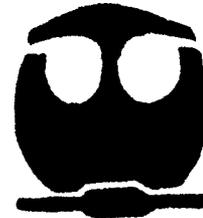




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química
División de Estudios de Posgrado



00544

4
29

SUBPOBLACIONES CIRCULANTES DE LINFOCITOS Y
DE CELULAS T Y B ACTIVADAS EN PACIENTES CON
MIOCARDIOPATIA CHAGASICA Y NO CHAGASICA

T E S I S

Que para obtener el diploma de:
Especialización en Bioquímica Clínica

P r e s e n t a :
Q.F.B. SIXTA GUTIERREZ RIVERA

Este trabajo se realizó en el Departamento
de Hemato-Oncología del Instituto
Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

Director de tesis :
Q.F.B. Josefa Piedras Ross

México, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

LIC. ANTONIO DÍAZ GARCÍA
Jefe de la Unidad de Registro e Información.
Ciudad Universitaria
Presente.

Me es grato informarle que la alumna Q.F.B. SIXTA GUTIÉRREZ RIVERA, presentará próximamente su examen para obtener el diploma de Especialización en Bioquímica Clínica, ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Jesús Guzmán García
Primer Vocal	Dr. Xavier López Karpovitch
Secretario:	Dr. Sergio Sánchez Guerrero
Primer Suplente:	Dr. Pedro Reyes López
Segundo Suplente:	Dra. Rebecca Franco Bourland

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 2 de octubre de 1996.

DR. ANDONI GARRITZ RUIZ
Director.

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
*ggm.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos por su cariño y apoyo brindado en la realización de ésta y todas las tareas de mi vida.

A ti por tu amor y comprensión durante este tiempo.

A los Dres. Xavier López Karpovitch y Pedro Reyes López por la asesoría brindada en la elaboración de este trabajo.

De manera especial a la Q.F.B. Josefa Piedras Ross por su valioso y decisivo apoyo en la realización de este trabajo de tesis.

Y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este trabajo.

INDICE

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	
Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana	3
Clasificación	6
Antecedentes Históricos	7
Métodos de Diagnóstico	12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y METODOS	
Sujetos	14
Pruebas Serológicas	15
Determinación de las Subpoblaciones de Linfocitos por	
Citometría de Flujo	16
Reactivos Utilizados	17
Método Directo de Tinción	18
Método Indirecto de Tinción	19
Análisis de Datos	20
RESULTADOS	
Subpoblaciones de Células T y B totales	21
Subpoblaciones de Células T activadas	21
Subpoblaciones de Células B activadas	22
DISCUSION	23
CONCLUSIONES	27
TABLAS	28
BIBLIOGRAFIA	31

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una infección causada por el *Tripanosoma cruzi*, parásito intracelular que se transmite al hombre a través de un vector, el *Triatoma infestans* (1). La prevalencia varía del 2 al 51 % en América Latina, y se presenta principalmente en comunidades rurales debido al tipo de vivienda ya que en ellas se puede albergar el vector (1).

Cuando el parásito ingresa al organismo ocurre el primer período de la enfermedad que es el de INCUBACION, seguido por un período AGUDO en el cual se pueden presentar algunos síntomas leves, que en su mayoría pasan desapercibidos para el paciente, y por último la fase CRONICA, caracterizada por un daño irreversible al corazón u otros órganos como el esófago o intestino (2).

El pico de parasitemia observado durante la primera semana postinfección induce una activación policlonal la cual es seguida por una reacción de inmunosupresión (3). Ambas, la activación policlonal y la inmunosupresión mediadas por células T, disminuyen o desaparecen durante la fase crónica de la infección. Solo una pequeña proporción de individuos infectados desarrollarán, 15 a 30 años más tarde, una enfermedad crónica caracterizada por miocardiopatía o megaenfermedad (4). La persistencia de algunas clonas de linfocitos B que producen autoanticuerpos de reacción cruzada miocardio y/o músculo esquelético-*T. cruzi* se han propuesto como los responsables de la miocardiopatía y de la megaenfermedad observada en la fase crónica de los pacientes chagásicos (5).

La activación de células T y B produce el incremento de expresión de algunas moléculas existentes, y la aparición *de novo* de otros marcadores de activación incluyendo moléculas de adhesión, así como de receptores para factores de crecimiento y de diferenciación. Los antígenos de superficie de la célula asociados con activación, tales como el receptor de la interleucina 2 (IL-2) (CD25), el antígeno clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-DR) y el receptor de la transferrina (CD71) pueden estar presentes en linfocitos T y B activados (6). Los pacientes en la fase indeterminada (asintomática) o crónica del padecimiento muestran un aumento significativo en el porcentaje de células T y B activadas circulantes (7). También se ha reportado que los linfocitos B que expresan el antígeno CD5 (células B CD5+), son una población celular implicada en padecimientos autoinmunes (8) y están significativamente aumentados en sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos (7).

Por otro lado, existe evidencia que sugiere que en algunos pacientes la miocardiopatía no-chagásica puede ser mediada por un mecanismo inmunológico (9). En el presente trabajo decidimos establecer el grado en el que la cardiomiopatía por sí misma puede contribuir a la concentración anormal de subpoblaciones de linfocitos T y B circulantes, así como de linfocitos T y B activados en pacientes con miocardiopatía, infectados y no infectados con el *T. cruzi*.

GENERALIDADES

ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA.

La enfermedad de Chagas es una infección causada por un parásito intracelular, el *Tripanosoma cruzi*. Fue descubierta por el Dr. Carlos Chagas quien también descubrió el parásito, el vector y las principales manifestaciones de la enfermedad en el hombre (1). En México se tienen noticias de la enfermedad desde el siglo XVI, sin embargo, fue hasta 1940 cuando Mazzotti describió los primeros casos de pacientes afectados por ella (10), a partir de esa fecha se han documentado numerosos casos de esta enfermedad, ubicados en focos endémicos, en los cuales se han encontrado varias especies del vector (*Triatoma dimidiata*, *Triatoma picturata*, *Dipetalogaster maximus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma barberi*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma longipennis*, etc.) (11, 12).

La inoculación ocurre a través de la contaminación fecal de la picadura y el *Tripanosoma* se disemina por vía hemática o linfática (1). Una vez que el parásito se encuentra en el organismo, lo agrede de diversas formas, principalmente destruyendo células del sistema reticuloendotelial y de otros tejidos, tales como corazón, sistema nervioso y aparato digestivo a causa del crecimiento y multiplicación del parásito. Además de la destrucción provocada directamente por el parásito, ocurren procesos de reacción inflamatoria inmunopatológicos que prolongan y agravan la enfermedad (11, 13)

Los síntomas que se presentan después del período de incubación del parásito el cual dura desde 4 hasta 14 días son:

PERIODO AGUDO: En la mayoría de los casos los pacientes son asintomáticos y solamente de 5 a 10 % presentan algunos síntomas que pueden ser el Signo de Romaña-Mazza (complejo oftalmoganglionar), el cual consiste en una blefaritis indolora, bpalpebral, unilateral, eritemo-papulosa, con edema elástico, con reacción conjuntival y ganglionar satélite o bien chagomas de inoculación en otras partes del cuerpo, los que se pueden definir como nodulaciones duras, eritemo-papulosas que pueden presentar pequeñas vesículas; estas lesiones no supuran y evolucionan lentamente (2-4 semanas) y complicaciones viscerales que es el cuadro más grave (12). Los pacientes pueden cursar con hepatoesplenomegalia, poliadenitis generalizada, diarrea, signos bronquiales, cardiomegalia o miocarditis y meningoencefalía. En este período se encuentra una parasitemia muy alta (3), lo cual induce una activación policlonal que es seguida por una reacción de inmunosupresión mediada por células T (1, 14).

Después del período agudo se presenta un PERIODO DE LATENCIA que puede durar indefinidamente. Después de muchos años aparece un PERIODO CRÓNICO en el cual se puede presentar daño irreversible al corazón u otros órganos como esófago o intestino y tanto la activación policlonal como la inmunosupresión disminuyen o desaparecen (1).

En el miocardio los parásitos bloquean los haces, produciendo disfunción (bloques de rama), dilatación (cardiopatías), o inflamación miocárdica (miocarditis aguda) con infiltración de células polimorfonucleares y mononucleares como linfocitos, monocitos y células plasmáticas que posteriormente se traducirá en inflamación mononuclear con fibrosis (miocarditis chagásica crónica) (15). Estos hallazgos sugieren la posible

participación de procesos inmunes, especialmente de autoinmunidad y reacciones de hipersensibilidad retardada en la patogénesis de la cardiopatía chagásica (15, 16, 17).

La miocardiopatía chagásica crónica una vez iniciada avanza hacia la insuficiencia cardíaca y el cuadro clínico varía según sea el grado de la misma. Los síntomas más comunes son las palpitaciones y la disnea, menos frecuentes, los estados vertiginosos y otros sincopales, precordalgias y síntomas originados por la estasis visceral, particularmente la hepática. Las palpitaciones son el síntoma más común y generalmente lo que refiere el enfermo, éstas son provocadas por el esfuerzo o las emociones. En las fases finales de la insuficiencia cardíaca es común que además de los signos de congestión general (insuficiencia de las cavidades derechas), se perciben también manifestaciones de insuficiencia izquierda. Los dolores precordiales son síntomas de observación común. Los estados vertiginosos seguidos o no de crisis convulsivo-sincopales son referidos por algunos pacientes con bloqueo aurículo-ventricular total y arritmias ventriculares: (10).

La miocardiopatía chagásica crónica se desarrolla en un 20 a 30 % de los enfermos que cursaron el período agudo e indeterminado de la enfermedad, por lo cual se presenta generalmente en pacientes de más de 40 años de edad, aunque esto no es determinante ya que puede presentarse en pacientes de todas edades, aun en niños (1, 10)

En nuestro país según datos obtenidos por Rodas y cols (11). en un estudio realizado en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, el 40 % de las cardiopatías dilatadas idiopáticas, correspondieron al diagnóstico de miocardiopatía chagásica crónica.

CLASIFICACION

La clasificación evolutiva de la cardiopatía chagásica crónica según la Organización Mundial de la Salud (1) (1972), es la siguiente:

Primer período. Infección por *T. cruzi* demostrada parasitológica o serológicamente, pero sin ninguna evidencia clínica, radiológica o electrocardiográfica de compromiso cardíaco.

Segundo Período. Sintomatología ausente o discreta, área cardíaca normal o ligeramente crecida en la radiografía, con presencia de alteraciones benignas en el electrocardiograma (Bloqueo completo de rama derecha -BCRD-, extrasístoles aisladas, alteraciones difusas de la onda T).

Tercer período. Sintomatología evidente, cardiomegalia moderada, presencia de alteraciones importantes en el electrocardiograma (BCRD más hemibloqueo auricular izquierdo, zonas de inactivación, etc).

Cuarto período. Sintomatología acentuada, con insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomegalia, alteraciones acentuadas en el electrocardiograma (arritmias graves, extensas áreas de inactivación eléctrica).

Existen diversas teorías para explicar la etiopatogenia de la enfermedad (2), aunque se ha sugerido que su desarrollo podría estar asociado a seis posibles mecanismos patogénicos:

1. Lesión directa de tipo mecánico por parasitismo de las células por el *T. cruzi*.
2. Lesión producida por toxinas liberadas por el parásito o por la interacción de éste.
3. Alteraciones del sistema nervioso autónomo.
4. Lesión inducida por la respuesta autoinmune del huésped.
5. Lesión microvascular.
6. Teoría combinada o mixta.

Con estas teorías se ha logrado explicar algunas de las fases de la enfermedad, teniendo mayor aceptación las que asocian a la enfermedad de Chagas con un proceso de autoinmunidad debido a sus características, v. gr. que aún cuando se dá tratamiento inmediato en la fase aguda y la acción del parásito es contenida, el curso de la enfermedad continúa ya que persisten algunas clonas de linfocitos B que producen anticuerpos anti *T. cruzi* que causan reacción cruzada con el miocardio o músculo esquelético. Después de la fase aguda, la actividad de estas células autoinmunes sigue aumentando conduciendo cada vez a mayor cantidad de tejido dañado y con ello incrementando la patología (2).

ANTECEDENTES HISTORICOS

Debido a las numerosas teorías que habían surgido para explicar la etiopatogenia de la miocardiopatía chagásica crónica, Jörg en 1965 (18) formuló una hipótesis en la cual propuso que esta enfermedad era el resultado de un proceso pluripatogénico, siendo el *Tripanosoma* sólo el factor inicial de una cadena de procesos interrelacionados. A partir de esta fecha, se han realizado diversos estudios tanto en animales como en seres

humanos para esclarecer el comportamiento del sistema inmunológico en la Tripanosomiasis Americana.

Un grupo de investigadores, Yanovsky y cols (19) y Teixeira y cols (20), dirigió sus esfuerzos para demostrar que la inmunidad mediada por células juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad evaluando la función de los linfocitos T, principalmente mediante el factor de la inhibición de la migración de los leucocitos (MIF) en cada uno de los períodos de la infección. Estos autores encontraron que los pacientes con Chagas agudo tenían MIF significativamente más alto que los pacientes en fase indeterminada y en fase crónica quienes presentaban una concentración predominante de células mononucleares con actividad fagocítica (19, 21). Los resultados de estos estudios sugieren que la función de los linfocitos T está deprimida en los pacientes aún sin sintomatología aparente lo cual demuestra que la inmunodepresión puede ser adquirida en el curso de la infección. Lo anteriormente mencionado sugiere que la enfermedad de Chagas podría estar influenciada por los factores del hospedero que controlan el número de parásitos y la respuesta inmunitaria para conducir a una infección persistente.

En 1984 Gusmao y cols (22) realizaron experimentos con cultivos de linfocitos en tres grupos de pacientes: control, con enfermedad de Chagas en fase Indeterminada y con miocardiopatía crónica. Los cultivos de linfocitos fueron expuestos a distintos antígenos (antígeno de cultivo celular -derivado de tripomastigote y amastigote-, epimastigote y PPD). La respuesta celular no mostró diferencia significativa entre los grupos lo cual sugiere que el sistema inmunitario de los pacientes crónicamente infectados se encuentra íntegro. Este investigador sugiere por primera vez que otros factores o ciertas

características pueden influir en las consecuencias de la infección crónica por *T. cruzi*.

Posteriormente Schmunis y cols (23) sugirieron que la participación de un fenómeno autoinmune conducía al daño del miocardio en la enfermedad crónica. Basados en el hecho de que es muy raro encontrar formas intracelulares del parásito en las lesiones chagásicas. La génesis de esta respuesta autoagresiva es todavía controversial y hay varios trabajos que han demostrado que los linfocitos T autoinmunes son activados por antígenos comunes compartidos por *T. cruzi* y las células del hospedero.

Barral y cols (14) realizaron estudios de cultivo mixto de linfocitos autólogos (LAM) en pacientes infectados por *T. cruzi*, en fase indeterminada, megaenfermedad y miocardiopatía; encontrando que mientras los pacientes con megaenfermedad mostraron una respuesta proliferativa normal cuando se compararon con el grupo control, los del grupo en fase indeterminada tuvieron una respuesta más baja en contraste con los pacientes con miocardiopatía quienes presentaron una respuesta proliferativa muy alta. Las diferencias importantes en la respuesta proliferativa entre los distintos grupos de pacientes, a pesar de estar todos infectados con el mismo parásito, apoya la teoría que sostiene que existe una regulación inmunológica aberrante en la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

Uno de los primeros trabajos que se hicieron para conocer la importancia que tienen las células T CD8+ en el control inmunitario de la infección por *T. cruzi* fue realizado por Tarlenton en 1989 (24), en ratones a los cuales se les neutralizó la población de linfocitos T CD8+ con anticuerpos anti CD8. En este estudio se demostró el papel importante de las células CD8+ en la inmunidad contra *T. cruzi* en la fase aguda de la infección pero no en

la fase crónica, sugiriendo que las células T CD8+ poseen actividad citotóxica o son productoras de citocinas.

Otro estudio que refuerza lo anterior fue realizado en ratas a las cuales se les midió el número de células CD3+, CD4+, CD8+ en sangre, bazo y corazón, encontrando la actividad de las células NK (Asesinas naturales) incrementada en todos los órganos estudiados, lo cual podría indicar que la función principal de las células NK contra esta infección es la producción de linfocinas, tales como interferón gamma, factor estimulador de colonias de monocitos y macrófagos, factor de necrosis tumoral y factor quimiotáctico de macrófagos (14). Con estos resultados se podría hipotetizar que la infiltración linfocitaria, incluyendo células NK, contribuye a la lesión cardíaca y a la patología autoinmune de la enfermedad de Chagas.

Otros investigadores han contribuido con observaciones que indican que las proporciones de los receptores de las células T (RcT) (CD4+/RcT+ y CD8+/RcT+) se encuentran alterados (25, 26). Cuando ocurre cualquiera de los fenómenos anteriores se afecta la activación de los linfocitos e interfiere en el proceso de reconocimiento del antígeno lo que conduce a inmunosupresión en los pacientes infectados por *T. cruzi* (7, 27).

Los estudios anteriormente descritos mencionan varias manifestaciones de inmunosupresión durante el curso de la enfermedad, y se refieren en su mayoría a las alteraciones que ocurren en la inmunidad celular, sin embargo, la inmunidad humoral también se ve afectada.

Se ha demostrado que desde el día 14 después de la infección se produce inmunoglobulinemia la que se incrementa a partir del día 28 y persiste a través de la fase crónica de la enfermedad. Las inmunoglobulinas que se producen en mayor cantidad son la IgG2a y la IgM, y están dirigidas principalmente contra la miosina, mielina y queratina. La activación policlonal de las células B que aparece en fases tempranas de la enfermedad y persiste durante la fase crónica de la misma, ha conducido a proponer otra de las hipótesis de la patogénesis de la enfermedad de Chagas la cual sugiere que al menos en parte, la inmunosupresión observada durante la fase aguda y la autoinmunidad asociada con la infección crónica por *T. cruzi* pueden ser debidas a la intensa activación policlonal en la etapa temprana de la enfermedad; sin embargo, no se ha esclarecido si la producción de autoanticuerpos también es debida a la activación policlonal de las células B (28).

Uno de los primeros estudios de las subpoblaciones de linfocitos T y B en pacientes con enfermedad de Chagas mediante citometría de flujo fue realizado por Dutra y cols (7). En este estudio se encontraron diferencias significativas entre las subpoblaciones de linfocitos de pacientes chagásicos y controles no chagásicos principalmente en el número de células B CD5+, las cuales se encontraron elevadas, así como los niveles de CD3+/HLA-DR+; en tanto que los niveles de CD45RA+/CD8+, se encontraron disminuidos; lo cual indica que hay un gran número de linfocitos T activados circulantes en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, sin embargo, no hubo diferencia significativa en la relación de las células CD4+/CD8+. Estos son los fenotipos que se han asociado a respuestas autoinmune, policlonal e hiperinmune con lo que se apoya la teoría mixta de la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

METODOS DE DIAGNOSTICO

Para realizar el diagnóstico de la enfermedad es importante conocer el estado clínico del paciente. En la fase aguda que es cuando se puede demostrar la presencia del parásito se puede realizar: examen directo de la sangre, hemocultivo y xenodiagnóstico.

En la fase crónica se realiza la búsqueda de anticuerpos anti-Tripanosoma cruzi mediante diversas pruebas como: fijación del complemento de Machado y Guerreiro, hemaglutinación, inmunofluorescencia indirecta, ELISA y otros.

En la mayoría de los pacientes con enfermedad de Chagas, la existencia de una infección crónica se asume por la detección de anticuerpos contra *Tripanosoma cruzi*, utilizando métodos serológicos, basados en fracciones heterogéneas del parásito. En esta fase el diagnóstico basado en la identificación directa de parásitos circulantes por medio de xenodiagnósticos o hemocultivos es casi nulo debido a la baja parasitemia en la fase crónica.

Como prueba confirmatoria se realiza inmunoelectrotransferencia (Western Blot) para determinar la presencia de anticuerpos contra proteínas específicas del parásito.

OBJETIVOS

1. Determinar mediante citometría de flujo, las subpoblaciones circulantes de linfocitos T y B totales y de linfocitos T y B activados en pacientes con miocardiopatía chagásica y no chagásica.
2. Conocer el grado de participación de la miocardiopatía en los hallazgos de la concentración de las subpoblaciones circulantes de linfocitos T y B totales y T y B activados en pacientes chagásicos crónicos.

MATERIAL Y METODOS.

SUJETOS

El estudio se realizó en 19 pacientes con diagnóstico bien establecido de miocardiopatía dilatada, provenientes del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Diez de los pacientes tenían positivas las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* y 9 enfermos con las pruebas serológicas negativas tenían los siguientes diagnósticos: 4 miocardiopatía dilatada idiopática; 3 hipertensión arterial sistémica; 1 enfermedad pulmonar obstructiva crónica; 1 miocardiopatía isquémica. Del grupo de pacientes chagásicos 4 eran varones y 6 mujeres con una mediana de edad de 40 años (oscilación; 26 a 57). El grupo de enfermos no chagásicos estuvo constituido por 3 varones y 6 mujeres con una mediana de edad de 53 años (oscilación; 18 a 79). Se incluyó además un grupo control constituido por 5 varones y 8 mujeres aparentemente sanos, con una mediana de edad de 49 años (oscilación; 23 a 78) elegidos del personal del laboratorio así como de sus familiares.

PRUEBAS SEROLOGICAS

La presencia de anticuerpos contra el *T. cruzi* se estableció mediante:

1. La prueba de inmunofluorescencia indirecta en epimastigotes fijados, usando la fracción Fc de la IgG de cabra anti-humana marcada con fluoresceína (30).
2. El ensayo inmunoenzimático en micropozos Immulon II (Dynatech) recubiertos con el extracto del antígeno total del *T. cruzi* (reactivo a una dilución 1:400 de un suero humano experimental), seguido por la adición de la fracción Fc de la IgG de cabra anti-humana marcada con peroxidasa (31).
3. La prueba confirmatoria de Inmunoelectrotransferencia (Western Blot) usando SDS PAGE en condiciones no reductoras y la inmunoelectrotransferencia en tiras de nitrocelulosa.

La sensibilidad y especificidad clínicas de estas pruebas es de 100 % y 93 %, respectivamente (31, 32).

DETERMINACION DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS POR CITOMETRIA DE FLUJO.

De cada uno de los pacientes y de los controles se obtuvieron, por punción venosa, 4 mL de sangre que se colectaron en un tubo conteniendo heparina (15 UI/mL de sangre). Todas las mediciones de citometría de flujo se realizaron en sangre total.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC): CD3, CD4 y CD8 que reconocen antígenos de superficie de linfocitos T; CD10 y CD19 que identifican antígenos de superficie de linfocitos B. Para identificar a las células T con el antígeno CD5 se empleó el AcMo CD5 purificado y la Ig de cabra anti-ratón marcada con FITC (GAM-FITC). Se emplearon AcMo dirigidos contra las moléculas de activación CD25, HLA-DR y CD71 marcados con ficoeritrina (PE). Cada uno de éstos se mezcló con cada uno de los AcMo que reconocen los antígenos de superficie de las células T y B, permitiendo así el análisis simultáneo de uno y dos colores en cada muestra. Para la detección de las células B CD5+ se empleó el AcMo combinado CD19/CD5. Además, la pureza de la población de linfocitos en la región de análisis en el citómetro de flujo (CytoronAbsolute) se estableció usando el anticuerpo monoclonal CD45/CD14 (CD45+/CD14-), y la unión de fluorescencia no específica a los linfocitos se determinó con el control de isotipo IgG2a-FITC/IgG2a-PE. Todos los AcMo empleados fueron de Ortho Diagnostics.

REACTIVOS UTILIZADOS

ANTICUERPOS MONOCLONALES:

Anticuerpos monoclonales -Ortho mune- combinados y sencillos utilizados para la tinción directa e indirecta respectivamente: IgG2aFITC/IgG2aPE, CD3FITC, CD4FITC, CD8FITC, CD19FITC, CD71FITC, CD3PE, CD25PE, HLA-DRPE, CD19FITC/CD5PE, CD45FITC/CD14PE, CD5 purificado, CD10 purificado, GAM-FITC.

SOLUCION SALINA AMORTIGUADA CON FOSFATOS.

10 g de NaCl, 0.25 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, 0.25 g de KH₂PO₄. Disolver y ajustar el pH a 7.2

Aforar a 1 L con agua desionizada, filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

PARAFORMALDEHIDO AL 1 %

A 100 mg de paraformaldehido, adicionar 10 mL de PBS 0.18 mol/L. Incubar toda la noche a 37°C.

Almacenar a 4°C. Esta solución tiene vigencia de un mes.

SOLUCION HEMOLIZANTE.

0.899 g de NH₄Cl; 0.1 g de NaHCO₃; 0.0037 g de EDTA trisodico. Disolver, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 100 mL con agua desionizada.

METODO DIRECTO DE TINCION.

1. Colocar 100 uL de sangre total heparinizada en un tubo de plástico de 12 x 75 y agregar 10 uL del anticuerpo monoclonal correspondiente.
2. Incubar a 4°C durante 25 minutos.
3. Agregar 2 mL de solución hemolizante. Mezclar en vórtex. Incubar a T.A. durante 10 min.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 1400 rpm a 25°C. Retirar el sobrenadante.
5. Agregar 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos, resuspender el botón celular y si no va a ser leído durante las siguientes 4 horas agregar 200 uL de paraformaldehído al 1%.
6. Leer en el citómetro de flujo, realizando una cuenta de 15 000 a 20 000 eventos por muestra.

METODO INDIRECTO DE TINCION.

1. Colocar 100 uL de sangre total heparinizada en un tubo de plástico de 12 X 75 y agregar 10 uL del anticuerpo monoclonal correspondiente.
2. Incubar durante 45 minutos a 4°C.
3. Lavar 2X con 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos fría centrifugando a 1200 rpm por 3 min.
4. Agregar 100 uL de GAM-FITC (BECTON DICKINSON) diluído 1:25 con PBS.
5. Incubar en baño de hielo por 45 minutos.
6. Lavar 2X con 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos fría centrifugando a 1200 rpm por 3 min.
7. Agregar 10 uL del segundo anticuerpo monoclonal correspondiente.
8. Incubar 45 minutos a 4°C.
9. Agregar 2 mL de solución hemolizante. Mezclar en vórtex. Incubar a T.A. durante 10 min.

10. Centrifugar durante 5 minutos a 1400 rpm a 25°C. Retirar el sobrenadante.

11. Agregar 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos, resuspender el botón celular y si no va a ser leído durante las siguientes 4 horas agregar 200 uL de paraformaldehído al 1 %.

12. Leer en el citómetro de flujo.

ANALISIS DE DATOS

Las cifras totales de las diferentes subpoblaciones de células T se obtuvieron promediando los valores obtenidos de las células CD3+, CD4+, CD5+ y CD8+ en las dos o tres mediciones realizadas en cada sujeto. El mismo cálculo se realizó para la obtención de las cifras totales de las subpoblaciones de linfocitos B CD10+ y CD19+. Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (no pareada) para comparar las subpoblaciones de linfocitos en los 3 grupos de individuos estudiados (47).

RESULTADOS:

SUBPOBLACIONES DE CELULAS T Y B TOTALES (TABLA 1)

En el grupo de pacientes chagásicos se encontró que el promedio de células CD3+, CD5+ y CD8+ era significativamente más bajo, mientras que el porcentaje de células CD19+ así como la relación de células CD4+/CD8+ eran significativamente más altos comparados con el grupo control. No hubo diferencia significativa entre estos dos grupos en los porcentajes de células CD4+ y CD10+. Las diferencias en los valores de células CD8+ y en la relación CD4+/CD8+ encontrada entre los pacientes chagásicos y los controles también se observó entre los pacientes chagásicos y no-chagásicos. Cuando se compararon las subpoblaciones de linfocitos en los enfermos no chagásicos *versus* el grupo control, sólo los linfocitos B CD10+ y CD19+ fueron significativamente más altos en los no chagásicos.

SUBPOBLACIONES DE CELULAS T ACTIVADAS (TABLA 2)

La expresión de antígenos asociados a activación (CD25, HLA-DR y CD71) en las células CD3+, evaluado por el análisis de doble color, mostró que las células que expresaban el receptor de la transferrina (CD71) fueron significativamente más bajas en los pacientes chagásicos que en los controles. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de células CD3+/CD25+ y CD3+/HLA-DR+ entre los pacientes chagásicos y los controles. Las células T supresoras (CD8+), pero no las cooperadoras (CD4+) expresando el receptor para IL-2 (CD25) estuvieron significativamente disminuidas en los pacientes con enfermedad de

Chagas comparados con los individuos sanos. El promedio de células dobles positivas CD4+/CD25+ y CD8+/HLA-DR+ fue similar en los pacientes chagásicos y en los controles. Aún cuando los valores promedio de células CD5+/HLA-DR+ fueron altos en los tres grupos estudiados, esta población celular fue significativamente más alta en los pacientes chagásicos que en los controles. No hubo diferencia significativa en ninguna de las subpoblaciones de linfocitos T activados entre los pacientes no chagásicos y el grupo control.

SUBPOBLACIONES DE CELULAS B ACTIVADAS (TABLA 3)

Los porcentajes promedio de las subpoblaciones celulares CD10+/CD25+, CD10+/HLA-DR+, CD19+/CD25+ y CD5+/CD19+ fueron muy bajos y no hubo diferencia significativa intergrupos en estas subpoblaciones de linfocitos B. Únicamente las células CD19+ coexpresando el antígeno HLA-DR fueron significativamente más altas en los pacientes chagásicos que en los controles. No hubo diferencia significativa en ninguna de las subpoblaciones de células B activadas entre los no chagásicos y los controles.

DISCUSION

En el presente estudio se determinaron, mediante citometría de flujo, las subpoblaciones de linfocitos T y B totales y activadas en muestras de sangre periférica de pacientes chagásicos y no chagásicos con miocardiopatía dilatada. La lesión que se desarrolla en el miocardio durante las fases aguda y crónica de la infección por *T. cruzi* se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias. Las lesiones cardíacas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica están compuestas predominantemente por linfocitos T CD8+ (33) y gran cantidad de células T, CD3+ y CD8+ se secuestran en el tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* (14). Las moléculas CD4 y CD8 participan en la adhesión de los linfocitos a las células presentadoras de antígeno involucrando productos clase II y clase I del complejo principal de histocompatibilidad (CMH), respectivamente (15). Mientras que, la expresión de los antígenos HLA-ABC en las células miocárdicas de los pacientes chagásicos crónicos se encuentra aumentada, sugiriendo que estas células actúan como blanco para los linfocitos citolíticos CD8+, los antígenos HLA-DR no se observan en el miocardio de estos pacientes (34, 35). Estos datos podrían explicar la importante disminución en los linfocitos T circulantes CD3+, CD5+ y CD8+, pero no la disminución de las células CD4+ observada en nuestros pacientes chagásicos crónicamente infectados y apoyaría la observación de una migración inflamatoria selectiva de linfocitos T, particularmente células supresoras/citotóxicas (CD8+), al tejido cardíaco dañado (15). Se ha informado que los pacientes con enfermedad cardíaca por Chagas presentan una respuesta proliferativa de células no-T autólogas aumentada (1). Posiblemente, el bajo número de células CD8+ observado en estos pacientes sea el responsable de este hallazgo, ya que

una eliminación parcial o completa de células supresoras sobrerregulan el cultivo mixto de linfocitos autólogos (36).

En nuestro estudio, empleando el análisis citométrico de dos colores, se demostró que los pacientes chagásicos, además de tener concentración baja de linfocitos CD8+ también presentaron una reducción significativa en la proporción de células circulantes dobles positivas CD8+/CD25+ y un número anormal de linfocitos CD3+ y CD4+ coexpresando el antígeno CD25 (receptor de IL-2). La infección por T cruzi además de inhibir la producción y utilización de IL-2 por células T (37), suprime la expresión del receptor para IL-2 en linfocitos humanos T activados (38,39). La expresión del receptor para IL-2 es necesaria para que las células T activadas progresen de la fase G₀/G_{1a} a la fase G_{1b} de su ciclo celular (40) y por lo tanto es necesario para la proliferación de los linfocitos. Las proteínas de superficie CD3, CD4 y CD8 están presentes antes de la activación celular (26) y los antígenos CD25 y CD71 (receptor de transferrina) se consideran moléculas de postactivación (41, 42). Tomando en cuenta esta información, sumada al hecho que nuestros pacientes chagásicos tuvieron un número significativamente reducido de células CD3+/CD71+ sugiere que el parásito puede afectar ambas poblaciones, linfocitos T en reposo y activados.

Se han publicado pocos estudios de linfocitos T y B activados en sangre periférica de pacientes chagásicos. En este grupo de pacientes encontramos porcentajes elevados de células circulantes CD5+ y CD19+ coexpresando el antígeno HLA-DR. Este hallazgo concuerda con los datos recientemente informados por Dutra y cols (7), quienes encontraron porcentajes significativamente aumentados de linfocitos T activados

(CD3+/HLA-DR+) y de linfocitos B activados (CD5+/CD19+) en muestras de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Chagas en la fase indeterminada y crónica.

Sin embargo, estos autores no observaron diferencia sustancial en el número de linfocitos B totales (células CD19+) y en la relación de células CD4+/CD8+ entre sujetos chagásicos y normales. Este hallazgo contrasta con nuestros resultados que muestran un incremento significativo en las células CD19+ y una relación CD4/CD8 elevada en pacientes chagásicos cardíacos comparada con las células de individuos normales. En el presente estudio, el aumento significativo en las células CD19+ se puede atribuir a la relación CD4/CD8 sesgada hacia el predominio de cooperación debido a una disminución de las células CD8+ o alternativamente, a la activación de linfocitos B por el antígeno del *T. cruzi*, que aparece temprano en la infección y persiste durante la fase crónica (43, 44, 45). La concentración elevada de linfocitos T y B activados observada en los pacientes chagásicos crónicos podría explicarse por la activación policlonal de las células T y B mediada por el *T. cruzi* o sus productos solubles (26), durante las parasitemias transitorias, que posiblemente se presentan durante la fase crónica de la infección.

Un hallazgo interesante, pero pobremente entendido, fue la alta concentración de células CD5+/HLA-DR+ encontrada en los controles, así como en los pacientes chagásicos y no-chagásicos con miocardiopatía (Tabla 2). En el presente trabajo la expresión de los antígenos asociados a activación CD25, CD71 y HLA-DR en las subpoblaciones de células CD3+, CD4+ y CD8+ se analizó usando el método de inmunofluorescencia directa, mientras que, las células CD5+/HLA-DR+ se identificaron incubando inicialmente las células con el AcMo CD5 purificado, seguido por la adición de GAM-FITC (método indirecto) y posteriormente con el AcMo anti-HLA-DR marcado con PE (método directo). Se sabe que el AcMo CD5 es un comitógeno para linfocitos T y que además aumenta la concentración del

segundo mensajero (46), posiblemente este AcMo, produjo activación celular ocasionando un aumento en la expresión del antígeno HLA-DR particularmente en los linfocitos de pacientes chagásicos cardíacos. De ser así, este fenómeno semejaría la activación celular por el AcMo CD3 el cual imita la estimulación de linfocitos por un antígeno específico (47).

Otra información interesante fue la observación que los pacientes no chagásicos con miocardiopatía mostraron porcentajes significativamente elevados de células CD19+ y CD10+. Estos resultados plantean la pregunta de si la cardiomiopatía por sí misma, independientemente de la etiología, induce anormalidades inmunes, particularmente aquellas que involucran a los linfocitos B. Además, ponen a prueba la hipótesis de que la sobrerregulación de células B en miocardiopatía chagásica esta dada básicamente por la presencia del parásito o sus productos solubles en el tejido cardíaco. Es necesario realizar otros estudios para aclarar la posible asociación entre daño de tejido cardíaco y disrregulación del sistema inmune.

CONCLUSIONES

1. La depresión inmune bien reconocida en pacientes chagásicos crónicos involucra linfocitos T, particularmente células T activadas con el inmunofenotipo de células supresoras/citotóxicas (CD3+/CD71+, CD8+/CD25+).
2. En los pacientes con miocardiopatía chagásica se encuentran porcentajes elevados de células T y B activadas en circulación. (CD5+/HLA-DR+, CD19+/HLA-DR+)
3. La miocardiopatía no chagásica puede estar asociada con anomalías inmunes que afectan a los linfocitos B ya que se encontraron elevados significativamente las subpoblaciones de linfocitos CD10+ y CD19+).

TABLA 1. PORCENTAJES PROMEDIO (\pm DE) DE LAS SUBPOBLACIONES DE CELULAS T Y B TOTALES EN LOS 3 GRUPOS ESTUDIADOS.

	Chagásicos	No Chagásicos	Controles
CD3+	58.8 \pm 7.1 *	63.6 \pm 13.3	70.0 \pm 8.0
CD5 +	65.2 \pm 8.9 *	68.1 \pm 8.0	71.9 \pm 8.3
CD4 +	46.0 \pm 10.4	41.0 \pm 6.7	45.2 \pm 5.7
CD8 +	22.7 \pm 5.4 * &	28.8 \pm 5.2	29.7 \pm 7.5
CD4+/CD8+	2.2 \pm 0.8 * &	1.5 \pm 0.3	1.7 \pm 0.8
CD 10 +	1.2 \pm 0.9	1.4 \pm 1.5 *	0.6 \pm 0.4
CD 19 +	11.1 \pm 3.2 *	9.1 \pm 2.6 *	5.7 \pm 0.8

* Valor de p < 0.005 comparada con los controles.

& Valor de p < 0.005 comparada con el grupo de pacientes no chagásicos.

TABLA 2 PORCENTAJES (PROMEDIO \pm DE) DE LAS SUBPOBLACIONES DE CELULAS T ACTIVADAS EN LOS 3 GRUPOS ESTUDIADOS.

	Chagásicos	No Chagásicos	Controles
CD3+/CD25+	16.5 \pm 13.1	20.4 \pm 10.8	9.2 \pm 4.5
CD3+/HLA-DR+	11.7 \pm 8.0	13.3 \pm 8.6	12.2 \pm 6.1
CD3+/CD71+	0.7 \pm 0.6 *	1.5 \pm 1.6	1.2 \pm 0.7
CD5+/HLA-DR+	61.5 \pm 13.4 *	46.5 \pm 25.1	43.6 \pm 20.3
CD4+/CD25+	11.2 \pm 7.7	14.7 \pm 4.5	11.7 \pm 4.1
CD4+/HLA-DR+	8.3 \pm 6.6	8.3 \pm 8.8	6.1 \pm 2.9
CD8+/CD25+	0.9 \pm 1.1 *	7.3 \pm 4.9	2.6 \pm 2.9
CD8+/HLA-DR+	9.5 \pm 6.7	15.1 \pm 5.3	8.1 \pm 4.4

* Valor de p < 0.005 comparada con los controles.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 3 PORCENTAJES (PROMEDIO \pm DE) DE LAS SUBPOBLACIONES DE CELULAS T ACTIVADAS EN LOS 3 GRUPOS ESTUDIADOS.

	Chagásicos	No Chagásicos	Controles
CD10+/CD25+	0.3 \pm 0.3	0.8 \pm 1.6	0.2 \pm 0.3
CD10+/HLA-DR+	0.2 \pm 0.2	2.5 \pm 6.7	0.2 \pm 0.1
CD19+/CD25+	0.3 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4	0.4 \pm 0.3
CD19+/HLA-DR+	8.4 \pm 2.6 *	5.9 \pm 2.0	3.6 \pm 2.0
CD5+/CD19+	3.5 \pm 4.0	2.2 \pm 2.3	1.7 \pm 2.1

* Valor de p < 0.005 comparada con los controles.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Milei J. Patogenia. En: Storino, Milei, editores. Enfermedad de Chagas. Argentina: Mosby Doyma, 1994:103-28
2. Storino R. Chagas crónico. En: Storino, Milei, editores. Enfermedad de Chagas. Argentina: Mosby Doyma, 1994:247-66
3. Cardoni R. Respuesta inmune efectora. En: Storino, Milei, editores. Enfermedad de Chagas. Argentina: Mosby Doyma, 1994:87-102.
4. Laranja FC, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 1956;15:1035-60.
5. Petry K, Eisen H. Chagas' disease: a model for the study of autoimmune disease. *Parasitol Today* 1989;5:111-6.
6. Lydyard P, Grossi C. Cells involved in immune responses. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK, editors. *Immunology*. London: Mosby, 1993:2-12.
7. Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Freeman Jr GL, Colley DG, Gazzinelli G, Parra JC. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol* 1994;6:499-506.

8. Raveche ES. Possible immunoregulatory role for CD5+ B cells. Clin Immunol immunopathol 1990;56:135-50.
9. Friman G, Fohlman J. The epidemiology of viral heart disease. Scand J Infect Dis 1993;88:7-10.
10. Velasco OC. La tripanosomiasis americana en México. En Velasco, editor. La enfermedad de Chagas. México: 1991:1-46
11. Rodas A, Toro S, Ramos A, Monteón A, Reyes P. La incidencia de anticuerpos antitripanosoma cruzi en pacientes con miocardiopatía dilatada en el Instituto Nacional de Cardiología. Arch Inst Cardiol Mex 1992;62:541-5.
12. Monteón V, Reyes P, Marduschamer J. Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas), encuesta clínico serológica en un municipio rural oaxaqueño. Arch Inst Cardiol Mex 1993;63:145-8.
13. Barral AP, Barral-Netto M, Rassi A, Rezende JM, Gusmao Rd'A: Enhancement of the autologous mixed lymphocyte reaction in patients with Chagas' heart disease. Am J Trop Med Hyg 1984;33:1078-83.
14. Sato MN, Yamashiro-Kanashiro EH, Tanji MM, Kaneno R, Higuchi ML, Duarte JS: CD8+ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. Infect Immun 1992;60:1024-30.

15. Tschudi L, Anziano D, Dalmasso A. Lymphocyte transformation in Chagas disease. *Infect Immun* 1972;6:905-8.
16. Lelchuk R, Patrucco A, Manni J. Studies of cellular immunity in Chagas disease. Effect of glutaraldehyde-treated specific antigen on inhibition of leukocytes migration. *J Immunol* 1974;112:1578-81.
17. Jahm B, Burmester G, Stock P, Kalden G. Funcional and phenotypical characterization of activated T cells from intra-articular sites in inflammatory joint diseases. *Scand J Immunol* 1987;26:745-54.
18. Jörg ME, Patología general de la tripanosomiasis cruzi. En: Castagnino HE, Thompson AC, editores. *Cardiopatía chagásica*. Argentina: Kapelusz, 1980:20-48
19. Yanovsky J, Albado E. Humoral and cellular responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1972;109:1159-61.
20. Teixeira A, Teixeira G, Macedo V, Prata A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J Clin Invest* 1978;62:1132-41.
21. Takacs L, Ruscetti F, Kovacs E, Rocha B, Blocke S, Diamantstein T. Inmature doble negative (CD4-CD8-) rat thimocytes don't express IL-2 receptors. *J Immunol* 1988;141:3810-18.

22. Gusmao R, Rassi A, Rezende J, Neva F. Specific and non-specific lymphocyte blastogenic responses in individual infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 1984;33:827-38.
23. Schmunis G. Autoimmunity in Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987;82:287-310.
24. Tarleton R. Depletion of CD8 T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. 1989;717-24.
25. Sztejn M, Kierszenbaum F. Suppression by *Trypanosoma cruzi* of T-cells receptor expression by activated human lymphocytes. Immunol 1992;77:277-83.
26. Silva J, Morrissey P, Grabstein K, Mohler K. Interleukin 10 and interferon and regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med.1992;175:169- 74.
27. Reis Dd'A, Jones EM, Tostes S, López ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg. 1993;49:192-200.
28. Spinella S, Liegeard P, Joskowics M. *Trypanosoma cruzi*: Predominance of IgG2a in non-specific humoral response during experimental Chagas' disease. Exp Parasitol. 1992;74:46-56.

29. Lorca M, Gonzalez A, Veloso C, Reyes V, Vergara U. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. Am J Med Hyg. 1992;46:44-9.
30. Monteón VM, Sosa T, Reyes PA. Serological test for american tripanosomiasis. A comparative study. Rev Latinoamer Microbiol Mex. 1989;31:35-8.
31. Monteón VM, Ramos A, Reyes PA. Reactividad de sueros de pacientes chagásicos crónicos con extractos de aislamientos mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Rev Biol Trop. 1993;41:861-5.
32. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979;76:4350-4.
33. Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SJ. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T cell activation. Annu Rev Immunol. 1989;7:579-99.
34. Schrezenmeier H, Fleischer B. A regulatory role for the CD4 and CD8 molecules in T cell activation. J Immunol. 1988;141:398-403.

35. Smolen JS, Sharrow SO, Reeves JP, Boegel WA, Steinberg AD. The human autologous mixed lymphocytes reaction. V. Suppression by macrophages and T cells. *J Immunol.* 1981;127:1987-93.
36. Reed DG, Inverso JA, Rothers SB: Heterologous antibody responses in mice with chronic T cruzi infection: Depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin-2. *J Immunol* 1984;133:1558-63.
37. Kierszenbaum F, Cuna WR, Beltz LA, Sztejn MB. *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. *J Immunol* 143;275-9.
38. Rottenberg M, Lindqvist C, Koman A, Segura EL, Orn A: Modulation of both interleukin-2 receptor expression and interleukin-2 production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.* 1989;30:65-72.
39. Smith MB, Cuna WR, Kierszenbaum F. Interleukin 2: a 10 years perspective. In: Smith KA, editor. *Interleukin*. New York: Academic Press, 1988:1
40. Beltz LA, Sztejn MB, Kierszenbaum F: Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi* induced suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 receptor expression. *J Immunol.* 1988;141:289-94.

41. Beltz LA, Szein MB, Kierszenbaum F. Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* on activated human lymphocytes. *Infect Immunol* 1989;57:2301-5.
42. D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H. Very large and isotypically atypical polyclonal antibody production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol* 1985;15:201-3.
43. D'Imperio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol* 1986;137:353-6.
44. Ortiz-Ortiz L, Parks D, Rodriguez M, Weigle WO. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1980;124:121-6.
45. Ceuppens JL, Baroja ML. Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J Immunol* 1986;137:1816-21.
46. Meuer SC, Hodgdon JC, Hussey RE, Protentis JP, Schlossman SF, Reinherz EL. Antigen-like effects of monoclonal antibodies directed at receptors of human T cell clones. *J Exp Med* 1983;158:988-93.
47. Sidney S. *Estadística no paramétrica*. México: Trillas, 1979:143-155.