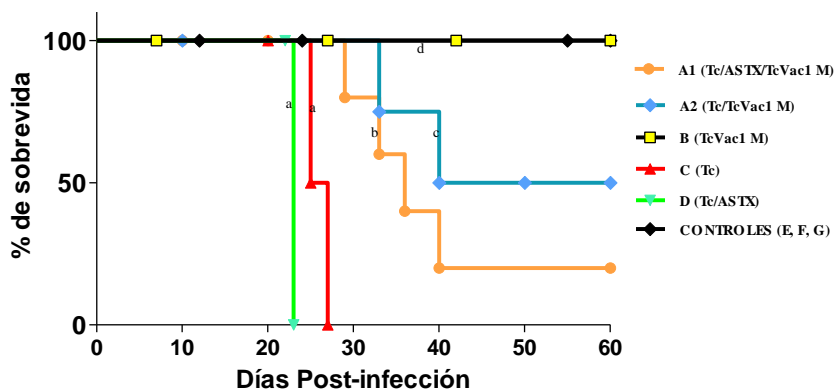


Figura 21: Porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c vacunados con TcVac1M, desafiados con *T. cruzi* y/o suplementados con ASTX a los 60 días post-infección. Los datos son graficados con base a la Media y SD. Diferentes caracteres debajo de las líneas muestran diferencias entre los grupos de tratamiento,  $p < 0.05$ .

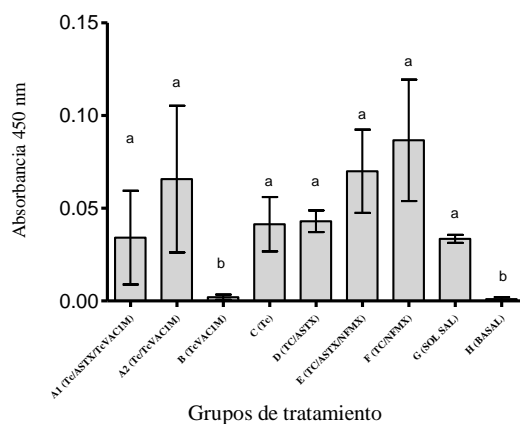


Figura 22: Niveles de malondialdehído (MDA) en el suero de ratones BALB/c vacunados con TcVac1M, desafiados con *T. cruzi* y/o suplementados con ASTX como indicador de estrés oxidativo a los 60 días post-infección. Cada barra representa el valor de la media del grupo experimental y desviación estándar, se muestran diferencias estadísticas significativas entre los grupos de tratamiento de importancia  $p < 0.05$  de acuerdo a prueba de Tukey.

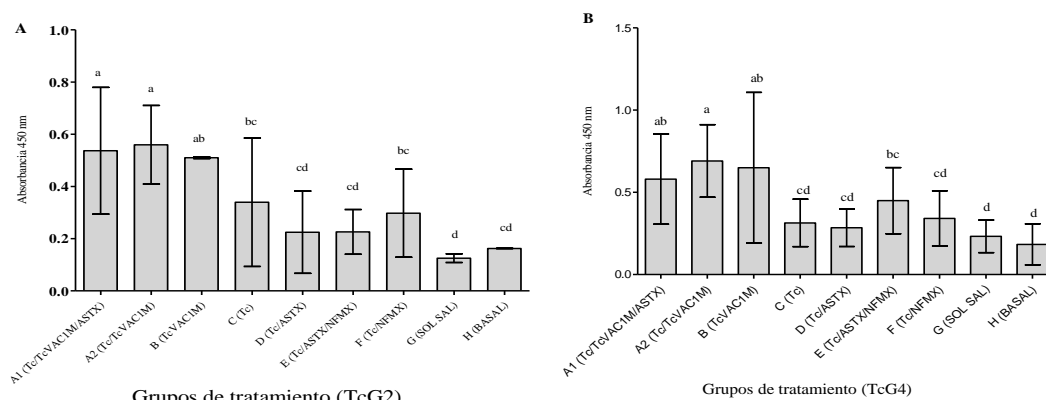


Figura 23: Nivel de anticuerpo IgG para TcVac1M en suero de ratones BALB/c, desafiados con *T. cruzi* y/o suplementados con ASTX a los 60 días post-infección. **A:** anticuerpos IgG para TcG2; **B:** anticuerpos IgG para TcG4, de los distintos grupos de tratamiento. Los datos son graficados con base a la Media y SD, se muestra diferencias estadísticas significativas entre los grupos de tratamiento ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a prueba de Tukey.

Tabla 12. Anormalidades histopatológicas del miocardio en ratones inmunizados con TcVac1M a 60 días post-infección

Parámetros / Grupos	A1 Tc/TcVac1M/ASTX	A2 Tc/TcVac1M	B TcVac1M	C Tc	D Tc/ASTX	E Tc/ASTX/NFMX	F Tc/NFMX	G SOL SAL
Linfo-plasmocitos focales	++	++	-	-	++	+	+	-
Linfo-plasmocitos difusos	++	+	-	+	-	-	-	-
Necrosis de cardiomiocitos	++	+	-	+	++	+	+	-
Total de Nidos	33±12.8	0	0	35±3.9	24±3.05	0	0	0

Escala de anomalidad: -, ninguno; +, ligero; ++, moderado; +++, severo (Barbabosa-Pliego et al., 2004).

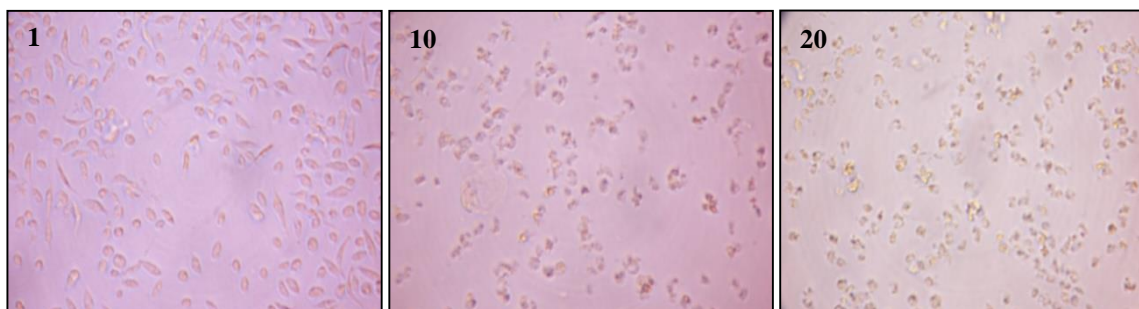


Figura 24. Cambios morfológicos de *T. cruzi* post-tratamiento con ASTX. A: empleando 1 µg de ASTX; B: 10 µg de ASTX; C: 10 µg de ASTX en 100 µL de DMEM respectivamente.

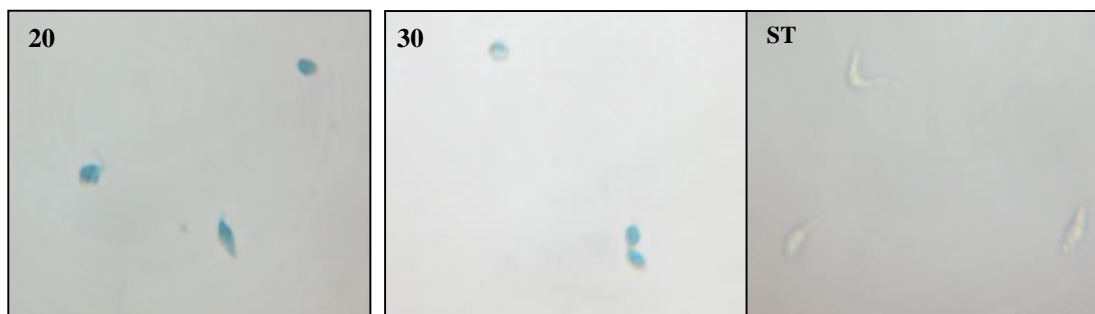


Figura 25. Integridad de la membrana post-tratamiento con ASTX, determinado por tinción con azul tripan, 12 y 30 µg de ASTX en 100 µL de DMEM respectivamente; ST. Parásitos sin tratamiento.

## 5. GLOSARIO

**Adyuvante:** sustancia con acción facilitadora de la respuesta inmune. Administrada simultáneamente con un antígeno intensifica inespecíficamente la respuesta frente a ese antígeno.

**Alérgeno:** sustancia antigénica que induce reacciones mediadas por IgE.

**Anticuerpo monoclonal:** anticuerpo producido en laboratorio específicamente dirigido contra un tipo de antígeno.

**Anticuerpo:** Molécula proteínica producida en el organismo por los linfocitos B como reacción al contacto con una sustancia extraña denominada antígeno. Los anticuerpos neutralizan los antígenos y son un elemento importante de la respuesta inmune contra las infecciones. Los anticuerpos también se denominan inmunoglobulinas.

**Antígeno:** molécula capaz de inducir una respuesta inmune. Se denomina epítope o determinante antigénico a la parte más pequeña de un antígeno capaz de inducir y ser reconocido por un clon linfocitario el cual solo reconoce ese epítope.

**Antioxidante:** Sustancia capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, los cuales comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes detienen estas reacciones al inhibir o suprimir la formación de radicales libres e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos.

**Cadena ligera (L):** cadena de polipéptidos presente en todas las moléculas de inmunoglobulinas. Existen dos tipos de cadenas ligeras: kappa y lambda.

**Cadena pesada (H):** dos cadenas de polipéptidos idénticos que caracterizan una molécula de inmunoglobulina. Hay cinco tipos de cadenas pesadas: a, b, g, d y e.

**Carotenoide:** Pigmento fotosintético, perteneciente al grupo de lípidos vegetales isoprenóides.

**Célula de Langerhans:** célula presentadora de antígenos situada en la piel que cuando emigra a los ganglios linfáticos se denomina célula dendrítica.

**Célula dendrítica:** células presentes en tejidos que capturan antígenos y migran a ganglios linfáticos y bazo donde son particularmente activas en procesar y presentar antígenos a células T.

**Célula inmuno-competente:** poblaciones celulares que hacen posible la acción del sistema inmune: son los linfocitos T, B, células K, NK, macrófagos y polimorfonucleares.

**Célula NK:** Células responsables de la citotoxicidad no HLA restringida.

**Célula presentadora de antígenos:** (APC) Usualmente se refiere a células que expresan moléculas HLA clase II en su superficie, que pueden procesar y presentar antígenos a los linfocitos T colaboradores.

**Citosinas:** proteínas producidas por las células en respuesta a una gran variedad de estímulos y que son capaces de alterar de alguna manera el comportamiento de otras células. La naturaleza de las células sobre las que ejercen su efecto viene determinada por la presencia de receptores específicos. Estos pueden localizarse en la superficie de las células que las producen (efecto autocrino), de células vecinas (efecto paracrino) o en otros órganos y tejidos (efecto semejante a las hormonas).

**Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC):** Es un locus genético muy polimórfico que determina la expresión de los antígenos de histocompatibilidad que participan en las interacciones celulares durante la respuesta inmune.

**Epítotope:** También llamado grupo determinante. Cada uno de los grupos químicos reconocidos como extraños por el organismo y que va a determinar la formación de un Ac específico.

**Ig monoclonales:** Ig idénticas entre sí que son producidas exclusivamente por linfocitos de una solo clon.

**Ig:** Grupo de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que son producidas por linfocitos B y células plasmáticas y que son responsables de la inmunidad humoral.

**IgA:** Inmunoglobulina predominante en las secreciones externas. Es un dímero formado por la cadena J, al que se halla unido un polipéptido denominado pieza secretora. La IgA sérica es en su mayor parte monomérica.

**IgD:** Inmunoglobulina cuyo significado fisiológico no se conoce. Su concentración sérica es muy pequeña, aunque paradójicamente la mayoría de linfocitos B maduros co-expresan en su superficie IgM y IgD.

**IgE:** Inmunoglobulina involucrada en reacciones de hipersensibilidad inmediata con capacidad de unirse a basófilos y mastocitos a través de receptores de gran afinidad que estas células poseen para su extremo Fc.

**IgG:** Inmunoglobulina predominante en suero, en el espacio extravascular, en las secreciones internas y en la fase secundaria de la respuesta inmunitaria.

**IgM:** Inmunoglobulina más primitiva y la más frecuente durante la respuesta primaria caracterizada por ser un pentámero y por su gran peso molecular lo que origina su situación exclusivamente intravascular.

**Inmunidad estéril:** Protección completa y eliminación de la infección al 100 % por la vacuna, sin generar daños colaterales, ni patologías.

**MHC clase I:** molécula constituida por una cadena polipeptídica polimórfica unida no covalentemente a la  $\beta_2$  microglobulina. Codificado por HLA-A, B y C en humano y H-2K, D y L en ratón. Están expresadas en casi todas las células. Estas moléculas presentan antígenos a linfocitos T CD8.

**MHC clase II:** moléculas compuestas por dos cadenas polipeptídicas (a y b). Codificadas por HLA-DR, DQ y DP en humanos y I-A e I-E en ratón. Presente sólo en algunos tipos celulares, relacionados con la presentación antigénica a linfocitos CD4.

**MHC clase III:** moléculas codificadas por genes situados dentro del MHC, que no están involucradas en la presentación antigénica. Incluyen algunos componentes del complemento.

**Prevalencia:** Número de casos de un evento, por ejemplo, una enfermedad, en una población específica y en un momento determinado. Regularmente se expresa en términos de porcentaje // El porcentaje de una población que se ve afectada con una enfermedad particular en un momento dado-comparar.

**Profilaxis:** toda medida preventiva destinada a evitar una enfermedad. Ej.: la vacunación.

**Seroconversión:** La producción de anticuerpos en respuesta a un antígeno // Cambio de una prueba serológica negativa a positiva, que indica el desarrollo de anticuerpos en respuesta a la presencia de un antígeno. La seroconversión también puede ser de positiva a negativa.

**Seroprevalencia:** Porcentaje de personas en un lugar y tiempo determinados que tienen anticuerpos contra alguna enfermedad, lo que indica qué porcentaje de ellos han tenido contacto con un agente infeccioso específico// La frecuencia de los individuos en una población que tienen un elemento particular (como los anticuerpos del VIH) en su suero sanguíneo.

**Vacuna:** producto biológico utilizado para obtener inmunización activa artificial contra una enfermedad específica.

**Xantofila:** Pigmento fotosintético perteneciente al grupo de los carotenoides, que contiene oxígeno en diferentes formas y uno o varios grupos hidroxilo o epoxi.

**Especies reactivas del oxígeno (ROS):** Sustancias químicas altamente agresivas y citotóxicas, derivan del oxígeno e incluyen el oxígeno singlete, el superóxido, el peróxido y el radical hidroxilo. A menudo se producen, directa o indirectamente, por la acción de la luz.