

Universidad Nacional Autónoma de México  
FACULTAD DE QUIMICA

INMUNOSUPRESION INDUCIDA EN RATONES  
POR LA INFECCION EXPERIMENTAL  
CON TRYPANOSOMA CRUZI

T E S I S

Que para obtener el título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

SILVIA MARTINEZ VELAZQUEZ

M-21710



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).


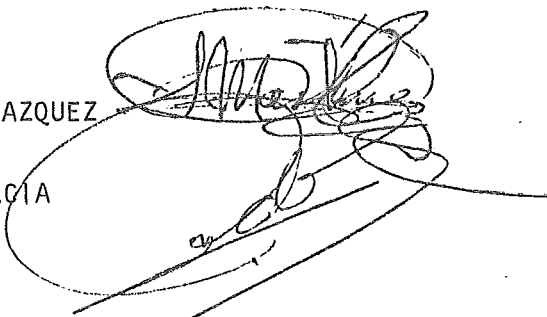
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

	Presidente	<u>PAULINA CASTRO ARDON</u>
Jurado asignado originalmente según el tema	Vocal	<u>ANDREA GABAYET MARTIN</u>
	Secretario	<u>CELSO RAMOS GARCIA</u>
	1er. Suplente	<u>MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA</u>
	2do. Suplente	<u>SALVADOR MARTIN SOSA</u>

Sitio donde se desarrolló el tema: LABORATORIO DE INMUNOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.

Nombre del sustentante: SILVIA MARTINEZ VELAZQUEZ

Nombre del asesor del tema: CELSO RAMOS GARCIA



DEPTO. DE PASANTES Y  
EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

A LA MEMORIA DE:

MI PADRE:

FRANCISCO MARTINEZ ROSALES.

MI HERMANO:

RICARDO MARTINEZ VELAZQUEZ.

CON CARIÑO Y ADMIRACION A MI MADRE

ELFEGA V. Vda. DE MARTINEZ.

CON ESPECIAL GRATITUD A MI HERMANO:

JORGE MARTINEZ VELAZQUEZ

A MIS HERMANOS

A JUAN

AGRADECIMIENTOS:

AL Dr. CELSO RAMOS GARCIA.

AL Dr. LIBRADO ORTIZ ORTIZ.

## I N D I C E

	PAG.
I    INTRODUCCION	1.
II   ANTECEDENTES	8
III  MATERIALES Y METODOS	17
IV  RESULTADOS	27
V    DISCUSION	50
VI  BIBLIOGRAFIA	56

## I. INTRODUCCION

La respuesta inmune consiste básicamente de una serie de eventos iniciados por la interacción de las células inmunocompetentes con el antígeno (Ag).

Los linfocitos se han clasificado en dos tipos : (i) linfocitos T que derivan del timo y son los responsables de las reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío, inmunidad a transplantes y tumores, resistencia celular a numeros microorganismos y algunas formas de autoinmunidad y (ii) linfocitos B derivados de la médula ósea, que producen moléculas de inmunoglobulinas (Ig) llamadas anticuerpos que son secretadas al suero (1).

Otros tipos de células tales como monocitos, macrófagos, granulocitos, etc., juegan también un papel importante en la respuesta inmune, aunque estas células no intervienen en el reconocimiento específico del Ag, están relacionadas con la captura o manejo de éste. Cuando los linfocitos reaccionan con el antígeno, se diferencian y proliferan para producir una progenie de células efectoras, las cuales llevan a cabo la respuesta inmune y de células de memoria ó comprometidas, que son las responsables de una respuesta inmune aumentada (respuesta secundaria), que se origina cuando el organismo se pone -- por segunda vez en contacto con el mismo Ag (1).

Por estudios hechos in vitro, se sabe que la inmunidad mediada por células (IMC) depende de la interacción entre los linfocitos y los fagocitos monocleares. Este tipo de respuesta se inicia cuando el Ag es reconocido por T.



la célula T, la cual lleva a cabo procesos de diferenciación y proliferación que se reflejan en una activación que induce a la producción de varios factores con actividad biológica, denominados productos de linfocitos activados -- (PLAs) ó linfocinas (2).

La respuesta inmune humoral está determinada por los linfocitos B, que tienen en su superficie receptores tipo inmunoglobulina y son los precursores de las células formadoras de anticuerpo (3,4). Estas células, bajo el estímulo antigénico son activadas y diferenciadas a células plasmáticas (formadoras de anticuerpos), las cuales se caracterizan por presentar un retículo endoplásmico rugoso muy abundante, estructura celular fundamental para que la célula lleve a cabo la síntesis de inmunoglobulina.

Se han encontrado antígenos poliméricos como son: el polisacárido III -- del pneumococo, levanas, lipopolisacárido (LPS) de Escherichia coli, polivinil pirrolidona, flagelina polimerizada, etc., que estimulan directamente a la célula B; estos antígenos se caracterizan no sólo por la presencia de determinantes antigénicos repetitivos idénticos, sino también porque son lentamente metabolizados y producen en su mayoría respuestas de tipo IgM. Debido a que son capaces de estimular a las células B en animales carentes de células T, se les ha denominado antígenos timo-independientes (5).

En cambio, otros antígenos no presentan estas características y se les llama antígenos timo-dependientes, los cuales generalmente inducen una res-

puesta de tipo IgM seguida de la producción de IgG.

Se ha demostrado que la unión de estos antígenos timo-dependientes con los receptores de la célula B se lleva a cabo, pero esto no parece ser suficiente para que la célula se diferencie, lo cual puede deberse a que estos antígenos sean rápidamente metabolizados y no persistan el tiempo requerido para los eventos de iniciación, además de que carecen de unidades repetitivas lo cual no les permite enlazarse en forma multivalente a los receptores inmunoglobulínicos. Miller y Mitchell (4) han demostrado que las células T son necesarias para que estos antígenos estimulen a la célula B a formar anticuerpos. Por lo tanto, es necesario una cooperación de las células T y B para responder a esta clase de antígenos.

Se ha demostrado que una amplia variedad de agentes químicos diversos, que varían desde iones metálicos hasta macromoléculas como anticuerpos y lectinas, tienen efectos mitogénicos (6); además los componentes celulares con los cuales estos mitógenos pueden interactuar son muy variados e incluyen inmunoglobulinas de superficie,  $\beta_2$ -microglobulinas, carbohidratos, glicoproteínas, glicolípidos y posiblemente enzimas de membrana tal como la adenil ciclasa y la guanidil ciclasa.

También se ha demostrado que algunos compuestos tales como la concanavalina A (Con A) y la fitohemaglutinina (PHA), (7,8) estimulan específicamente a los linfocitos T, mientras que otras sustancias mitogénicas como el lipopo-

lisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas (9), levanas, flagelina polimerizada (10) y beta<sub>2</sub>-microglobulina (11) estimulan solamente a los linfocitos B; en cambio, la Phytolacca americana (PWM) puede estimular a ambas poblaciones de células (12).

Se ha demostrado en varios sistemas y especies de animales, que los mitógenos de los linfocitos B activan adecuadamente a estas células en ausencia de células accesorias tales como linfocitos T y macrófagos (13,14); sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que estos mitógenos puedan tener propiedades para reaccionar con otras células, como pueden ser los macrófagos (15).

El hecho de que tanto los antígenos como mitógenos con diferente especificidad y estructura puedan estimular a los linfocitos, sugiere que la inducción de la mitosis no es absolutamente dependiente de la especificidad de los receptores de membrana para varios ligandos y que el proceso de estimulación por diferentes mitógenos pueden compartir una vía final común. Se asume que los eventos de superficie inducidos por la unión de los ligandos a los receptores específicos son los responsables de la iniciación de la estimulación de los linfocitos (7,8).

Se ha demostrado que los linfocitos pueden ser activados por PHA ó PWM covalentemente unidos a perlas de sepharosa (8) ó también con Con A unida a cajas de petri (7) ó a partículas poliméricas acrílicas (16), indicando que para la activación no es necesario que el estimulante penetre a la célula.

Aunque hay evidencia de que algunos estimulante pueden entrar al linfocito, se considera que este paso es irrelevante en la activación. Estudios más recientes muestran que mientras la unión del mitógeno ocurre inicialmente en muchos sitios en la superficie de la célula, subsecuentemente llega a concentrarse en un casquete en uno de los polos de la célula y es entonces interiorizado por pinocitosis (17,18). Estos estudios indican que inicialmente los receptores están dispersos en la membrana celular y que pueden moverse bajo la influencia del estimulante, probablemente esto se deba a que el mitógeno sea multivalente y pueda unir a más de un receptor formando finalmente el casquete; una vez dentro de la célula parece que se concentra en las vacuolas citoplasmáticas las cuales son probablemente lisosomas (8), pudiendo ser degradado por las enzimas que contienen, aunque esto último solo se ha demostrado en el caso de anti-inmunoglobulina (19).

En el proceso de estimulación antigénica, los linfocitos pequeños son transformados morfológica y funcionalmente (21,22).

El hecho de que los linfocitos puedan ser transformados in vitro por antígenos específicos y muchos agentes no específicos sugiere que este sistema pueda ser usado para estudiar mecanismos de regulación y control en células de mamíferos.

Los cambios que sufren los linfocitos por la activación con agentes no específicos, los cuales comprometen la mayor parte de las células, dan lugar

a los siguientes eventos: 1) Reacción del estimulante con la membrana plasmática del linfocito. 2) Incremento del fosfatidil inositol en la membrana. (22). 3) Acetilación de histonas (23). 4) Aumento en la síntesis del RNA. - 5) Cambios morfológicos, como son alargamiento de la célula y reorganización del núcleo y del nucleolo, lo cual puede comenzar 20 h después, seguida por un incremento en la endocitosis y en la redistribución de hidrolasas ácidas en los lisosomas (24). 6) Incorporación de timidina dentro del DNA nuclear-ocurriendo posteriormente la mitosis.

El objetivo de este trabajo es demostrar la presencia de las células supresoras en la infección experimental debida a T. cruzi en ratones, midiendo la capacidad de las células de bazo murinas a mitógenos y antígenos.

Además estudiar la posibilidad de que productos solubles provenientes de esta célula supresora participen en la regulación de la respuesta inmune.

## II. ANTECEDENTES

El Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (25). El parásito es un organismo pleomórfico que tiene dos fases en su ciclo vital, una en el hombre o huésped reservorio y otra en los insectos transmisores, llamados comunmente triatomas o chinches hociconas (25). Los triatomas se infectan al ingerir tripomastigotes de la sangre periférica de los mamíferos infectados, en la luz del mesogastrio, los organismos se reproducen en forma de epimastigotes, después de 15-30 días, su proliferación conduce a la formación de tripomastigotes metacíclicos en el recto del insecto. El T. cruzi se transmite al hombre a través de las heces infectadas de los insectos al penetrar por las abrasiones de la piel o por las membranas de las mucosas (26), los parásitos llegan a la sangre la cual los transporta a diversos órganos como el corazón, pulmones, hígado y bazo donde penetran a fibras musculares y endotelios. En el huésped mamífero, los parásitos se encuentran en la sangre con la forma típica de tripomastigote, mientras que en las células del sistema retículo endotelial y de otros tejidos, adopta la forma típica de amastigote, que se multiplica por fisión binaria dando como resultado nuevos tripomastigotes, los cuales son liberados a la corriente sanguínea cuando las células se destruyen (27).

En la enfermedad de Chagas, tanto en el hombre como en los animales de experimentación, se presentan dos fases importantes que son la fase aguda y -

la fase crónica (28,29). En la fase aguda, se encuentran abundantes formas de amastigotes y de tripomastigotes, generalmente aparece una lesión cutánea nodular en el sitio de entrada de los parásitos, denominado 'Chagoma', que se caracteriza por presentar inflamación, eritema y edema. Cuando la vía de entrada es la conjuntiva del ojo, se manifiesta como una lesión edematosa en el párpado y conjuntivitis, llamado signo de Romaña. Ambas lesiones se caracterizan por presentar un infiltrado mononuclear. Esta fase aguda va acompañada de un pronunciado aumento de parásitos y posteriormente ocurre una diseminación de estos en el organismo, acompañado de fiebre, malestar, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, miocarditis y algunas veces meningoencefalitis. Las lesiones causadas por la parasitemia en los diversos órganos, principalmente corazón y sistema nervioso central pueden conducir a la muerte.

En la fase crónica, los parásitos en circulación son escasos, la serología es positiva, en otros casos la fase crónica cursa asintóticamente y se descubre solamente por los hallazgos electrocardiográficos y radiológicos o bien aparecen los síntomas a los 10 ó más años después de la infección inicial.

Esta fase se caracteriza por presentar miocarditis progresiva o dilatación de visceras huecas, la lesión cardíaca presenta un infiltrado de células mononucleares, destrucción de fibras cardíacas, fibrosis intersticial y acumulación de células plasmáticas (30,31).

Los animales de laboratorio tratados con cepas de T. cruzi de baja virulencia, llegan a ser resistentes a una inoculación posterior con cepas virulen



tas (32), lo cual indica que pueden desarrollar una inmunidad contra el parásito (33). Por otro lado el uso de drogas inmunosupresoras tales como la ciclofosfamida y la radiación con rayos X (34), incrementan la severidad de la enfermedad en los animales, esto mismo se ha observado en ratones timectomizados al nacimiento (35) ó tratados con suero anti-timocito (36) lo que sugiere la participación de la inmunidad celular en la resistencia a la infección (37,38). Por otro lado, se ha comprobado que aquellos animales que se recuperan de la fase aguda de la enfermedad, presentan anticuerpos circulantes contra el parásito, a pesar de estos hallazgos, ha sido motivo de controversia si estos participan o nó en la protección (39,40). Sin embargo, se ha observado en ensayos de transferencia pasiva, que el suero de dichos animales pueden proporcionar cierta protección (40), además estudios hechos in vitro indican que en condiciones apropiadas, el suero inmune más complemento puede destruir al parásito, lo que sugiere que el complemento puede estar participando en la resistencia a la infección (41).

• A juzgar por la información disponible, los factores inmunológicos desempeñan una función importante en la enfermedad de Chagas. Se ha demostrado que tanto en personas como en animales de experimentación infectados con T. cruzi, anticuerpos contra el parásito mediante reacciones de fijación de complemento y técnicas directas e indirectas de inmunofluorescencia y de hemaglutinación pasiva (42,43).

En humanos y animales infectados con T. cruzi, se presentan reacciones-

de hipersensibilidad tardía (44,45,46). Por ejemplo se ha demostrado la presencia del factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) y de reacciones cutáneas positivas en animales infectados con T. cruzi (47). Por otro lado, la protección obtenida con células transferidas de animales inmunes (48) y la resistencia de los macrófagos a ser parasitados in vitro apoyan la participación de mecanismos celulares en la resistencia a la infección.

Santos-Buch y col (49) han postulado que la hipersensibilidad tardía - - puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de las lesiones cardíacas observadas en la etapa crónica de la enfermedad.

Las infecciones causadas por parásitos intracelulares provocan una respuesta inmune asociada con la hipersensibilidad tardía, que resulta en la formación de linfocitos sensibilizados y macrófagos activados (50).

Los linfocitos derivados del timo son los que tienen la especificidad de la respuesta (51) y los macrófagos pueden ser activados por mediadores solubles liberados por los linfocitos. Los macrófagos activados son capaces de destruir de modo inespecífico una variedad de antígenos no relacionados (52).

Nogueira y col (53) han demostrado que durante la infección subletal de ratones infectados con T. cruzi ó BCG (Bacilo de Calmette y Guérin), seguida de un reto por vía intraperitoneal con el antígeno correspondiente, aparecen macrófagos con actividad microbicida in vitro contra los tripomastigotes. Estos estudios (54) indican que los parásitos son capaces de infectar a los macrófagos, por lo que estas células pueden participar en los mecanismos de - -

inmunidad natural a través de la fagocitosis y destrucción de los parásitos.

Por otro lado, Ortíz-Ortíz y col (55), han demostrado que los ratones - tratados con BCG, son más resistentes a la infección experimental con T. cruzi, posiblemente a través de mecanismos de activación inespecífica de macrófagos por mediadores solubles liberados de linfocitos T activados.

Los mecanismos empleados por los parásitos para evadir los procesos inmunes del huésped no se conocen con certeza. Existen parásitos que son capaces de inducir inmunidad que puede ser la responsable de la mejoría clínica o de la disminución del número de parásitos. La variación antigénica, algunas veces asociada con cambios morfológicos, parece ser un mecanismo importante en retrasar o evadir procesos de eliminación por reacciones inmunes (56). Otro mecanismo de evasión empleado por algunos parásitos, es la supresión de la respuesta inmune del huésped (57,58,59).

La regulación de la respuesta inmune por células supresoras involucra -- más que un solo mecanismo supresor, una serie de sistemas. Se ha demostrado que la mayoría de los tipos celulares requeridos para la respuesta inmune son capaces de funcionar como células supresoras (60) De este modo, los linfocitos B, los monocitos y especialmente los linfocitos T han demostrado ser supresores para diferentes sistemas de regulación inmunológica.

Las funciones supresoras mediadas por células T no siempre requieren de un contacto célula a célula sino que pueden llevarse a cabo a través de factores solubles.

Se han realizado estudios tendientes a definir los mecanismos celulares y moleculares involucrados en los sistemas inmunes de supresión. Destacan aquellos, que tratan de definir la naturaleza de las células involucradas en la supresión, los mecanismos de producción de mediadores solubles que suprimen la actividad inmune de otra célula y los mecanismos de acción del sistema supresor sobre la célula blanco.

Se ha demostrado que existen dos grupos diferentes de células T, uno programado para las funciones de cooperación y otro para las de supresión (61).

Una demostración clara de que las poblaciones de células T supresoras y cooperadoras son diferentes, lo constituye el sistema antigénico Ly en el ratón, que está controlado genéticamente. Estos antígenos representan componentes expresados exclusivamente en la superficie de los linfocitos. Cada sistema Ly comprende un locus (Ly-1 en el cromosoma 19, Ly-2 y Ly-3) en el cromosoma 6) cada uno con 2 alelos alternados (62).

Algunas de las enfermedades que están asociadas con un estado de supresión son: la leishmaniasis (63), la malaria (64), la toxoplasmosis (65) y la tripanosomiasis africana (66). Los mecanismos de supresión son variados y complejos. En varias infecciones se ha reportado un estado de inmunosupresión en la respuesta humoral y celular (59,67,68,69). Es posible que la infección activa pueda participar en los fenómenos de supresión.

Reed y col (67) han estudiado el efecto que tiene la infección con T. cruzi sobre la respuesta inmune celular. Así, los animales infectados y que-

posteriormente se inmunizan con adyuvante completo de Freund (ACF) ó con oxazona, muestran una depresión de la hipersensibilidad tardía cuando se prueban con los antígenos correspondientes.

Otros investigadores han observado una inmunosupresión de la síntesis de anticuerpos en niños infectados con malaria (70).

Clinton y col (63) han observado una respuesta disminuida de anticuerpos a ovalbúmina en hamsters infectados con Leishmania donovani. También estos autores (71) han demostrado que los ratones infectados en la etapa donde se observa la inmunosupresión son capaces de eliminar más eficientemente de la circulación, partículas de carbón coloidal y Listeria monocytogenes, lo que sugiere un estado de activación inespecífica del sistema fagocítico mononuclear.

Por otro lado, en nuestro laboratorio Sánchez (72) demostraron que los ratones infectados con T. cruzi son incapaces de dar una reacción positiva en un cultivo mixto de linfocitos, lo que sugiere que los animales infectados presentan una alteración de la inmunidad mediada por células.

Cunningham y col (58) han demostrado que los ratones de la cepa C57BL/6 - presentan bajas parasitemias y frecuentemente sobreviven a las infecciones por T. cruzi, mientras que los ratones de la cepa C3H/He, mueren durante la fase aguda de la enfermedad con parasitemias elevadas. Durante el curso de la infección ambas cepas de ratones desarrollan un estado de inmunosupresión inespecífica cuando se inmunizan con eritrocitos de carnero. En estos estudios no se encontró una relación aparente entre la inmunosupresión y la resistencia a

T. cruzi .

En experimentos de transferencia de suero provenientes de ambas cepas de animales infectados, se ha demostrado en el suero la presencia de una sustancia soluble supresora, la transferencia de suero de ratones infectados en ratones singénicos no infectados produce un estado de inmunosupresión a eritrocitos de carnero, sin embargo, esto no sucede en receptores alogénicos.

Recientemente Eardley y Jayawardena (73) han demostrado que los ratones infectados con T. brucei muestran in vitro desde los primeros días de la infección una respuesta disminuída a eritrocitos de carnero. Además se ha encontrado que la supresión observada se debe a la participación de células supresoras con características de linfocitos T y también a la participación de una población de células adherentes. La eliminación del parásito de la circulación de los animales infectados, no afecta el estado de supresión lo que sugiere que el parásito no participa directamente en los mecanismos de supresión y por lo tanto excluyen la posibilidad de la competencia antigénica como un mecanismo involucrado en la supresión.

Urquhart y col (69) y Murray y col (74), en estudios hechos con T. brucei han sugerido que los parásitos pueden secretar sustancias mitogénicas, las cuales pueden estimular de modo inespecífico, la proliferación de los linfocitos B. Greenwood (75) han postulado que la presencia de estas sustancias mitogénicas permite un marcado incremento de los niveles de inmunoglobulina circulante, particularmente de la clase IgM, del factor reumatoide, de la produ--

cción de anticuerpos heterófilos y de autoanticuerpos característicos de la tripanosomiasis africana.

Ramos y col(76) han observado un efecto inmunosupresor producido por la infección con T. cruzi, el cual se puso de manifiesto cuando se determinaron células formadoras de anticuerpo directas e indirectas, en los ratones inmunizados con glóbulos rojos de burro, entre los 5-7 días después de la infección.

Los animales infectados, inmunizados con GGH, DNP-Ficoll y LPS también presentaron una respuesta de CFA disminuida a estos antígenos. La supresión de la respuesta inmune a estos antígenos no se relacionó con una alteración en la función del macrófago, ya que en experimentos llevados a cabo durante la inmunosupresión mostraron que no hay diferencias en la captación y manejo de antígenos por macrófagos cosechados de la cavidad peritoneal de ratones infectados con T. cruzi ó normales. Las células supresoras no adherentes presentes en ratones infectados con T. cruzi fueron sensibles al tratamiento con suero antilinfocítico más complemento (76), por el contrario, el tratamiento de las células no adherentes con anti-Ig más complemento no eliminó la actividad supresora.

Los animales infectados presentan un estado de supresión donde pueden participar diferentes mecanismos y otros factores.

## III. MATERIALES Y METODOS

Animales. Se usaron ratones machos ó hembra de la cepa BALB/c de 20-25g de peso. Los animales fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas y se mantuvieron en cajas de acrílico con tapa de rejilla de alambre galvanizado, alimentándose con tabletas de Purina (Purina de México, S.A. de C.V.) y agua ad libitum.

Trypanosoma cruzi. Se utilizó una cepa miotrópica y reticulotrópica, la cual se ha mantenido durante seis años por pases sucesivos en ratón.

Infección de ratones. Para la infección se usó sangre obtenida asépticamente de la vena axilar de ratones infectados, para lo cual la sangre se colocó en un tubo de ensaye que contenía de 1-2 ml de SSB (solución salina balanceada de Hank's) con 10 UI de heparina /ml. De ésta suspensión se tomó una alícuota y se contó el número de parásitos en una cámara cuenta glóbulos. Los ratones se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con  $7 \times 10^3$  tripomastigotes (51.6 LD<sub>50</sub>).

Antígenos. Los eritrocitos de carnero se mantuvieron en solución estéril de Alsever, y se lavaron 3 veces en SSB por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min antes de su uso. El DNP<sub>80</sub>-Ficoll fué preparado por el Dr. Edmundo Lamoyi, de acuerdo al método descrito por Inman (77).

Mitógenos. Concanavalina A (Con A, cat. 2010 la cual se obtuvo de Sigma Chemical St. Louis MO. USA). Se disolvieron 200 mg de Con A en 10 ml de



una solución de NaCl 6.1 M y se centrifugó a 18,000 rpm durante 1.5 h a 4°C - (centrífuga Sorvall RC-2B). El botón se eliminó y el sobrenadante se esterilizó por filtración en millipore. Se preparó una dilución de la muestra y se leyó su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ 11. Se calculó la concentración de proteína tomando en cuenta la relación de 1.5 DO<sub>280nm</sub> corresponde a 1 mg de proteína/ml.

Lipopolisacárido W (LPS) de E. coli serotipo O111:B4, el cual se obtuvo de los laboratorios Difco Detroit, Michigan USA. Se preparó una solución estandar de 1 mg/ml en NaCl 0.15 M y se esterilizó durante 30 min en una lámpara de rayos ultravioleta.

Para determinar el grado de estimulación de las células, se adicionó a cada cultivo 1  $\mu$  Ci de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-TdR cat. NET-027 New England Nuclear Boston, Mass.,) actividad específica de 6.7 Ci/mM 18 h antes de la terminación del cultivo. Finalmente las células se cosecharon en un microcosechador, (Cell Harvester model 24 V Gaithersburg, MD. 20760) en tiras de papel de fibra de vidrio, las cuales se secaron por medio de una lámpara de rayos infrarrojos y cada filtro se colocó en viales de plástico que contenían 3 ml de líquido de centelleo. La incorporación de timidina radioactiva se determinó en un contador de centelleo líquido (Mark III Amersham/Searle, Co. - Chicago, ILL.).

#### Preparación de la solución salina balanceada (SSB).

Solución I

D-Glucosa - - - - -	10.00 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ anhidro - - - - -	0.60 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ anhidro - - - - -	1.85 g
rojo de fenol - - - - -	0.01 g

Solución II

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ - - - - -	1.86 g
KCl - - - - -	4.00 g
NaCl - - - - -	80.00 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ - - - - -	2.00 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - - - - -	2.00 g

Solución de trabajo: se diluyeron 100 ml de la solución I en agua -- destilada y se añadieron 100 ml de la solución II se mezclaron, se aforó a 1 litro y se esterilizó por filtración en millipore. La SSB contiene 100 UI/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina.

Preparación del medio de cultivo. Las células esplénicas se cultivaron en medio RPMI-1640 (cat. H-18 Gibco, Grand Island NY. USA) el cuál se -- disolvió en agua destilada y se le adicionó 2.2 g de bicarbonato de sodio -- por litro. Cada 100 ml de medio contienen.

1 ml de solución de aminoácidos no esenciales (100X); 100mM  
(cat. 320-1140, Gibco Grand Island NY. USA).

1 ml de piruvato de sodio (100X):100mM (cat. 320-1360, Gibco, Grand Island NY. USA.)

1 ml de una mezcla de penicilina y estreptomocina con 10,000 U y 10,000 ug respectivamente.

0.1 ml de L-glutamina (100X):200mM (cat. 320-5039 Gibco, Grand Island NY. USA.)

5 ml de suero fetal de ternera ( cat. 230-6140 Gibco, Grand Island NY. USA.).

Preparación de la mezcla nutricional para el cultivo de células de bazo. Es-

ta mezcla contiene por cada 100ml:

Dextrosa - - - - - 1 g

Medio RPMI-1640 (cat. H-18 Gibco, Grand Island NY. USA.) - - - - - 70 ml

Aminoácidos esenciales, 50 X (cat. 320-1130 Gibco, Grand Island NY. USA). 10 ml

Aminoácidos no esenciales (100X):100mM (cat. 320-1140 Gibco, Grand Island NY. USA). 5 ml

L-glutamina (100X):200mM (cat. 320-5039 Gibco, Grand Island NY. USA).- - - - - 5 ml

Ajustar el pH 7.0 con NaOH 1.0 N

Adicionar NaHCO<sub>3</sub> al 7.5 % - - - - - 13 ml

Se esterilizó por filtración en millipore y se almacenó en congelador -

Antes de adicionar a los cultivos, se mezcló un volumen de suero fetal de --  
ternera con 2 volúmenes de la mezcla nutricional.

Preparación del cultivo de células de bazo. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, los bazos se removieron asépticamente y se colocaron en cajas de Petri de plástico estériles de 60 X 15 mm (cat. 5220 Lux -- Scientific Co., Newbury Park, CA USA.) que contenía de 6-10 ml de SSB. Todo este proceso se hizo en frío y en condiciones estériles. A continuación los bazos se disgregaron para lo cual se usaron pinzas de disección con punta roma. Las células se transfirieron a tubos de plástico estériles de 15 ml -- (cat. 2057 Falcon Oxnard CA. USA). La suspensión se mantuvo en frío durante 10 min a fin de que las partículas gruesas sedimenten y el sobrenadante se -- transfirió con una pipeta Pasteur a un tubo de plástico cónico estéril de 50- (cat. 2070 Falcon Oxnard CA. USA.).

La suspensión celular se lavó 3 veces en SSB por centrifugación (centrí  
fuga Damon/IEC Division PR-6000), a 1500 rpm durante 10 min. Las células fi  
nalmente se resuspendieron en medio de cultivo, se contó el número de célu--  
las viables por exclusión de azul tripano al 0.4 %, y se ajustó el número de  
células con medio de cultivo a la cantidad requerida para cada experimento.

Estimulación mitogénica in vitro. Las células de bazo se cultivaron en  
placas para microcultivo (cat. 3042 Falcon Oxnard CA. USA) a una densidad de  
 $2.5 \times 10^5$  ó  $5 \times 10^5$  células viables en un volumen de 0.1 ml, a cada cultivo-

se le adicionó 0.1 ml de Con A de una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ó LPS de una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Cuando se comprobó la actividad supresora, se cultivaron  $2.5 \times 10^5$  células de bazo de ratones normales mezcladas con  $2.5 \times 10^5$  células de bazo de animales infectados. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 72 h en atmósfera húmeda y con 5 % de  $\text{CO}_2$  en una incubadora LAB-LINE-Melrose Park, ILL.

Preparación de TNP acoplado a eritrocitos de carnero. Las células formadoras de anticuerpo contra TNP, se determinaron acoplado el 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) a eritrocitos de carnero (78) de la manera siguiente: Los eritrocitos de carnero se lavaron 3 veces en buffer barbital modificado (BBM) frío (79). Se disolvieron 25 mg de TNBS (Eastman Kodak CO. - Rochester, NY. USA (80) en 7 ml de solución reguladora de cacodilatos 0.28 M pH 6.9, se adicionó gota a gota 1 ml de paquete de eritrocitos lavados y se incubó con agitación constante 10 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. La reacción se detuvo por dilución de los eritrocitos, para lo cuál la suspensión se colocó en un tubo cónico de 50 ml que contenía 30 ml de BBM frío, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y los eritrocitos se resuspendieron en BBM frío que contenía 22 mg de glicilglicina (cat. G-1002 Sigma, St. Louis MO. USA ), (81). Posteriormente los eritrocitos se lavaron 3 veces más y se almacenaron con BBM en frío hasta su uso. Los eritrocitos acoplados con TNP (TNP-EC) son estables por 3 ó 4 días-

pero necesitan ser lavados 2 ó 3 veces antes de usarse.

Inducción de repuesta primaria in vitro contra diferentes antígenos. Se usó el método descrito por Mishell-Dutton (82). Para la inmunización in vi-tro, se cultivaron células de bazo de ratones normales e infectados a una con- centración de  $10 \times 10^6$  células viables/ml. El medio de cultivo contenía ade- más 2-mercaptoetanol a una concentración final de  $5 \times 10^{-5}$  M y se colocó 1 ml de esta suspensión celular en cajas de cultivo estériles de 24 hoyos (cat. -- 3008 Falcon Oxnard CA. USA).

Los cultivos se estimularon con 1 gota (aprox.  $30 \mu\text{l}$ ) de una suspensión- de eritrocitos de carnero al 1.4 % en medio de cultivo ó con 0.1 ml de DNP-Fi- coll a una concentración de  $50 \mu\text{l}$ . Las células se incubaron  $37^\circ\text{C}$  en atmósfe- ra húmeda con 5 % de  $\text{CO}_2$ , diariamente se les adicionó  $120 \mu\text{l}$  de mezcla nutri- cional y 4 días después se determinó el número de CFA contra los eritrocitos- de carnero y contra el DNP.

Determinación de células formadoras de anticuerpo (CFA). Para determi-- nar el número de CFA se empleó la técnica de hemólisis localizada en gel, des- crita por Jerne y Nordin (83), para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

1.- Las células se cosecharon con pipeta Pasteur agitando lentamente y- se mezclaron las células de 4 cultivos, los cuales se pusieron en tubos de -- plástico de 15 ml (cat. 2087, Falcon Oxnard CA. USA). Posteriormente las ca- jas se lavaron con medio de cultivo y el resto de células se obtuvieron sepa- randolas de la base de las cajas usando una varilla de vidrio con un extremo-

de hule.

2.- Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a 4°C y se lavaron 3 veces más en medio de cultivo. Finalmente las células se resuspendieron en un volumen pequeño (0.5-1.0 ml) de medio de cultivo. Los cultivos inmunizados con eritrocitos de carnero ó con DNP-Ficoll, se probaron contra eritrocitos y contra TNP-eritrocito respectivamente.

3.- Se mezcló 0.1 ml de la suspensión celular y 0.05 ml de eritrocitos de carnero ó 0.05 ml de TNP-EC al 7 % en SSB, en tubos de ensaye de 12 X 75 mm, colocados en baño María a 42-44°C que contenían 0.5 ml de agarosa al 0.5 % y 0.1 ml de suero fetal de ternera. Los tubos se mezclaron rápidamente y se virvió su contenido en portaobjetos previamente barnizados con agarosa al 0.1%.

Los portaobjetos se colocaron en soportes especiales y se incubaron durante 1.5 h a 37°C en cámara húmeda.

4.- Posteriormente se adicionó complemento de cobayo, previamente absorbido con eritrocitos de carnero y diluido 1:10 en SSB, los portaobjetos se incubaron en las mismas condiciones durante 1.5 h.

6.- Se determinó el número de placas hemolíticas en cada portaobjeto, usando un contador de colonias Quebec (American Optical Corporation, Buffalo, N.Y. USA).

7.- Finalmente se calculó el número de CFA/10<sup>6</sup> células de bazo.

Obtención de sobrenadantes de cultivos de células de bazo de ratones normales e infectados. Se incubaron células de bazo de ratones normales y de

ratones infectados a diferentes días. Las células se ajustaron a  $5 \times 10^6$ /ml en medio de cultivo y se colocó 1 ml de células en tubos de plástico de 12 X 75 mm (cat. 2054 Falcon Oxnard CA. USA.) y se incubaron durante 48 h en atmósfera húmeda con 5 % de  $\text{CO}_2$ , finalmente los tubos se centrifugaron a 1500 rpm, durante 15 min., se obtuvo el sobrenadante de cada cultivo, y se esterilizaron por filtración en millipore. Para concentrar los sobrenadantes  $2.5 \times$  y  $5 \times$  se utilizó una placa de Amicón B-15.

Efecto de los sobrenadantes de células de bazo de ratones normales e infectados sobre células de bazo de ratones normales. Se obtuvieron células de bazo de ratones BALB/c normales y se ajustaron a  $5 \times 10^6$  células/ml, se colocó 0.1 ml de ésta suspensión en placas de microcultivo (cat. 3042 Falcon Oxnard CA. USA) y las células se estimularon con Con A ó LPS en presencia de sobrenadantes provenientes de ratones normales ó de ratones infectados, para hacer un volumen final de 250  $\mu$ l. Las células se incubaron durante 72 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de  $\text{CO}_2$  y 18 h antes de la terminación del cultivo se adicionó 1  $\mu$  Ci de  $^3\text{H}$ -TdR y se contaron en un contador de centelleo líquido.

Obtención de sueros de ratones normales e infectados. Los sueros se obtuvieron de ratones BALB/c sanos ó de ratones a los 15-18 días de infección, se sangraron de la vena axilar, la sangre se mantuvo en frío durante 1 h y los sueros se obtuvieron por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min y se



inactivaron por calentamiento en baño María a 56°C durante 30 min finalmente los sueros se esterilizaron por filtración millipore y se hicieron diluciones de los sueros en medio de cultivo.

Efecto del suero proveniente de ratones normales e infectados sobre células normales de bazo de ratón. Se utilizaron  $5 \times 10^5$  células de bazo de ratones normales, se estimularon con Con A y LPS en ausencia o en presencia de 50  $\mu$ l de suero de ratones normales ó de ratones infectados. Las células se incubaron durante 72 h a 37°C y en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 18 h antes de la terminación del cultivo se adicionó a cada cultivo (1  $\mu$  Ci de <sup>3</sup>H-TdR), finalmente las células se cosecharon y el nivel de incorporación de timidina radioactiva se midió en un contador de centelleo líquido.

Análisis estadístico. Se usaron las pruebas de Fisher para determinar la homogeneidad de las varianzas de ambos grupos. Cuando fueron homogéneas se aplicó la prueba t de Student para estimar la significancia de las diferencias. Cuando las varianzas fueron heterogéneas se usó la prueba U de Mann-Whitney con el fin de evaluar las diferencias (84).

## IV. RESULTADOS

Efecto supresor de las células de bazo de ratones con diferentes días de infección sobre la estimulación de células normales con Con A y LPS. A fin de demostrar el efecto supresor de las células de bazo de animales infectados con T. cruzi, las células de ratones normales e infectados se estimularon por separado con Con A y LPS y además se mezclaron células normales e infectadas en proporción 1:1 y se estimularon con ambos mitógenos.

Como puede verse en las tablas I, II y III, las células proveniente de animales infectados no pueden ser estimuladas con Con A y LPS después del día 10 de infección, haciéndose más evidente este efecto en el día 16 en el cuál estas células muestran una inhibición del 84 % y 91 % cuando son estimuladas por Con A y LPS.

El porcentaje de inhibición que ejercen las células de animales infectados sobre las normales se incrementa a medida que pasa el tiempo de infección lo cual se pone de manifiesto en los cultivos que contienen células normales y células infectadas estimuladas con los mitógenos. La supresión ejercida por las células de animales infectados el día 16 es altamente significativa y representa 70 % y 85 % para Con A y LPS ( $P < 0.001$ ).

Los datos anteriores sugieren que tanto las células B como las células T de los animales infectados son incapaces de ser estimuladas por sus mitógenos respectivos.

Efecto supresor del suero de ratones infectados sobre la estimulación mitogénica debida a Con A y LPS en células de bazo de ratones normales. Los experimentos anteriores (ver tablas I, II y III), sugieren que la supresión que se observa en la mezcla de células (normales e infectadas), parecen estar mediadas por células presentes en el bazo de animales en las últimas etapas de infección. Los trabajos de Ramos y col (76) demostraron en este mismo sistema que la célula que ejerce los efectos supresores es un linfocito T. Sin embargo hay reportes de que sustancias supresoras pueden tener un papel importante en el proceso de supresión durante la enfermedad de Chagas experimental (85).

A fin de buscar en el suero de los animales infectados alguna sustancia que pudiera ejercer efectos supresores sobre células normales, se obtuvieron sueros de animales normales y sueros de animales en las últimas etapas de infección, los sueros inactivados por calor a 56°C durante 30 min, se diluyeron y mezclaron con cultivos de células normales estimuladas con Con A y LPS por 72 h, al final de éste periodo se determinó el grado de incorporación de timidina en los cultivos.

Como puede verse en la Tabla IV, el suero proveniente de animales infectados muestra un efecto supresor sobre células de bazo de ratones normales cuando son estimulados con Con A y LPS. Este efecto fué dosis dependiente, siendo altamente significativo el efecto supresor para ambos mitógenos cuando el suero de animales infectados se diluyó 1:5 y 1:10.

Efecto del suero de ratones normales y de ratones infectados (17 días) -  
sobre la inducción de la respuesta primaria *in vitro* a eritrocitos de carnero.

A fin de probar el efecto que tienen los sueros provenientes de animales normales y animales en la última etapa de infección sobre la inducción de respuesta primaria *in vitro* (82). Se cultivaron células normales en presencia y ausencia de ambos sueros y como puede verse en la Fig. 4 las células normales estimuladas con eritrocitos de carnero en presencia de suero infectado, son incapaces de dar una respuesta primaria *in vitro*. Estos datos sugieren que la sustancia presente en el suero de animales infectados no solamente son capaces de alterar la respuesta mitogénica de células normales sino que también son capaces de inhibir la respuesta *in vitro* a eritrocitos de carnero.

En nuestros experimentos observamos que los sueros provenientes de animales normales mostraron también un efecto inhibitorio aunque significativamente menor que el mostrado por el suero de animales infectados. El efecto inhibitorio del suero de los animales normales ya ha sido descrito por varios investigadores (86). Los datos anteriores sugieren que el efecto supresor -- ejercido por los animales infectados puede estar mediado no solo por la participación de células sino también por la participación de sustancias solubles secretadas por el linfocito T en el suero de estos animales ó en el sobrenadante proveniente de la incubación de éstas células. Estos hallazgos apoyan los resultados obtenidos por el grupo de Cunningham (85).

Efecto de los sobrenadantes de cultivos de células de bazo de ratones a diferentes días de infección sobre cultivos de células de bazo de ratones normales estimulados con Con A y LPS. Para determinar si las células provenientes de animales infectados son capaces de producir in vitro sustancias solubles con efecto supresor, se cultivaron células de animales normales y de animales con diferentes días de infección por un período de 48 h sin recibir estímulo alguno, al final de este tiempo los cultivos se centrifugaron y se colectaron los sobrenadantes.

Los sobrenadantes fueron concentrados 2.5 X y 5 X con membranas de Amicón B-15 y se probó el efecto que tienen estos sobre el cultivo de células normales estimuladas con Con A y LPS. Como puede verse en las tablas V y VI los sobrenadantes provenientes de células de animales infectados son capaces de alterar la respuesta de células normales a ambos mitógenos, siendo altamente significativo el efecto supresor después del día 10 de infección.

Estos datos sugieren que las células provenientes de animales infectados son capaces de producir in vitro y liberar al medio sustancias que ejercen un efecto inhibitorio tanto en la población de linfocitos T como B, provenientes de células normales. El efecto supresor observado en los sobrenadantes de células de animales infectados fué dependiente de la concentración ya que solo se manifestó cuando estos sobrenadantes se concentraron 5 X (ver Tabla VI).

Determinación de la viabilidad de las células de bazo de ratones normales tratados con sobrenadantes provenientes de células de bazo de ratón con -

diferentes días de infección. Con el propósito de descartar el posible efecto citotóxico que pudieran tener los sobrenadantes de células de animales infectados se determinó la viabilidad, mediante la exclusión del azul tripano, de células normales sin estimular ó estimuladas con Con A y LPS en presencia y ausencia de sobrenadantes provenientes de la incubación de células de animales normales e infectados. Como puede verse en la Fig 5 el porcentaje de viabilidad celular obtenido por el cultivo de células normales bajo diferentes condiciones, por un período de 72 h de cultivo fué muy similar en todos los casos -- probados, lo cual descarta la posibilidad de que estos sobrenadantes puedan -- tener un efecto citotóxico in vitro sobre células normales, por lo tanto el -- efecto inhibitorio ejercido por estos sobrenadantes se puede deber a la pre-- sencia de sustancias solubles con capacidad supresora y además la producción de estas sustancias se acentúa a medida que pasa el tiempo de infección de los animales.

Determinación in vitro de la dosis óptima de DNP-Ficoll sobre la estimulación de células de bazo de ratones normales. Con el fin de estudiar la capacidad inmunológica de los animales infectados con T. cruzi, decidimos probar si las células de bazo de estos animales responden in vitro, a diferentes estímulos antigénicos.. Se determinó primeramente la concentración óptima de un antígeno timo independiente (DNP-Ficoll), capaz de inducir una respuesta primaria in vitro de células de bazo de ratones normales. Como puede verse -

en la Fig. 1, cuando se cultivaron  $10 \times 10^6$  células/ml en presencia de diferentes concentraciones de DNP-Ficoll, observamos que la dosis óptima de estimulación mediada por la formación de CFA contra DNP fué de  $5 \mu\text{g/cultivo}$ . Los datos anteriores indican que podemos emplear este antígeno a esa concentración para la inducción primaria de anticuerpos in vitro.

Respuesta inmune primaria in vitro a eritrocitos de carnero y a DNP-Ficoll de células de bazo de ratones normales, de ratones con 5 y 17 días de infección y de la mezcla de células normales e infectadas. Para determinar la capacidad de respuesta que tienen las células de animales normales y de animales infectados a diferentes días, las células provenientes de ambos animales se estimularon por separado con eritrocitos de carnero ó con DNP-Ficoll (82). También se hicieron mezclas de células normales e infectadas en proporción 1:1 y se estimularon con ambos mitógenos, después de 4 días se hizo la determinación de CFA por la técnica de Jerne (83), como puede verse en la Fig. 2 y 3, las células de animales infectados son incapaces de responder a ambos estímulos lo cual se hace más evidente en los últimos días de infección.

Por otro lado, la mezcla de células normales y de 17 días de infección mostró también un efecto supresor para ambos antígenos. Los datos anteriores indican que los animales infectados pierden la capacidad de ser estimulados in vitro con diferentes antígenos a medida que se incrementa el tiempo de infección, es decir el efecto supresor ejercido por las células de animales --

...33

infectados el día 17 no se presenta cuando los animales tienen 5 días de --  
infección, lo que sugiere que el efecto inmunosupresor es inducido por la -  
infección.



EFFECTO SUPRESOR DE LAS CELULAS DE BAZO DE RATONES CON 5 DIAS DE INFECCION  
 SOBRE LA ESTIMULACION DE CELULAS NORMALES CON Con A y LPS.

Composición del cultivo <sup>a</sup>		Incorporación de <sup>3</sup> H-TdR, cpm ± E.E. <sup>c</sup>					
Normal	Infectado	Con A <sup>b</sup>	% Inh	P	LPS <sup>b</sup>	% Inh	P
2.5 X 10 <sup>5</sup>		201605 ± 13933			47545 ± 6723		
-	2.5 X 10 <sup>5</sup>	155342 ± 7115	0	< 0.05	59913 ± 1870	0	> 0.05
5.0 X 10 <sup>5</sup>	-	576878 ± 16338			104018 ± 3490		
-	5.0 X 10 <sup>5</sup>	314734 ± 9690	0	< 0.001	61470 ± 1722	41	< 0.001
2.5 X 10 <sup>5</sup>	2.5 X 10 <sup>5</sup>	486530 ± 9031	0	< 0.001	85858 ± 1642	20	< 0.001

a) Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h y se marcó durante las últimas 18 h con 1 μCi de <sup>3</sup>H-TdR.

b) Se adicionó Con A a una concentración de 2 μg/ml y LPS a 200 μg/ml.

c) Los resultados se expresan como el promedio aritmético del número de cpm ± E.E. de 4 cultivos.

T A B L A II

EFFECTO SUPRESOR DE LAS CELULAS DE BAZO DE RATONES CON 10 DIAS DE INFECCION  
SOBRE LA ESTIMULACION DE CELULAS NORMALES CON CON A Y LPS

Composición del cultivo <sup>a</sup>		Incorporación de <sup>3</sup> H-TdR, cpm ± E.E. <sup>c</sup>					
Normal	Infectado	Con A <sup>b</sup>	% Inh	<u>P</u>	LPS <sup>b</sup>	% Inh	<u>P</u>
2.5 X 10 <sup>5</sup>	-	187566 ± 9715			69751 ± 575		
-	2.5 X 10 <sup>5</sup>	176196 ± 3248	6 >	0.05	62969 ± 731	9 >	0.05
5.0 X 10 <sup>5</sup>	-	552600 ± 5572			120276 ± 5185		
-	5.0 X 10 <sup>5</sup>	312095 ± 14030	43 <	0.001	58458 ± 1849	51 <	0.001
2.5 X 10 <sup>5</sup>	2.5 X 10 <sup>5</sup>	366836 ± 12055	0 <	0.001	63352 ± 3006	52 >	0.05

a) Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h y se marcó las --  
últimas 18 h con 1 μCi de <sup>3</sup>H-TdR.

b) Se adicionó Con A a una concentración de 2 μg/ml y LPS a 200 μg/ml.

c) Los resultados se expresan como el promedio aritmético del número de cpm ± E.E. de 4 cul-  
tivos.

T A B L A II

EFEECTO SUPRESOR DE LAS CELULAS DE BAZO DE RATONES CON 10 DIAS DE INFECCION  
SOBRE LA ESTIMULACION DE CELULAS NORMALES CON CON A Y LPS

Composición del cultivo <sup>a</sup>		Incorporación de <sup>3</sup> H-TdR, cpm ± E.E. <sup>c</sup>					
Normal	Infectado	Con A <sup>b</sup>	% Inh	P	LPS <sup>b</sup>	% Inh	P
2.5 X 10 <sup>5</sup>	-	187566 ± 9715			69751 ± 575		
-	2.5 X 10 <sup>5</sup>	176196 ± 3248	6 >	0.05	62969 ± 731	9 >	0.05
5.0 X 10 <sup>5</sup>	-	552600 ± 5572			120276 ± 5185		
-	5.0 X 10 <sup>5</sup>	312095 ± 14030	43 <	0.001	58458 ± 1849	51 <	0.001
2.5 X 10 <sup>5</sup>	2.5 X 10 <sup>5</sup>	366836 ± 12055	0 <	0.001	63352 ± 3006	52 >	0.05

a) Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h y se marcó las --  
últimas 18 h con 1 μCi de <sup>3</sup>H-TdR.

b) Se adicionó Con A a una concentración de 2 μg/ml y LPS a 200 μg/ml.

c) Los resultados se expresan como el promedio aritmético del número de cpm ± E.E. de 4 cul-  
tivos.

T A B L A III  
 EFECTO SUPRESOR DE LAS CELULAS DE BAZO DE RATONES CON 16 DIAS DE INFECCION  
 SOBRE LA ESTIMULACION DE CELULAS NORMALES CON Con A Y LPS.

<u>Composición del cultivo<sup>a</sup></u>		<u>Incorporación de <sup>3</sup>H-TdR, cpm ± E.E.<sup>c</sup></u>					
Normal	Infectado	Con A <sup>b</sup>	% Inh	<u>P</u>	LPS <sup>b</sup>	% Inh	<u>P</u>
2.5 X 10 <sup>5</sup>	-	307745 ± 10485			93775 ± 3238		
-	2.5 X 10 <sup>5</sup>	53741 ± 2419	83	< 0.001	8677 ± 2354	91	< 0.001
5.0 X 10 <sup>5</sup>	-	218131 ± 5359			67155 ± 1209		
-	5.0 X 10 <sup>5</sup>	35954 ± 4416	84	< 0.001	7611 ± 509	89	< 0.001
2.5 X 10 <sup>5</sup>	2.5 X 10 <sup>5</sup>	108830 ± 5516	70	< 0.001	15460 ± 1407	85	< 0.001

a) Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h y se marcó durante las últimas 18 h con 1 μCi de <sup>3</sup>H-TdR.

b) Se adicionó Con A a una concentración de 2 μg/ml y LPS a 200 μg/ml.

c) Los resultados se expresan como el promedio aritmético del número de cpm ± E.E. de 4 cultivos.

T A B L A IV

EFFECTO SUPRESOR DEL SUERO DE RATONES INFECTADOS SOBRE LA ESTIMULACION  
MITOGENICA DEBIDA A CON A Y LPS EN CELULAS DE BAZO DE RATONES NORMALES

Células normales por cultivo <sup>b</sup>	Origen del suero <sup>a</sup>		Incorporación de <sup>3</sup> H-TdR, cpm ± E.E.			
	Normales	Infectados	Con A	<u>P</u>	LPS	<u>P</u>
5.0 X 10 <sup>5</sup>	dil 1: 5	-	135674 ± 2814		37586 ± 177	
5.0 X 10 <sup>5</sup>	dil 1: 10	-	221641 ± 5422		35255 ± 807	
5.0 X 10 <sup>5</sup>	-	dil 1: 5	26784 ± 2529	< 0.001	1181 ± 339	< 0.001
5.0 X 10 <sup>5</sup>	-	dil 1:10	70726 ± 2232	< 0.001	6590 ± 1012	< 0.001
5.0 X 10 <sup>5</sup>	-	dil 1:20	181924 ± 6488		27366 ± 2228	

- a) El suero se obtuvo de ratones BALB/c sanos ó infectados con T. Cruzi, los que se descomlemtaron a 56°C durante 30 min, se diluyeron en medio de cultivo y se esterilizaron por filtración millipore.
- b) Las células de bazo de ratones normales se estimularon con Con A y LPS en presencia o ausencia de 50 µl de suero normal o infectado. Los cultivos se mantuvieron a 37°C durante 72 h y 18 hr antes de terminar el cultivo se añadió 1 µCi de <sup>3</sup>H-TdR.

T A B L A V

EFFECTO DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE CELULAS DE BAZO DE RATONES A  
 DIFERENTES DIAS DE INFECCION SOBRE CULTIVOS DE CELULAS DE BAZO DE RATONES  
 NORMALES ESTIMULADOS CON CON A Y LPS.

Células normales por cultivo <sup>c</sup>	Origen del sobrenadante <sup>a</sup>	Incorporación de <sup>3</sup> H-TdR, cpm ± E.E.			
		Con A <sup>b</sup>	<u>P</u>	LPS <sup>b</sup>	<u>P</u>
5.0 X 10 <sup>5</sup>	Normales	277619 ± 5151		40836 ± 1995	
5.0 X 10 <sup>5</sup>	Infectados (día 5)	233158 ± 23636	> 0.05	35013 ± 901	> 0.05
5.0 X 10 <sup>5</sup>	Infectados (día 10)	162708 ± 16731	< 0.001	18215 ± 1369	< 0.001
5.0 X 10 <sup>5</sup>	Infectados (día 15)	182293 ± 3973	< 0.001	21288 ± 1495	< 0.001

a) Se incubaron  $5 \times 10^5$  células durante 48 h y los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación y posteriormente se concentraron 2.5 X con membrana de Amicon B-15.

b) Los cultivos fueron estimulados con Con A a una concentración de 2 µg/ml y LPS a 200 µg/ml.

c) Las células normales se incubaron durante 72 h y 18 h antes de terminar el cultivo se les -  
 adició 1 µCi de <sup>3</sup>H-TdR.

T A B L A VI

EFFECTO DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE CELULAS DE BAZO DE RATONES  
A DIFERENTES DIAS DE INFECCION SOBRE CULTIVOS DE CELULAS DE BAZO DE  
RATONES NORMALES ESTIMULADOS CON CON A Y LPS

Células normales por cultivo <sup>c</sup>	Origen del sobrenadante <sup>a</sup> (Cultivos de células de ratones)	Incorporación de $^3\text{H-TdR}$ , cpm $\pm$ E.E.:			
		Con A <sup>b</sup>	<u>P</u>	LPS <sup>b</sup>	<u>P</u>
$5.0 \times 10^5$	Normales	179913 $\pm$ 656		9353 $\pm$ 678	
$5.0 \times 10^5$	Infectados (día 5)	187703 $\pm$ 2326	$> 0.05$	8129 $\pm$ 848	$< 0.05$
$5.0 \times 10^5$	Infectados (día 10)	121930 $\pm$ 10230	$< 0.05$	5642 $\pm$ 1591	$< 0.05$
$5.0 \times 10^5$	Infectados (día 15)	32820 $\pm$ 3064	$< 0.001$	573 $\pm$ 2388	$< 0.05$

a) Se incubaron  $5 \times 10^5$  células durante 48 h y los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación y posteriormente se concentraron 5 X con membrana de Amicon B-15.

b) Los cultivos fueron estimulados con Con A a una concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  y LPS a 200  $\mu\text{g/ml}$ .

c) Las células normales se incubaron durante 72 h y 18 h antes de terminar el cultivo se les adicionó 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H-TdR}$ .

## FIG. 1

Determinación in vitro de la dosis óptima de DNP-Ficoll, sobre la estimulación de células de bazo de ratones normales. La inducción de respuesta primaria se hizo con 1  $\mu$ g, 5  $\mu$ g y 10  $\mu$ g - los cuales se añadieron al inicio del cultivo - con  $10 \times 10^6$  células/ml.




Las células se incubaron durante 4 días a  $37^{\circ}\text{C}$  y en atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  (82). Después de este tiempo se determinó el número de células formadoras de anticuerpo directas por el método de Jerne (83), para lo cual se usaron eritrocitos de carnero acoplados a TNP según la técnica descrita por Rittenberg y Pratt (78).

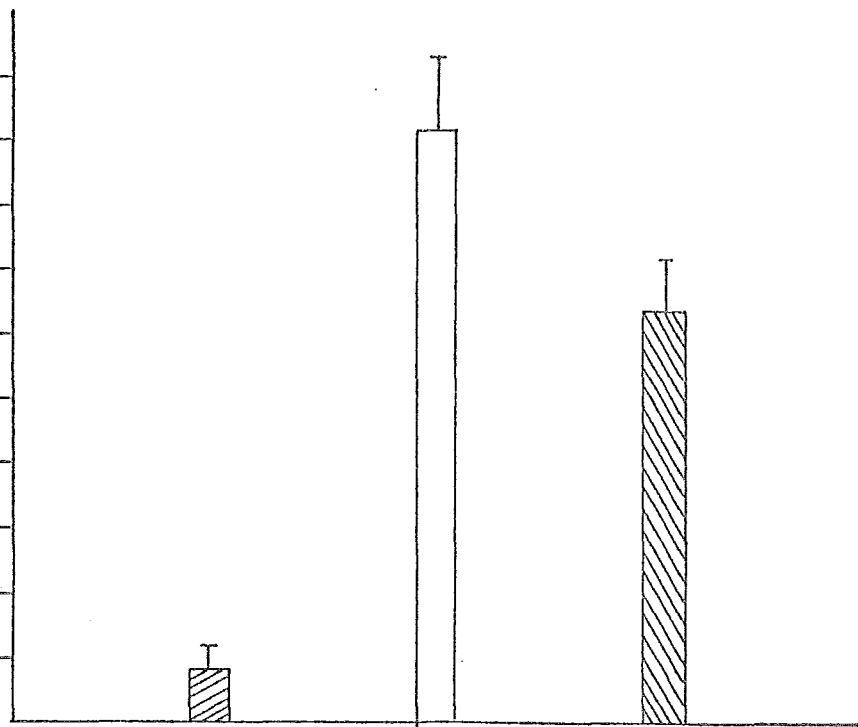


CFA / 10<sup>6</sup>

100

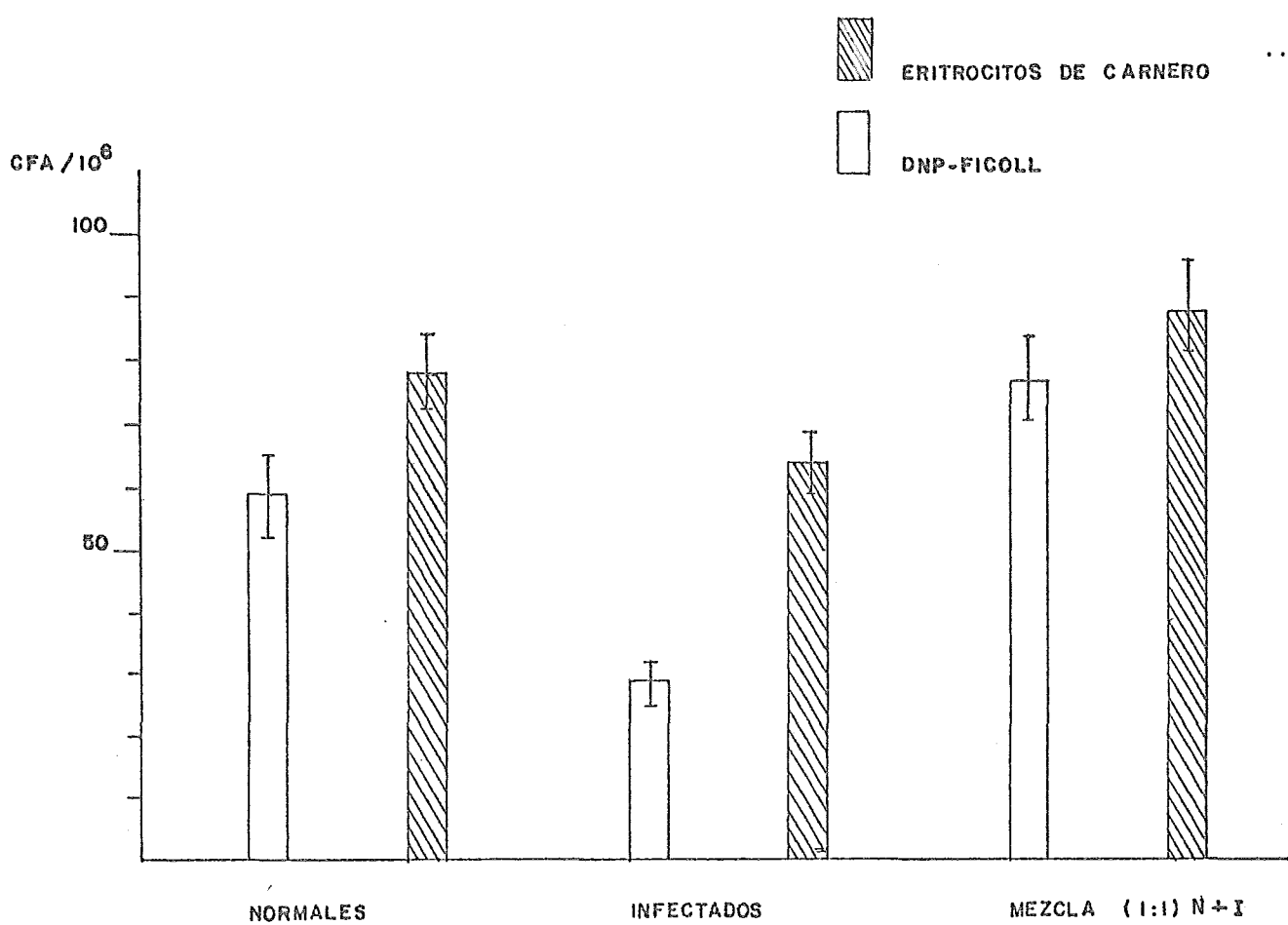
50

-  1 µg/ml.
-  5 µg/ml.
-  10 µg/ml.



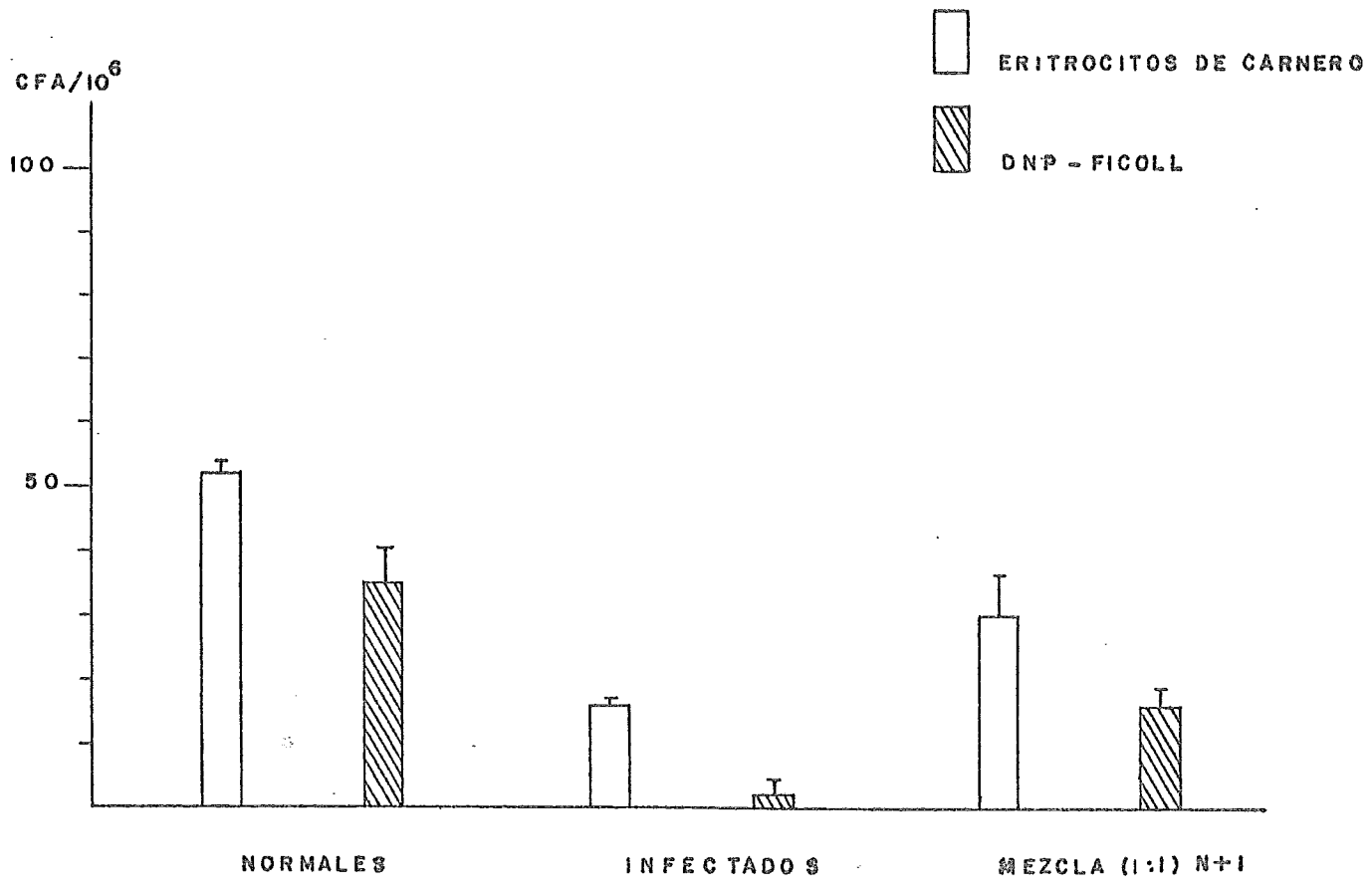
## FIG. 2

Respuesta inmune primaria in vitro a eritrocitos de carnero y a DNP-Ficoll de células de bazo de ratones normales, de ratones con 5 días de infección y de la mezcla de ambas células en proporción (1:1). Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> (82) y 4 días después se determinó el número de CFA directas por el método de Jerne (83). Para determinar el número de CFA contra TNP se emplearon eritrocitos de carnero a los cuales se les acopló el TNP según la técnica de Rittenberg y Pratt (78).



## FIG. 3

Respuesta inmune primaria in vitro a eritrocitos de carnero y a DNP-Ficolli de células de bazo de ratones normales, de ratones con 17 días de infección y de la mezcla de células normales e infectadas en proporción (1:1). Los cultivos se incubaron a 37°C y en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 4 días después (82) se determinó el número de CFA directas por el método de Jerne (83). Para determinar el número de CFA contra TNP se emplearon eritrocitos de carnero los cuales fueron acoplados con TNP, según la técnica de Rittenberg y Pratt (78).



## FIG. 4

Efecto del suero de ratones normales y de ratones infectados (17 días), sobre la inducción de la respuesta primaria in vitro de células normales a eritrocitos de carnero (EC) (82). Se cultivaron  $10 \times 10^6$  células de bazo y se estimularon con eritrocitos de carnero en presencia o ausencia de suero normal o infectado. Después de 4 días de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y en atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ , se determinó el número de CFA directas contra eritrocitos de carnero, por la técnica de hemólisis localizada en gel (método de Jerne (83)).

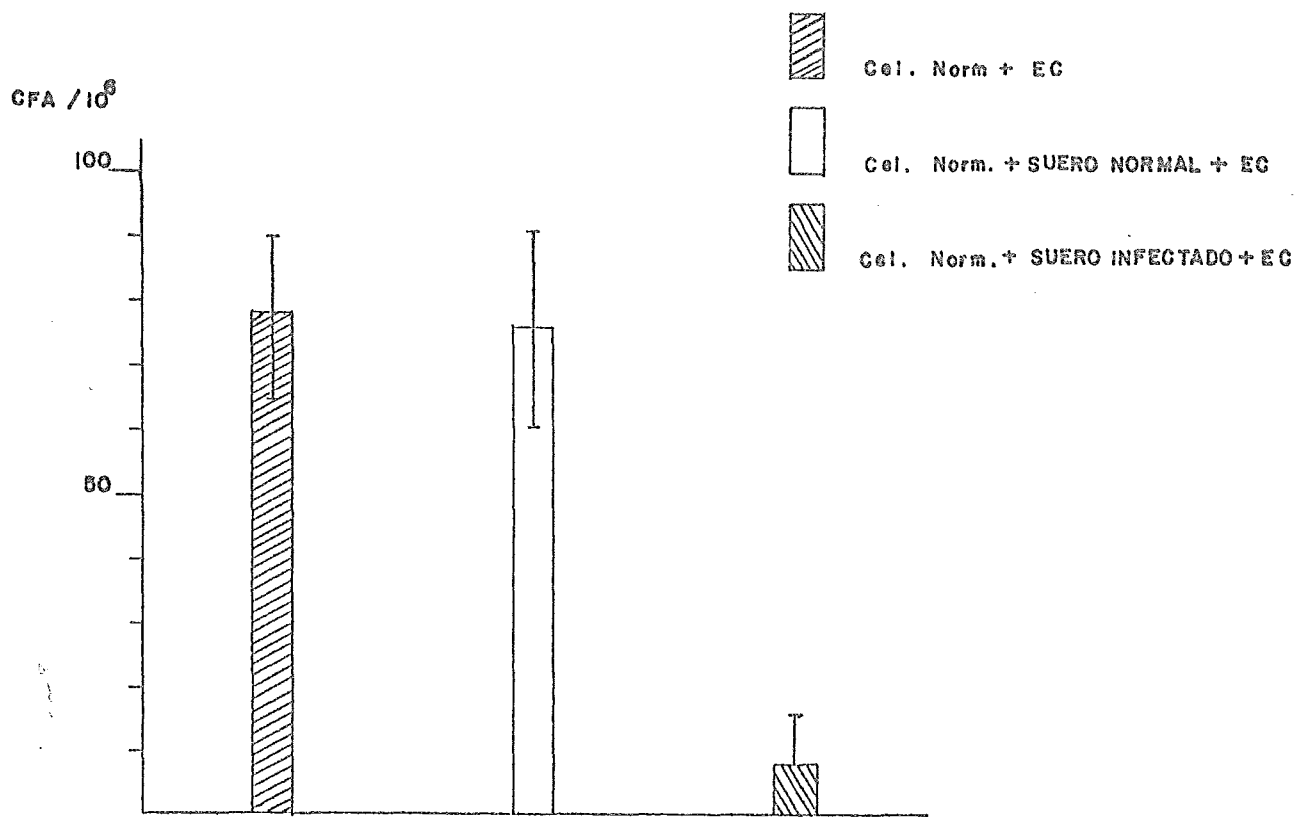


FIG. 5

Determinación de viabilidad celular por exclusión del azul tripano de células de bazo de ratones normales bajo las siguientes condiciones: 1) SN normal + medio; 2) SN normal + Con A; 3) SN normal + LPS; 4) SN infect<sub>5</sub> + medio; 5) SN infect<sub>5</sub> + Con A; 6) SN infect<sub>5</sub> + LPS; 7) SN infect<sub>10</sub> + medio; 8) SN infect<sub>10</sub> + Con A; 9) SN infect<sub>10</sub> + LPS; 10) SN infect<sub>17</sub> + medio; 11) SN infect<sub>17</sub> + Con A; 12) SN infect<sub>17</sub> + LPS. Se cultivaron  $5 \times 10^5$  células de bazo en placas para microcultivo en presencia ó ausencia de sobrenadantes provenientes de cultivos de 48 h de células normales (SN) o bien provenientes de cultivos de células de animales infectados (SN infect.), a diferentes días.

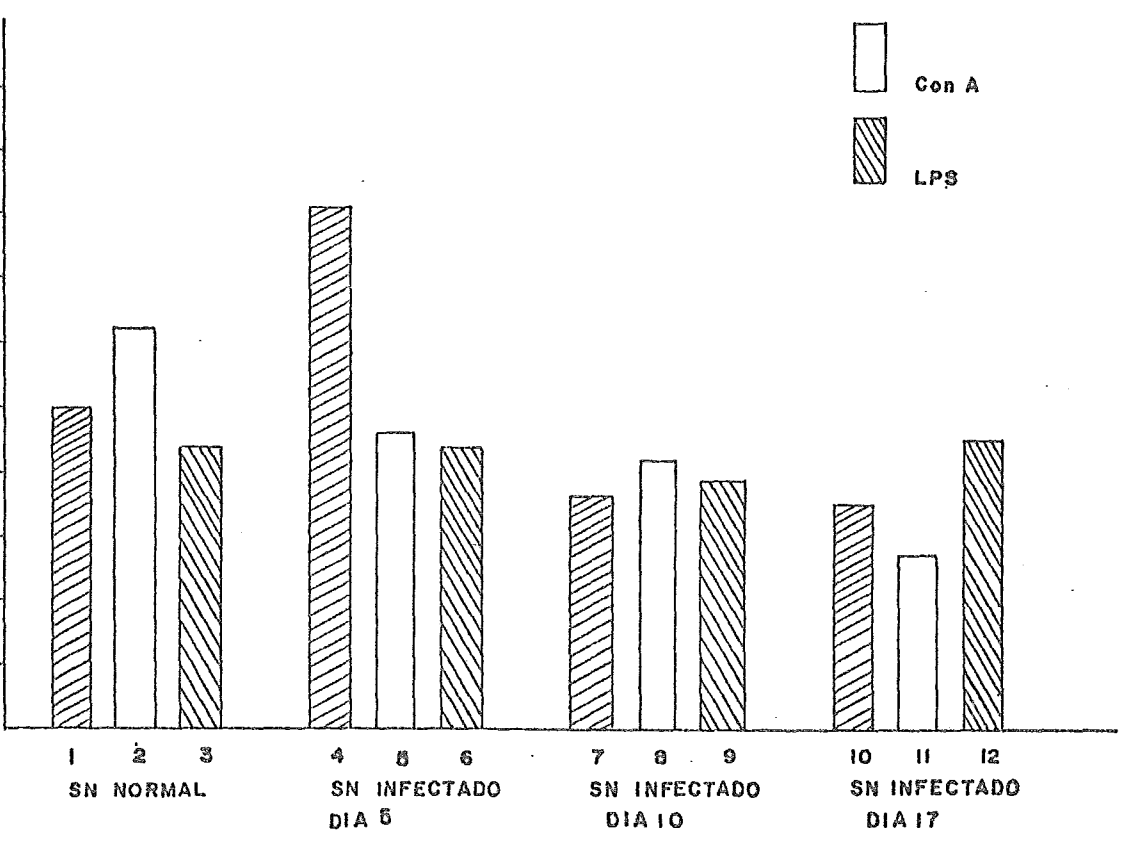
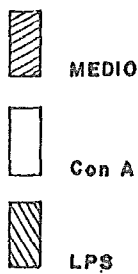
Las células se estimularon con Con A ó LPS durante 72 h y al final de este período se hizo la determinación de viabilidad de los cultivos por triplicado.



(%) DE VIABILIDAD

100

50



## V DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran un estado de supresión de la respuesta inmune en ratones infectados experimentalmente con T. cruzi. El efecto inmunosupresor se hizo evidente cuando las células de bazo de ratones infectados fueron incapaces de responder al efecto mitogénico inducido por la estimulación con Con A y LPS, (Tablas I, II y III). Además las células de ratones infectados fueron capaces de inhibir la respuesta mitogénica de células de animales normales a la estimulación con Con A y LPS.

El estado de inmunosupresión en los ratones se observó inicialmente después de 10 días de infección y aumentó progresivamente, el cual se acompañó de un incremento de parásitos en circulación (87). Una vez establecido el fenómeno de supresión se mantuvo hasta la muerte de los animales. Estos datos sugieren la presencia de una población de células supresoras en el bazo de los animales infectados, que puede ser la responsable parcialmente de la inmunosupresión observada en la respuesta inmune de estos animales (71,72).

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los reportados por Ramos y col (76), quienes demostraron que las células de bazo de animales infectados tienen la capacidad de suprimir in vitro la respuesta de células normales a la estimulación mitogénica y que las células responsables del efecto supresor no son adherentes, pero son sensibles al tratamiento con suero antilinfo-cítico y complemento, de esta manera proponen que la célula causante de la --

inmunosupresión puede ser un linfocito T ó derivados del timo.

El grupo de Cunningham (85) demostró una sustancia supresora en el suero de ratones C57BL/6 infectados con T. cruzi, la cual es inducida en la etapa temprana de la infección y su actividad supresora permanece hasta el día 60 de infección, después del cual la actividad supresora se pierde en el suero de estos animales.

Además encontró que la interacción de la sustancia soluble subresora era funcionalmente inactivada, modificada ó quitada del suero por incubación con células de bazo normal ó preparación enriquecidas de linfocitos B. Una exposición prolongada de las células de bazo con la sustancia supresora resultó en la activación de células que ejercen un efecto supresor sobre la respuesta de anticuerpos de células de bazo normales.

Como se puede observar en la Tabla IV el suero proveniente de ratones -- infectados ejerce un efecto supresor sobre las células de bazo de ratones normales cuando se estimularon con mitógenos ó antígenos (Fig 4).

Cuando se cultivaron células de bazo de ratones infectados a diferentes días se encontró que los sobrenadantes obtenidos de estas células ejercen un efecto supresor, el cual se puso de manifiesto cuando se incubaron con células normales y se estimularon con mitógenos (Con A y LPS) Tablas V y VI, y este efecto fué dependiente de la concentración.

Waksman y col (88) han demostrado que líneas de células linfoides huma--

producen mediadores solubles que modifican y que posiblemente regulan la respuesta inmune. Algunos reportes sugieren que algunas líneas de células linfoides (89) humanas son capaces de producir sustancias que inhiben la síntesis de DNA en linfocitos humanos estimulados con mitógenos.

La inmunosupresión se hizo evidente no solo contra antígenos particulados, sino también contra antígenos solubles cuando en un sistema de Mishell-Dutton (82), se cultivaron células de bazo de ratones infectados y se sensibilizaron con estos antígenos (eritrocitos de carnero y DNP-Ficoll), el efecto inmunosupresor se observó cuando se determinaron el número de CFA directas en las células de bazo que tenían 5 días de infección, siendo más marcado este efecto cuando las células de bazo provenían de ratones con 17 días de infección (Fig. 2y 3).

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Clinton y col (71) quienes encontraron que los animales infectados con T. cruzi, son incapaces de dar una respuesta de CFA cuando son inmunizados con glóbulos rojos de burro, en etapas de elevada parasitemia.

Por lo tanto, los datos sugieren que las células supresoras así como las sustancias solubles presentes en el suero y en los sobrenadantes de cultivos de células de animales infectados, pueden participar en los fenómenos de supresión de la respuesta inmune en ratones infectados con T. cruzi.

Cunningham y col (90) demostraron la existencia de sustancias presentes en el suero de ratones infectados con T. cruzi que son capaces de inducir --

un estado supresor de la respuesta humoral a antígenos heterólogos; cuando -- los sueros se administraron pasivamente a receptores no infectados y la supre-- sión observada fué similar a la causada por la infección activa.

Es posible que la inmunosupresión inespecífica que presentan los ratones infectados contra antígenos dependientes e independientes del timo (Fig 2 y 3) puede ser mediada en parte, por la participación de células supresoras que -- actúan sobre los linfocitos T y B.

Existen varios mecanismos para explicar la supresión observada durante -- la infección con T. cruzi, entre ellos tenemos: i) Competencia antigénica-- ii) Inducción de células supresoras iii) Fenómenos de activación policlonal,-- iv) Producción de sustancias solubles supresoras.

Feldman y col (91) han sugerido, en relación a la competencia antigéni-- ca, que este fenómeno parece representar una competencia por sitios sobre la-- superficie de los macrófagos, que previenen la interacción normal de las célu-- las T y B (92). En infecciones por otros trypanosomas es posible que la canti-- dad masiva de parásitos con la que se encuentre el sistema inmune del huésped pueda inducir una situación donde la competencia antigénica por la unión a ma-- crófagos, ocurra entre moléculas específicas derivadas de células cooperado-- ras.(93).

Por otro lado, se ha demostrado que el mecanismo involucrado en la inhi-- bición de la producción de anticuerpo por la competencia antigénica, debe --- ocurrir en las etapas tempranas de la respuesta inmune, donde están involucra--

dos eventos previos al reconocimiento antigénico. En efecto, la inhibición es generalmente observada cuando la memoria inmunológica no se ha establecido. Los datos que apoyan la competencia antigénica secuencial en sistemas donde participan eritrocitos heterólogos, sugieren que la memoria inmunológica no está afectada. Por lo tanto, si la competencia antigénica no afecta la memoria inmunológica, este fenómeno no puede ser el mecanismo de la supresión observada en nuestro sistema experimental de infección de ratones con T. cruzi, ya que los animales previamente inmunizados con eritrocitos de carnero y subsecuentemente infectados mostraron una respuesta suprimida a una segunda inmunización con el antígeno.

Otra posibilidad para explicar la inmunosupresión es la participación de células supresoras. En apoyo a esta posibilidad están los hallazgos de Jayawardena y Waksman (94) quienes han demostrado la presencia de células T supresoras en el bazo de ratones infectados con T. brucei.

En nuestros experimentos, la infección por T. cruzi disminuyó la capacidad de las células de bazo de los ratones a responder a mitógenos de células T Con A y de células B LPS, Tabla III.

Los datos que se han obtenido, demuestran la presencia de una población supresora en los bazos de los animales infectados con T. cruzi que es capaz de inhibir la respuesta de células normales a mitógenos Tabla III. La presencia de estas células supresoras pueden ser responsables parcialmente de la inmunosupresión observada en la respuesta humoral y celular de los anima-

les infectados.

Otra posible explicación de la supresión inducida por la infección en ratones, puede ser la estimulación policlonal de células B por mitógenos derivados del parásito (75), lo que conduciría a un estado de agotamiento clonal y consecuentemente a una falta de respuesta a estímulos posteriores con antígenos.

Murray y col' (66) quienes demostraron que la supresión de la respuesta de anticuerpo en animales infectados con T. brucei, se pierde días después del tratamiento con Pentamidina, una droga que elimina de circulación a los parásitos; los autores señalan la imposibilidad de una recuperación inmediata de las células reactivas al antígeno, por lo cual el fenómeno de agotamiento clonal de células B no es el mecanismo responsable de la supresión.

Aún cuando los mecanismos de supresión que participan en muchas infecciones pueden ser de diferente naturaleza, creemos que la presencia de células supresoras y de factores solubles supresores en animales infectados con T. cruzi, puede ser importante en el reconocimiento de la patología de este padecimiento.

1. Feldmann, M., Gorczynsky, R., Erb, P. y Desaynard, C. Cell interactions in antibody production. Problems of heterogeneity, diversity and regulation. En Immune Recognition. (A.S. Rosenthal, Ed.) Adademic Press Inc. - New York, 1975. p. 755.
2. Dumond, D.C., Wolstencroft, R.A., Panayi, G.S., Mathew, M., Morley, J. y Howson, W.T. Lymphokines: non-antibody mediators of cellular immunity -- generated by lymphocyte activation. Nature (Lond) 224: 38 (1969).
3. Pernis, B., Forni, M.D.L. y Amante, L. Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. J. Exp. Med. 132: 1001 (1970).
4. Mitchell, G.F. y Miller, J.F.A.P. Cell to cell interaction in the immune response II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice -- given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 128: 821 (1968).
5. Cunningham, B.A., Sela, B., Yahara, I. y Edelman, G. M. Structure and activities of lymphocyte mitogens. En: Mitogens in immunobiology. (J.J. Oppenheim y D.L. Rosenstreich) p. 13. Adademic Press, New York, 1976.
6. Novogrodsky, A. Selective activations of mouse T and B lymphocytes by -- periodate, galactose oxidase and soybean agglutinin. Eur. J. Immunol. - 4: 646 (1974).
7. Andersson, J., Edelman, G.M., Moller, G. y Sjoberg, O. Activation of B lymphocytes by locally concentrated Con A. Eur. J. Immunol. 2: 233 (1972).



8. Greaves, M.F. y Bauminger, S. Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens. *Nature New Biol.* 235: 67 (1972).
9. Andersson, J., Sjoberg, O. y Moller, G. mitogens as probes for immunocyte activation and cellular co-operation. *Transplant. Rev.* 11: 131 (1972).
10. Coutinho, A. y Moller, G. B cell mitogenic properties of thymus independent antigen. *Nature Nw Biol.* 245: 12 (1973).
11. Moller, E. y Persso, U. Mitogenic properties o rabbit anti-human beta<sub>2</sub>-microglobulin for murine B cells. *Scand. J. Immunol.* 3: 445 (1974).
12. Farnes, P., Barker, B.E., Brownhill, L.E. y Fanger, H. Mitogenic activity in phytolacca americana (Pokeweed). *Lancet* ii: 1100 (1964).
13. Greaves, M. y Janossy, G. Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. *Transplant. Rev.* 11: 87 (1972).
14. Yoshinaga, M., Yoshinaga, A. y Waksman, B.H. Regulation of lymphocyte responses in vitro. I. Regulatory effect of macrophages and thymus-dependent (T) cells on the response of thymus independent (B) lymphocyte to endotoxin. *J. Exp. Med.* 136: 956 (1972).
15. Blythman, H.E. y Waksman, B.H. Effect of locally administered endotoxin on regenerating appendix structure and responses of appendix cells to mitogens. *J. Immunol.* 111:1081 (1973).
16. Betel, I. y Van den Berg, K. J. Interaction of Con A with rat lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 30: 571 (1972).

17. Biberfeld, P. Endocytosis and lysosome formation in blood lymphocytes -- transformed by PHA. *J. Ultrastruct. Res.* 37: 41 (1971).
18. Taylor, R.B., Duffus, W.P.H., Raff, M.C. y De Petris, S. Redistribution and pinocytosis of lymphocyte immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature New Biol.* 233: 225 (1971).
19. Engers, H.D. y Unanue, E.R. Fate of anti-Ig-surface Ig complexes on B lymphocytes. *J. Immunol.* 110: 465 (1973).
20. Ling, N.R. "Lymphocyte activation" Wiley, New York. (1968).
21. Naspitz, C.K. y Richter, M. *Prog. Allergy* 12: 1 (1968).
22. Fisher, D.B. y Mueller, G.C. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 60: 1396 (1968).
23. Pogo, B.G.T., Allfrey, V.G. y Mirsky, A.E. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* -- 55: 805 (1966).
24. Brittinger, G., Kirschhorn, R., Douglas, S.D. y Weissman, G. *J. Cell Biol.* 37: 394 (1968).
25. Faust, E.C., Russell, P.F. y Jung, R.C. *Parasitología clínica En. Protozoarios e infecciones por protozoarios.* Salvat eds (1976).
26. Albright, J.F., Albright, J.W. y Dusanic, D.G. Trypanosome induce spleno megaly and suppression of mouse spleen cell responses to antigen and mitogens. *J. Reticuloendothel. Soc.* 21: 21 (1977).
27. Goble, F.C. Pathogenesis of blood protozoa. *En E.J.L. Soulsby (ed) Biology of parasites,* Academic Press, New York (1966).

28. Goble, F.C. South American Trypanosomes. En: G.J. Jackson, R. Hernan y - - I. Singer (eds). Immunity to parasitic animals, Appleton Century Crofts , New York (1970).
29. Koberle, F. Chagas'disease and Chagas'syndromes. The pathology of American trypanosomiasis. Adv. Parasitol. 6: 63 (1968).
30. Teixeira, A.R.L., Teixeira, M.L. y Santos-Buch, Ch.A. The immunology of - experimental Chagas'disease. IV Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas'disease in man. Amer. J. Pathol. 80: 163 (19-)
31. Cossio, P.M., Laguens, R.P., Diez, C., Szarfman, A., Segal, A. y Arana, - R.M. Chagasic cardiopathy: Antibodies reacting with membrane of striated muscle and endothelial cells. Circulation 50: 1252 (1974).
32. Menezes, H. Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of - -- T. cruzi against experimental infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. - Sao Paulo 10: 1 (1968).
33. Bloom, B.R., y Rowen, A. Cell-mediated immunity in Chagas'disease. WHO - meeting on immunology of Chagas'disease. México, Dic. 3-7 (1973).
34. Behbehani, M.K. Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi infections in X irra- - diated and in thymectomized mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65: -- 265 ( 1971).
35. Schmuñis, G.A., González-Cappa, S.M., Traversa, O.C. y Yanovsky, J.F. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infections with-

- Trypanosoma cruzi in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65: 89 (1971).
36. Roberson, E.L. y Hanson, W.L. Trypanosoma cruzi. Effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp. Parasitol. 34: 168 (1973).
  37. Tschudi, E.I., Anziano, D.F. y Dalamasso, A.P. Lymphocyte transformation in Chagas' disease. Infect. Immun. 6: 905 (1972).
  38. Vattuone, N.H., González-Cappa, S.M., Meneses, S. y Schmuñis, G.A. Cell mediated and humoral immune response of mice infected with Trypanosoma cruzi. Z. Tropenmed. Parasit. 25:267 (1974).
  39. Kierszenbaum, F. Brief Review of the role of antibodies in immunity to Chagas' disease. WHO, México, Dic.3-7 (1973).
  40. Krettli, A.V. y Brener, Z. Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol. 116: 755 (1976)
  41. Budzco, D.B., Pizzimenti, M.C. y Kerszenbaum, F. Effects of complement-depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 11: 86 (1975).
  42. Camargo, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. -- Sao Paulo 8: 227 (1966).
  43. Cerisola, J.A., Alvarez, M. y Rebosolan, J.B. Sensibilidad de las reacciones

33. Reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 24: 2 (1969).
44. Montufar, O.M.B., Musatti, C.C., Mendes, E. y mendes, N. F. Cellular immunity in chronic Chagas'disease. J. Clin. Microbiol. 5: 401 (1977).
45. Reis, A., Chiari, C., Tanus, R. y Andrade, I. Cellular immunity to Trypanosoma cruzi infection in mice. Rev. Med. Trop. Sao Paulo. 18: 422- (1976).
46. Seah, S. Delayed hypersensitivity in Trypanosoma cruzi infection. Nature 225: 1256 (1970).
47. Teixeira, A.R.L. y Santos-Buch, C.A. The immunology of experimental Chagas'disease. II. Delayed hypersensitivity to T. cruzi antigens. Immunology 28:401 (1975).
48. Roberson, E.L. y Hanson, W.L. : Transfer of immunity of T. cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 68: 338 (1974).
49. Santos-Buch, Ch. A. y Teixeira, A.R.L. The immunology of experimental Chagas'disease. III. Rejection of allogenic cells in vitro. J. Exp. Med. 140: 38 (1974).
50. Bloom, B.R. In vitro approaches to the mechanism of cell-mediated immune-reactions, Adv. Immunol. 13: 101 (1971).
51. North, R.J. Importance of thymus-derived lymphocytes in cell-mediated immunity to infection. Cell. Immunol. 7: 166 (1973).

52. Mackaness, G.B. The influence of immunological committed lymphoid cells on macrophage activity in vitro. J. Exp. Med. 129: 973 (1969).
53. Nogueira, N., Gordon, S. y Cohn, Z. Trypanosoma cruzi: Modification of macrophage function during infection. J. Exp. Med. 146: 157 (1977).
54. Nogueira, N. y Cohn, Z.A. Trypanosoma cruzi: In vitro induction of macrophage microbicidal activity. J. Exp. Med. 148: 288 (1978).
55. Ortíz-Ortíz, L., González Mendoza, A. y Lamoyí, E. A vaccination procedure against T. cruzi infection in mice by nonspecific immunization. J. Immunol. 114: 1424 (1975).
56. Butcher, G.A. y Cohen, S. Antigenic variation and protective immunity in Plasmodium knowlesi malaria. Immunology 23: 503 (1972).
57. Corsini, A.C., Clayton, C., Asjonas, B.A. y Ogilvie, B.M. Suppressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with Trypanosoma brucei. Clin. Exp. Immunol. 29: 122 (1977).
58. Cunningham, D.S., Kunh, R.E. y Rowland, E.C. Suppression of humoral response during Trypanosoma cruzi infections in mice. Infect. Immun. 22: 155 (1978).
59. Greenwood, B.M., Whittle, H.C. y Molineux, D.H. Immunosuppression in Gambian trypanosomiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 67: 846 (1973).
60. Waksman, T.A. y Broder, S. Suppressor cells in the regulation of the immune response. Prog. Clin. Immunol. 3: 155 (1977).

61. Feldman, M., Beverley, P.C.L. y Dunkley, M. Different by antigen phenotypes of in vitro induced helper and suppressor cell. Nature (Lond) -- 258: 614 (1975).
62. Cantor, H., Shen, F.W. y Boyse, E.A. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. J. Exp. Med. 143: - - 1391 (1976).
63. Clinton, B.A., Stauber, L.A. y Palczuk, N. C. Leishmania donovani: antibody response to chicken ovalbumin by infected golden hamster. Exp. Parasitol 25: 171 (1969).
64. Barker, L.R. Experimental malaria: Effects upon the immune response to different antigens. J. Infect. Dis. 123: 99 (1971).
65. Strickland, G.T., Ahmed, A. y Sell, K.W. Blastogenic response to toxoplasma-infected mouse spleen cells to T and B-cell mitogens. Clin. Exp. Immunol. 22 : 1667 (1975).
66. Murray, P.K., Jennings, F.W., Murray, M. y Urquhart, G.M. The nature of immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in mice. Immunology - 27: 815 (1974).
67. Reed, S.G., Larson, C.L. y Speer, C.A. Suppression of cell immunity in experimental Chagas' disease. Z. Parasitenk. 52: 11 (1977).

68. Rowland, E.C. y Kuhn, R.E. Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infections. *Infect. Immun.* 20: 393 (1978).
69. Urquhart, G.M., Murray, M., Murray, P.K., Jennings, F.W. y Bate, E. Immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in rats and mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 528 (1973).
70. Greenwood, B.M., Bradley-Moore, A.M., Palit, A. y Bryceson, D.M. Immunosuppression in children with malaria. *Lancet* i: 169 (1973).
71. Clinton, B.A., Ortíz-Ortíz, L., García, W., Martínez, T. y Capín, R. Trypanosoma cruzi. Early immune responses at cellular level by infected mice. *Exp. Parasitol.* 37: 417 (1975).
72. Sánchez, J.L. Alteración de la respuesta inmune celular en ratones infectados con Trypanosoma cruzi. Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM (1978).
73. Eardley, D.D., y Jayawardena, A.N. Suppressor cells in mice infected with T. brucei. *J. Immunol.* 119: 1020 (1977).
74. Murray, P.K., Jennings, F.W., Murray, M. y Urquhart, G.M. The nature of immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in mice. II. The role of the T and B lymphocytes. *Immunology* 27: 825 (1974).
75. Greenwood, B.M. Possible role of a B cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet* 1: 435 (1974).
76. Ramos, C., Schadtler-Siwon, I. y Ortíz-Ortíz, L. Suppressor cells pre-



- sent in the spleen of Trypanosoma cruzi infected mice. J. of Immunol. 122: 1243 (1979).
77. Inman, J.K. Thymus-independent antigen: The preparation of covalent,--haptent-ficoll conjugates. J. Immunol. 114: 704 (1975).
  78. Rittenberg, M.V. y Pratt, K.L. Anti-trinitrophenyl (TNP) plaque assay. Primary response of BALB/c mice to soluble and particulate immunogen. - Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 132: 575 (1969).
  79. Campbell, D.W., Gravey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H., Methods in Immunology. Benjamin, N.Y. (1963).
  80. Rittenberg, M.B. y Amkraut, A.A. J. Immunol. 97: 421 (1966).
  81. Macris, N.T. y Chase, M.W, Federation Proc. 24: 185 (1965).
  82. Mishell, R.I. y Dutton, R.W. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. J. Exp. Med. 126: 423 (1967).
  83. Jerne, N.K. y Nordin, A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science 140: 405 (1963).
  84. Dixon, W.J. y Massey, S.J. Introduction to statistical analysis. M.C. - Graw-Hill, New York. 1969. p.43.
  85. Cunningham, D.S. y Kuhn, R.E. Trypanosoma cruzi induced suppressor substance. I. Cellular involvement and partial characterization. J. Immunol. 124: 2122 (1980).
  86. Martineau, R.S. y Johnson, J.S. Normal mouse serum immunosuppressive - - activity action on adherent cells. J. Immunol. 120: 1550 (1978).

87. Goodyn, I.G., Green, D.G., Guy, M.W. y Voller, A. Immunosuppression -- during Trypanosomiasis. *Br. J. Exp. Path.* 53: 40 (1972).
88. Waksman, B.H. y Namba, Y. Commentary on soluble mediators of immuno--- logic recognition. *Cell. Immunol.* 21: 161 (1976).
89. Hersh, E.M.; McCredie, K.B. y Freireich, J. Imhibition of human lympho- cyte blastogenesis produced by cultured human lymphoblast. *Clin. Exp. - Immunol.* 17: 463 (1974).
90. Cunningham, D.S. y Kuhn, R.E. Trypanosoma cruzi-induced suppression of- the primary immune in murine cell cultures to T-cell-dependent and in-- dependent antigens. *J. Parasitol.* 66: 16 (1980).
91. Feldman, M., Basten, A., Boylston, A., Erb, P., Gorozynski, R., Greaves, M., Hogg, N., Kilburn, D., Kontiainen, S., Parker, D., Pepys, M. y - - Schrader, J. Interactions between T and B lymphocytes and accessory -- cells in antibody production. En L. Brent y J. Holborow (eds.), *Progress in Immunology*. North-Holland Publishing, CO., Amsterdam. (1974).
92. Schrader, J. W. y Feldman, M. The mechanism of antigen competition. I. The macrophage as a site of a reversible block of T-B lymphocyte colla- boration. *Eur. J. Immunol.* 3: 711 (1973).
93. Taussing, M.J. y Lachman, P. J. Studies on antigenic competition II. - Abolition of antigenic competition by antibody against or tolerance to - the dominant antigen: A model for antigenic competition. *Immunology* 22: 185 (1972).