

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

194

RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA CEPAS MEXICANAS DE Trypanosoma cruzi.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A I
S A N D R O S O S A A G U I L A R



DIRECTORA DE TESIS DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ.



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2003

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



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.

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de Trypanosoma cruzi.

realizado por Sandro Sosa Aguilar.

con número de cuenta 9039282-3 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

Propietario

Dra. Rosaura Mayen Estrada.

Propietario

Dra. Laila Gutiérrez Kobek.

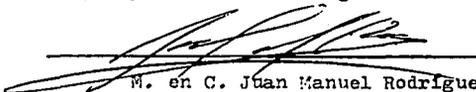
Suplente

Dr. Guillermo Laguna Hernández.

Suplente

Dr. Guillermo Salgado Maldonado

Consejo Departamental de Biología.


M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez,

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS.

RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA CEPAS MEXICANAS DE Trypanosoma cruzi.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIÓLOGO.

PRESENTA:

SANDRO SOSA AGUILAR.

Este trabajo fue dirigido por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas y contó con el apoyo de los proyectos de la DGAPA de la U.N.A.M. con número IN226402 y del CONACYT con número 27951M. Agradezco la beca otorgada para la realización de este trabajo.

MEXICO, D.F.

2003.

C

DEDICATORIA.

A Petra Hernández por su amor y por ser la persona más bondadosa que haya conocido. A mis padres Alicia Aguilar Hernández y Marciano Sosa Montañón, por su paciencia y apoyo.

A mis hermanos Ivonne, Ricardo y Erick por darme ánimos para concluir este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación y las enseñanzas que me brindo.

A mis compañeros de laboratorio, Fernando, Edgar, Antonio, Ignacio, Teresa, Bety, Ma. Luisa, Guindan, Oralia, Andrea e Ivone.

"La mayor recompensa de nuestro trabajo no es lo que nos pagan por el, sino aquello en lo que nos convierte." John Ruskin.

AGRADECIMENTOS.

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por permitirme realizar este trabajo bajo su asesoría.

Al Dr. Rafael Saavedra por su invaluable ayuda en el manejo del citómetro de flujo, y en la estandarización de la técnica de inmunofluorescencia directa.

A la Dra. Armida Báez Saldaña por su generosa donación de algunos anticuerpos usados como controles en la realización de este trabajo.

Al técnico Académico Biol. Esther Pacheco, por ser una estupenda persona y por enseñarme el funcionamiento del equipo con el que cuenta el laboratorio y algunas técnicas todo lo cual permitió la realización de este trabajo.

A la pasante de licenciatura en Biología Dolores Ma. Teresa Rico Ramírez por su colaboración durante la parte experimental de este trabajo.

Al comité de sinodales integrado por los Dres. Bertha Espinoza Gutiérrez, Rosaura Mayén, Laila Gutiérrez Kobeh, Guillermo Laguna Espinoza y Guillermo Salgado Maldonado por la revisión de esta tesis.

INDICE.

	Página.
RESUMEN.	1
I. INTRODUCCIÓN.	2
I.1. GENERALIDADES DEL PARÁSITO.	2
I.1.a. Taxonomía.	2
I.1.b. Morfología.	3
I.1.c. Ciclo de Vida.	4
I.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>T. cruzi</i> .	5
I.2.a. Cepas Mexicanas de <i>T. cruzi</i> .	7
I.3. ENFERMEDAD DE CHAGAS.	7
I.3.a. Fase Aguda.	8
I.3.b. Fase Crónica Asintomática o Fase Indeterminada.	9
I.3.c. Fase Crónica Sintomática.	9
I.3.d. Reactivación de la enfermedad de Chagas	10
I.3.e. Enfermedad de Chagas en México.	10
I.4. MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON <i>T. cruzi</i> .	11
I.5. RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>T. cruzi</i> .	11
I.5.a. Respuesta Inmune Humoral.	11
I.5.b. Células NK.	12
I.5.c. Fagocitos mononucleares.	14
I.5.d. Neutrófilos.	16
I.5.e. Linfocitos T.	17
I.6. CITOCINAS EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>T. cruzi</i> .	19
II. JUSTIFICACIÓN.	21
III. OBJETIVOS.	22

IV. MATERIAL Y MÉTODO.	23
IV.1. RATONES.	23
IV.2. PARÁSITOS E INFECCIÓN EXPERIMENTAL.	23
IV.3. DETERMINACIÓN DE LA PARASITEMIA.	23
IV.4. DETERMINACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA.	24
IV.5. PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL BAZO.	24
IV.6. DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ .	25
IV.7. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS NK.	26
IV.8. ESTADÍSTICA.	26
V. RESULTADOS.	27
V.1. APARIENCIA FÍSICA DE LOS RATONES INFECTADOS.	27
V.2. PARASITEMIA.	27
V.3. EFECTO DEL INÓCULO EN LA SOBREVIVENCIA.	28
V.4. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DEL BAZO DE RATONES INFECTADOS.	36
V.5. ÍNDICES DE ESTIMULACIÓN.	36
V.6. PORCENTAJE DE CÉLULAS CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ .	37
V.7. PORCENTAJE DE CÉLULAS NK DURANTE LA FASE AGUDA.	38
VI. DISCUSIÓN.	50
VI.1. VIRULENCIA.	50
VI.2. SINTOMAS FÍSICOS.	50
VI.3. PARASITEMIA.	51
VI.4. SOBREVIVENCIA.	52
VI.5. PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL BAZO.	52
VI.6. CITOMETRIA DE FLUJO PARA DETERMINAR LINFOCITOS CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ .	54
VI.7. CITOMETRIA DE FLUJO PARA DETERMINAR CÉLULAS NK DURANTE LA FASE AGUDA.	55
VII. CONCLUSIONES.	56
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	57

APÉNDICE I. PREPARACIÓN DE MEDIOS.	66
APÉNDICE II. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO.	68
APÉNDICE III. DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , Y CÉLULAS NK POR CITOMETRIA DE FLUJO.	70
APÉNDICE IV. PORCENTAJE DE LINFOCITOS CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ EN EL BAZO DE RATONES.	72
APÉNDICE V. TABLAS DE PARASITEMIAS DE RATONES INFECTADOS CON CEPA AVIRULENTA.	73
APÉNDICE VI. PARASITEMIA RATONES INFECTADOS CON CEPA VIRULENTA.	76

RESUMEN.

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, este parásito provoca en el hospedero una respuesta inmune humoral y celular, que está regulada en gran parte por la síntesis diferencial de algunas citocinas y quimiocinas, las cuales son secretadas por diversos tipos celulares. El curso de la infección se encuentra asociado tanto a características propias del parásito como del hospedero. En este trabajo se evaluaron algunos aspectos de la respuesta inmune celular en ratones infectados con 2 cepas mexicanas de *T. cruzi* que poseen diferente grado de virulencia. Se confirmó el comportamiento de ambas cepas durante la infección en ratones BALB/c, observándose que una de las cepas se comporta como avirulenta mientras que la otra cepa es virulenta. La cepa virulenta produjo parasitemias más altas que la avirulenta y las parasitemias en los ratones estuvieron determinadas por la cantidad de parásitos inoculados, más no la sobrevivencia. Durante la fase aguda de la infección los índices de estimulación obtenidos para las células de bazo de los ratones infectados con ambas cepas presentaron una proliferación mayor que las células de bazo de los ratones control sin infectar, proliferaciones que fueron mayores en los grupos infectados con la cepa avirulenta, lo cual parece ser una ventaja para proveer una protección importante. Durante la fase crónica de la infección la cual fue alcanzada solamente por los ratones infectados con la cepa avirulenta, los índices de estimulación obtenidos de estos ratones no presentaron diferencias con respecto al de los ratones control sin infectar, lo que indica que durante esta fase no se están produciendo cantidades importantes de células de bazo. Los ratones infectados con la cepa virulenta no presentaron modificaciones en el porcentaje de linfocitos CD8⁺, en cambio el porcentaje de linfocitos CD4⁺ disminuyó con respecto al de los ratones control sin infectar, por lo que los linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ podrían no haberse generado en cantidades suficientes como para proveer una protección durante la fase aguda. En cuanto a los ratones infectados con la cepa avirulenta el porcentaje de linfocitos CD8⁺ mantuvo una tendencia de incremento desde la fase aguda la cual se prolongó hasta la fase crónica en donde se volvió estadísticamente significativa, mientras que se observó una reducción significativa en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ durante la fase aguda, los cuales recuperaron sus niveles normales en la fase crónica, la disminución de linfocitos CD4⁺ podría no afectar a los ratones, debido a que estos están siendo reemplazados por linfocitos CD8⁺ que aunque no presentan las mismas funciones efectoras, ambos ayudan en el control del parásito. El porcentaje de células NK durante los primeros días de la infección, en los ratones infectados con ambas cepas se incrementó con respecto al control al día 5 p.i. además los ratones infectados con la cepa virulenta presentaron un incremento significativamente mayor que el control y que el grupo infectado con la cepa avirulenta al día 9 p.i., lo que produciría altos niveles de INF- γ y mantener una respuesta inflamatoria importante en el bazo de los ratones infectados con la cepa virulenta, lo cual podría resultar en una desventaja para estos ratones.

I. INTRODUCCIÓN.

I.1 GENERALIDADES DEL PARÁSITO.

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas, es un protozooario hemoflagelado intracelular transmitido por varios insectos reduvidos. El parásito presenta un complejo ciclo de vida digenético (con 2 hospederos), que involucra varias fases en mamíferos incluyendo al hombre. La enfermedad es exclusiva de Latinoamérica aunque se han presentado varios casos en otras regiones, principalmente por la migración de individuos infectados. Aproximadamente 18 millones de individuos presentan la Infección y 120 millones están en riesgo de infectarse (WHO, 1991).

I.1.a Taxonomía. (Leedale y Vickerman, 2000).

Phylum	Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981
Clase	Diplonemea Cavalier-Smith, 1993
Orden	Kinetoplastea Honingberg, 1963
Suborden	Trypanosomatina Kent, 1880
Familia	Trypanosomatidae Dufflein, 1901
Género	<i>Trypanosoma</i> Gruby, 1843
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i> Chagas, 1909
Especie	<i>Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi</i> Chagas, 1909

I.1.b Morfología.

Trypanosoma cruzi presenta tres estadios morfológicos: tripomastigote, epimastigote y amastigote. El tripomastigote es flagelado, alargado con un gran núcleo central, cinetoplasto de gran tamaño y blefaroplasto posterior de donde surge un flagelo que contornea una membrana ondulante, que le confiere movimiento, este estadio no tiene capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero, presenta la capacidad para invadir diferentes tipos celulares. El epimastigote es fusiforme, con un flagelo que forma una membrana ondulante que nace del blefaroplasto, el cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que se encuentra en posición central, este estadio presenta la capacidad de multiplicarse por fisión binaria longitudinal. El amastigote es de forma redondeada, carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto a manera de disco, tiene capacidad de reproducirse mediante fisión binaria simple (Romero, 1993), (Figura 1).



Fig. 1. Microfotografías negativas de estadios de *Trypanosoma cruzi* (Tomado de www.kinetoplastids.com/content/1/1/3).

I.1.c Ciclo de Vida.

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en organismos diferentes (Insecto vector y mamífero hospedero), por lo cual se denomina digenético. En el vector se encuentran los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos y en el hospedero mamífero se encuentran los amastigotes y los tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el vector al alimentarse de los mamíferos infectados, transformándose en formas cortas en el estómago del insecto, de donde migran hacia el Intestino medio, donde continúan desarrollándose al encontrar un ambiente adecuado para transformarse en epimastigotes que se dividen por fisión binaria simple. Estos llegan a la porción posterior del Intestino del vector donde evolucionan a tripomastigotes metacíclicos que son eliminados por el Insecto en las heces, penetrando al hospedero y a las células de éste por mucosas o al momento de que el hospedero se rasca, posteriormente se transforman a la forma de amastigotes. En el interior de la célula evolucionan nuevamente a tripomastigotes sanguíneos, los cuales se liberan al torrente sanguíneo para poder infectar otras células (Tyler y Engman, 2001), (Figura 2).

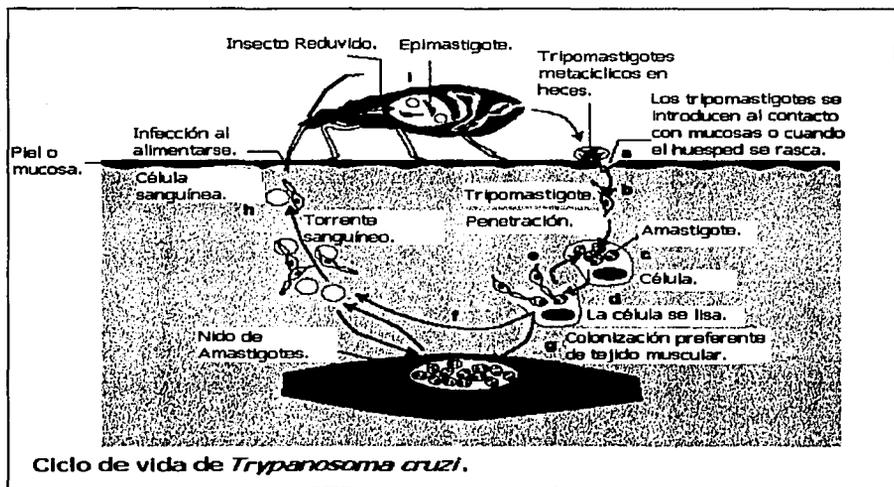


Fig. 2. Cido de vida de *Trypanosoma cruzi* (Tomado de www-ermm.cbu.cam.ac.uk).

1.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE *T. cruzi*

T. cruzi comprende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como selváticos. El parásito presenta una gran variación intraespecífica en cuanto a diferencias de las formas sanguíneas, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad ante agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y distinta capacidad de infectar a células hospederas (Brener, 1985).

El comportamiento del parásito puede estar influido por el mismo hospedero o por las condiciones del ambiente, lo que ha incrementado la tendencia a realizar una caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi*. Así mismo, uno de los problemas planteados consiste en saber si las diferencias que se observan en la presentación de los cuadros clínicos y en la respuesta de los pacientes al tratamiento, se debe a las diferencias biológicas de las distintas cepas de *T. cruzi* que prevalecen en cada área geográfica o a las diferencias genéticas entre las poblaciones humanas susceptibles (Andrade, 1985). En el primer caso, se ha determinado por varios métodos la marcada heterogeneidad a nivel bioquímico y molecular de las diferentes cepas del parásito, así como la variabilidad en su comportamiento biológico (Martínez-Díaz et al., 2001).

Desde 1950 se han realizado estudios en diferentes cepas del parásito, lo que ha permitido establecer que el parásito que proviene de diferentes transmisores, reservorios y regiones del mismo país, se comportan diferente al infectar experimentalmente a animales de laboratorio. Estas diferencias se manifiestan en los niveles de parasitemia e invasión a ciertos órganos, así como a diferencias en las infecciones que el parásito ocasiona tanto en animales como en humanos, causando desde daños leves hasta la muerte. Este comportamiento tan variado se ha atribuido a múltiples causas como: factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes especies de transmisores y hospederos (Bice y Zeledón, 1970; Magalhaes et al., 1996). Diversos estudios sugieren que la virulencia de *T. cruzi* depende del número de tripomastigotes inoculados, sin embargo la virulencia también se atribuye a la susceptibilidad del hospedero ante el parásito y al tropismo del mismo (Fernández et al., 1996). Se ha observado que diferentes cepas presentan grandes variaciones relacionadas con su preferencia por determinado hospedero, su distribución geográfica, su virulencia y su tropismo tisular. Desde 1911 se ha reportado la existencia de cepas de *T. cruzi* con tropismo a diferentes órganos, lo que se ha relacionado con características fisiológicas de las formas sanguíneas de diversas cepas (Brener, 1985; de Diego et al., 1991). Varios autores han estudiado las cepas provenientes de pacientes

chagásicos crónicos de Brasil que pertenecían a diferentes zimodemas y esquizodemos agrupándolas de acuerdo a su virulencia (Carneiro et al., 1991).

Otra forma de caracterizar las cepas de *T. cruzi* es por medio de métodos bioquímicos como la electroforesis de proteínas, que analiza los productos de expresión génica utilizando isoenzimas, lo que permite agrupar cepas de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos que reciben el nombre de zimodemas (Miles et al., 1977). Miles introdujo la técnica de los perfiles isoenzimáticos en el estudio de *T. cruzi* identificando 3 zimodemos en cepas de Brasil. El zimodemo 1 (Z1) es de origen selvático y circula entre triatomíneos selváticos y es infectivo para el hombre; el zimodemo 2 (Z2) es de origen doméstico y comprende cepas aisladas de pacientes con enfermedad de Chagas aguda o crónica y de animales domésticos; el zimodemo 3 (Z3) comprende cepas de casos humanos autóctonos de Brasil y comparte el ciclo selvático, puesto que se ha aislado de armadillos y de algunos casos humanos con la forma aguda de la enfermedad (Miles et al., 1981). Además de los métodos bioquímicos existen otros métodos para determinar marcadores genotípicos de *T. cruzi*, como lo es el análisis del DNA del cinetoplasto con el cual se identifican poblaciones de parásitos llamadas esquizodemos. Los métodos moleculares que permiten definir los esquizodemos son sencillos y rápidos, considerados complementarios del método isoenzimático para caracterizar cepas y donas de *T. cruzi* aisladas de vectores y por hemocultivo de pacientes con la enfermedad de Chagas (Morel et al., 1980). Se han reportado otros trabajos sobre la caracterización molecular de *T. cruzi* donde utilizan los espaciadores no transcritos (ITS, por sus siglas en inglés) del RNA ribosomal y los fragmentos de restricción de los maxicírculos del DNA de cinetoplasto para formar agrupaciones que filogenéticamente coincidan, estos fragmentos reciben el nombre de kinetodemos (Dietrich et al., 1990; Zavala-Castro et al., 1992). La tipificación genética de *T. cruzi* inició con los trabajos pioneros de isoenzimas realizados por Miles los cuales ayudaron a clasificar la variabilidad subespecífica de *T. cruzi*. Recientemente se ha determinado que las donas de *T. cruzi* se encuentran distribuidas naturalmente en dos principales linajes filogenéticos (Brisse et al., 2000; Souto et al., 1996), estos dos linajes filogenéticos fueron llamados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II por la comunidad de investigadores de este parásito en una reunión de Río de Janeiro en Abril de 1999. El linaje *T. cruzi* II fue subdividido en agrupaciones más pequeñas. Por lo tanto, se han identificado recientemente, mediante análisis de isoenzimas y de amplificación al azar de

ADN polimórfico (RAPDs) 6 linajes diferentes de *T. cruzi*. De estos 5 pertenecían al linaje *T. cruzi*/II, y el sexto lo constituye el linaje *T. cruzi* I, que no ha podido subdividirse (Brisse et al., 2000).

I.2.a Cepas Mexicanas de *Trypanosoma cruzi*.

En Sudamérica se han caracterizado diferentes cepas de *T. cruzi* encontrándose diferencias biológicas, bioquímicas y moleculares entre éstas, sin embargo, las características biológicas y bioquímicas de las cepas mexicanas eran casi desconocidas hasta finales de los 90s. Recientemente se han realizado estudios con cepas mexicanas de *T. cruzi* encontrándose gran variabilidad biológica (López-Olmos et al., 1998). Los RAPDs son marcadores genéticos muy efectivos que han servido para el análisis de la variabilidad de las poblaciones de *T. cruzi* en México (Hernández et al, 2001). En las cepas mexicanas se ha determinado que existe una alta diversidad clonal por la gran cantidad de poblaciones mexicanas. Los estudios de las cepas mexicanas han demostrado que existe una predominancia del linaje I en México mientras que en Sudamérica existen los 2 linajes (Bosseno et al., 2002). Actualmente, en el laboratorio se cuenta con un cepario muy importante, el cual consta de 160 aislados diferentes de los cuales la mayoría están caracterizados genéticamente. En este cepario hay cepas que presentan diferente comportamiento biológico, pero específicamente se ha observado que las cepas con las que se realizó este estudio manifiestan diferente grado de virulencia siendo una avirulenta y otra muy virulenta (Caballero, 1996). Cabe mencionar que estas cepas de *T. cruzi* fueron aisladas de diferentes especies, ya que el aislado avirulento es de origen humano y se obtuvo de un caso Chagásico agudo que se presentó en el estado de Oaxaca, mientras que la cepa virulenta fue aislada originalmente de las heces de *Triatoma barberi* espécimen del estado de Querétaro.

I.3. ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana constituye un importante problema de salud pública en el continente americano. La seroprevalencia de la infección con *T. cruzi* se ha mantenido a niveles relativamente altos en algunas regiones y se observa un aumento general en el número de los casos reportados en los últimos años (WHO, 1997). La gran variabilidad y severidad en los síntomas de la enfermedad puede ser debido a muchos factores entre los cuales se encuentran la cepa del parásito infectante (Espinoza et al., 1998; Vago et al., 2000), otro factor es el número de parásitos que infecta al hospedero, ya que mientras más parásitos entren las complicaciones negativas serán mayores (Fernández et al., 1996). Un factor más es la

propia Inmunidad del hospedero, ya que la variabilidad entre los individuos juega un papel importante (Tomlinson y Raper, 1998). Además, el aspecto nutricional podría también influir, ya que se ha observado que una restricción severa de proteínas o la falta de minerales como hierro incrementa de manera considerable la parasitemia, así como la mortalidad en ratones infectados con *T. cruzi*. (Pedrosa et al., 1993; Gomes et al., 1994). En lugares endémicos el aspecto de las reinfecciones constantes es fundamental ya que se ha demostrado que ratones que sufren reinfecciones constantes tanto en fase aguda como en fase crónica presentan una exacerbación muy marcada de la infección con respecto a ratones infectados y que no fueron sometidos a nuevas reinfecciones (Bustamante et al., 2002).

La infección ocurre en la mayoría de los casos cuando los tripomastigotes que se encuentran en las heces de los insectos vectores, se depositan cerca del sitio de la picadura y el hospedero las lleva a mucosas o facilita su introducción al rascarse, otras vías de infección menos comunes incluyen transfusiones sanguíneas, factores congénitos o ingestión de carne o leche de animales infectados. La enfermedad consta de 2 fases: Una fase aguda y una fase crónica sintomática o asintomática, así como de un periodo de incubación en el desarrollo de la infección. El periodo de incubación presenta una duración corta de entre 7 y 10 días después de la entrada del parásito en el hospedero lo cual puede provocar un edema en la región alrededor de los ojos conocido como signo de Romaña. Este signo se presenta si es que, el triatomino se alimentó cerca de los párpados y la vía de entrada del parásito fue en esa zona, pero si lo hizo en cualquier otra parte del cuerpo se le conoce como chagoma. Durante este periodo de incubación los amastigotes proliferan en las células para después desarrollarse en tripomastigotes, los cuales se liberan hacia el torrente sanguíneo para propagar la infección (Rassi et al., 2000).

I.3.a. Fase Aguda.

En humanos, después de la infección inicial y un subsiguiente periodo de incubación empieza la fase aguda la cual tiene una duración aproximada de 2 meses y en ausencia de tratamiento específico alguno ésta transcurre con una mortalidad del 2 al 8% especialmente entre niños y por lo menos del 5 al 10 % de los individuos infectados puede presentar dolor muscular moderado, algunas veces vómito y diarrea (Coura y Castro, 2002). Las lesiones en la fase aguda de la infección son del tipo inflamatorio, caracterizadas por la ruptura de células y la aparición de tripomastigotes en circulación, en donde los antígenos y sustancias tóxicas

se liberan. El parásito tiene predilección por células del sistema reticuloendotelial, músculo esquelético, músculo cardíaco y por células del sistema nervioso central, aunque se puede encontrar en cualquier lugar del organismo (Andrade et al., 1992). La primera reacción contra *T. cruzi* se da dentro de los primeros 2 días, reacción que es producida por células macrófagos que lisan a las células infectadas y provocan una inflamación. En el suero del hospedero infectado se puede detectar la presencia de complejos inmunes, además se presenta necrosis en el sitio de la inflamación. Por otro lado, la inflamación severa está acompañada por la presencia de células parasitadas o no parasitadas, especialmente en corazón. La agregación de plaquetas, degranulación de eosinófilos, edema y trombosis han sido también demostrados en esta etapa (Andrade, 1999).

I.3.b Fase Crónica Asintomática o Fase Indeterminada.

Esta fase se caracteriza por presentar una serología positiva o un xenodiagnóstico positivo, aquí los parásitos presentan una multiplicación intracelular lenta dentro de los órganos y tejidos del hospedero. En esta fase no se presentan manifestaciones de alteraciones electrocardiográficas ni radiológicas y se presenta una disminución casi total en la sintomatología; en esta fase la infección permanece latente durante varios años, reportándose que en áreas endémicas se manifiesta durante las primeras décadas de la vida, además durante esta fase se presenta fuerte evidencia de inmunidad pero permanece la infección probablemente debido a que algunos parásitos evaden la acción del sistema inmune. La combinación de la inmunidad creciente contra el parásito y la presencia de supresión inmunológica específica de la hipersensibilidad y reducción de la reacción inflamatoria explica por qué esta fase transcurre como asintomática (Andrade, 1999).

I.3.c Fase Crónica Sintomática.

Es la forma más evidente de la enfermedad, por que la persona queda incapacitada y puede llevarla hasta a la muerte. Esta fase sólo la presentan entre el 10 al 20 % de los individuos infectados en donde los mega síndromes y la cardiopatía chagásica son las patologías más comunes e importantes de esta fase. En órganos afectados hay disfunción del tejido debido a una hipertrofia de las capas musculares, también se presenta fibrosis la cual trae como consecuencia un engrosamiento de la pared de los órganos afectados (Dusanic, 1991). Las manifestaciones de esta fase pueden aparecer 10 a 30 años después de la fase aguda, avanzando progresivamente hasta lograr la total destrucción del tejido (Kierszenbaum, 1986). En esta fase se presenta daño cardíaco, digestivo o disturbios neurológicos. El daño del tejido cardíaco puede ser producido por

autoinmunidad atribuida a antígenos del parásito. La presencia de antígenos reactivos que cruzan entre músculo cardíaco y *T. cruzi* ha sido demostrada, pero la autoinmunidad no explica completamente la enfermedad de Chagas. La alta positividad del xenodiagnóstico, del hemocultivo así como del PCR y la reactivación de la enfermedad por Inmunosupresión en esta fase, demuestran la presencia del parásito en los casos crónicos (Coura y Castro, 2002).

I.3.d Reactivación de la Enfermedad de Chagas.

La reactivación de la enfermedad de Chagas puede ocurrir cuando existe una inmunosupresión por enfermedades severas como leucemia, linfomas y otras neoplasias o por la Infección con VIH/SIDA y también en los casos de transplantes de órganos en donde se administran tratamientos inmunosupresores. La meningoencefalitis y miocarditis aguda son las manifestaciones más frecuentes (Ferrelra et al., 1997).

I.3.e Enfermedad de Chagas en México.

La transmisión del parásito se ha mantenido constante en la mayor parte de América del Sur y también sigue siendo endémica en varias regiones de México. La seroprevalencia de la infección con *T. cruzi* se ha mantenido en niveles relativamente altos en algunas regiones y se observa un aumento general en el número de casos reportados a las autoridades de salud en los últimos años (Rangel-Flores et al., 2001). La cardiomiopatía chagásica crónica parece afectar a muchos pacientes con enfermedad cardíaca, pero aparentemente muchos casos no se reportan debido a la ausencia de especificidad del cuadro clínico (Monteón et al., 1993). El monitoreo epidemiológico de las poblaciones de vectores y reservorios, así como de los casos humanos, contribuye a enfocar estudios en las zonas endémicas, pero se requiere de un mayor avance y coordinación de estos esfuerzos (Guzmán-Bracho, 2001). Estudios sobre la biología del parásito coinciden con trabajos previos realizados en otros países que demuestran la gran diversidad de las características del parásito y apoyan la necesidad de estudios regionales de esta zoonosis (López Olmos et al., 1998). Se reconoce que es necesario un fuerte apoyo continuo por parte de las autoridades de salud y académicos para enriquecer el conocimiento sobre la enfermedad de Chagas en México y desarrollar programas eficaces de control (Dumontell, 1999).

I.4. MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON *T. cruzi*.

La infección de ratones con *T. cruzi* ha constituido un buen modelo de estudio de las diferentes condiciones que se presentan durante el curso de la enfermedad y que se pueden correlacionar en buena parte con las que ocurren en esta infección en el hombre (Mortatti et al., 1992). Se ha observado que los ratones con fondos genéticos distintos responden de diferente forma ante aislados con diferentes características. Además, el curso de la infección tanto en el hombre como en el ratón presenta grandes similitudes como la presencia de una fase aguda y una crónica bien caracterizada. Y aunque existen muchas dificultades en correlacionar la forma crónica de la enfermedad en ratón y en humanos, el modelo murino es uno de los más estudiados, tanto es así que este modelo ha sido también propuesto como modelo principal de las enfermedades autoinmunes (Acosta y Santos-Buch, 1985). Otra similitud encontrada es la infección intensa y sistémica observada en ratones, la cual se correlaciona claramente con los diferentes casos clínicos de la enfermedad observados en el hombre desde 1916. Por otro lado se ha observado que los linfocitos CD4+ y CD8+ tanto en humano como en ratón tienen un papel fundamental en cuanto a protección en la enfermedad de Chagas (Tarleton, 1990). Por todo lo anterior, el modelo murino ha sido muy importante para tratar de dilucidar la relación parásito hospedero en la infección con *T. cruzi* (Goncalves da Costa, 1999).

I.5. RESPUESTA INMUNE CONTRA *T. cruzi*.

1.5.a. Respuesta Inmune Humoral.

Los linfocitos B son células capaces de producir anticuerpos, los receptores para los antígenos en los linfocitos B son formas de anticuerpos unidos a la membrana, la interacción de los antígenos con estos receptores de membrana inicia la secuencia de activación de las células B, que termina en el desarrollo de células plasmáticas que secretan activamente anticuerpos (Abbas y Lichtman, 2001).

La infección con *T. cruzi* provoca una activación policlonal de células B durante la fase aguda de la infección la cual indica una alta producción de todos los isotipos de inmunoglobulinas, aunque solamente una proporción menor de inmunoglobulinas parecen ser parásito-específicas. Esta producción de inmunoglobulinas es de gran importancia ya que los anticuerpos específicos contra el parásito ayudan en el control y la resistencia a la infección. También se ha observado que durante la fase aguda la parasitemia comienza a descender a medida que la respuesta mediada por anticuerpos se eleva (DosReis, 1997). Durante la fase indeterminada los

anticuerpos que se incrementan en esta etapa son de la clase IgG2a los cuales han sido asociados a protección contra la infección, diversas investigaciones han demostrado que la protección inducida por transferencia adoptiva de linfocitos de ratones crónicamente infectados es anulada por la eliminación de células B productoras de anticuerpos y que la transferencia de suero o inmunoglobulinas brindan una protección contra la infección.

Durante la fase crónica de la infección en ratones se ha observado un incremento de las inmunoglobulinas IgG e IgM y se ha descrito que los niveles de inmunoglobulinas IgG, tienden a aumentar a medida que la infección avanza hasta la fase crónica, permitiendo con esto la opsonización del parásito y la subsecuente intervención de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. (Umekita y Mota, 2000).

Se ha postulado que la inmunosupresión y la autoinmunidad asociada con la infección de *T. cruzi* en la fase crónica, puede ser consecuencia de una intensa activación policlonal de células B y células T observadas durante etapas tempranas de la infección (Cordeiro da Silva et al., 1998).

La respuesta humoral anti-*T. cruzi* y el isotipo de inmunoglobulina presente en individuos con enfermedad de Chagas se ha estudiado en relación con las distintas manifestaciones clínicas, y se ha encontrado que títulos altos de IgG anti-*T. cruzi* específicos están preferentemente presentes en pacientes con daño cardíaco, mientras que la inmunoglobulina que se encuentra preferentemente en el daño digestivo es la IgA anti-*T. cruzi* (Hernández-Becerril et al., 2001).

Recientemente se ha demostrado que linfocitos B de ratones infectados con *T. cruzi* durante la fase aguda despliegan niveles muy altos de apoptosis *in vitro* (Zuñiga et al., 2000). Además, los linfocitos B también pueden controlar la sobrevivencia de los linfocitos T (Zuñiga et al., 2002). Lo cual no siempre tiene como consecuencia efectos negativos ya que esto sirve para regular la respuesta inmune previniendo reacciones inflamatorias a sitios de inmunidad privilegiada (Griffit et al., 1995).

1.5.b. Células NK.

Las células NK son un pequeño grupo de células periféricas las cuales median una gran variedad de funciones todas relacionadas con la regulación de organismos patógenos y con el control de células metastásicas, participan en la inmunoregulación, hematopoyesis e interacciones endocrinas (Rauet et al., 2001), además estas células no necesitan estar sensibilizadas para expresar su función agresora. Las células NK derivan

de la médula ósea, fueron originalmente categorizadas principalmente por su morfología granular y por su habilidad de lisar a una gran variedad de blancos como células infectadas o células tumorales. No pertenecen a las líneas de células T o B, por tanto las células NK no expresan Ig ni TCR/CD3 en su superficie. Los marcadores de superficie que mejor caracterizan a las células NK son CD2⁺, CD3⁻, CD4⁻ y CD56⁺, LY49, KIR. Estas células pueden secretar potentes citocinas especialmente INF- γ (Interferón gama) y TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral Alfa) y quimiocinas tales como RANTES y miembros de la familia MIP-1 (Biron et al., 1999). En contraste con las células T o B que responden a antígenos y que típicamente requieren una fase de proliferación, la respuesta de las células NK es inmediata, lo cual implica que las células NK están involucradas en la contención de patógenos durante los primeros días de una infección, de hecho hay fuerte evidencia de que las células NK contribuyen a la defensa contra parásitos intracelulares entre ellos *T. cruzi* (Scharton-Kersten y Sher, 1997); además estas células son críticas para el control de severos tipos de infecciones virales, también su papel en la defensa contra transformaciones neoplásicas espontáneas está bien establecido (Biron y Byron, 1989; Biron y Brossay, 2001).

Las células NK exhiben claramente la capacidad de discriminar células blanco y la susceptibilidad de estas células blanco ante las células NK ha sido correlacionada en muchas investigaciones cuando disminuyen los niveles de expresión del MHC, por ejemplo se ha demostrado que las células NK atacan a células normales cuando faltan algunas o todas las moléculas del MHC clase I. Esto se relaciona con lo establecido recientemente que indica que receptores específicos del MHC clase I inhiben la función de las células NK (Garrido et al, 1997; Tortorella et al., 2000).

Los primeros receptores inhibidores específicos de células NK que fueron descubiertos son los receptores Ly49 en ratón, estos ligan directamente con el MHC clase I (Kane, 1994). Más de 10 diferentes receptores Ly49 han sido identificados en ratones B6, aunque solamente 8 de estos son del tipo inhibitorio para NKs (Smith et al., 1994). Solamente un receptor Ly49 no funcional en humanos ha sido identificado (Barten y Trowsdale, 1999). Otros receptores más son los KIR (Killer cell Immunoglobuline-like receptor) los cuales ligan directamente con las moléculas del MHC clase Ia que al parecer son funcionales en el hombre pero no en el ratón. Se estima que en el hombre hay en el orden de 10 genes KIR diferentes, de los cuales no todos son inhibitorios para NKs, la tercera familia es funcional tanto en el hombre como en ratones y consiste en heterodímeros de CD94/NKG2 esto se da cuando isoformas de NKG2 pueden parear con CD94.

La eliminación de células NK *in vivo* por tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-NK 1.1 resulta en casi la completa eliminación de la producción del INF- γ *in vitro* por esplenocitos cultivados con tripomastigotes de *T. cruzi*, además esta eliminación de las células incrementa la parasitemia y la mortalidad en ratones relativamente resistentes. Estos resultados indican que la producción temprana de INF- γ dependiente de células NK es un elemento innato importante en la resistencia del hospedero ante la infección con este parásito. Sin embargo, el efecto protector de INF- γ en la resistencia del hospedero parece estar restringida a la fase de infección aguda y esto se ha demostrado por los resultados obtenidos en experimentos de cinética de INF- γ durante la infección experimental con *T. cruzi* (Cardillo et al., 1996). Basándose en éstas y otras observaciones se deduce que el INF- γ producido tardíamente durante la fase aguda no es relevante para la protección (DosReis, 1997). Se ha demostrado que la ausencia de células NK favorece el incremento de parasitemias graves en ratones infectados con *T. cruzi*, se ha observado que las células NK también son la mayor fuente del INF- γ presente durante fases tempranas, además están involucradas en limitar la multiplicación de *T. cruzi* y por consiguiente aumentar el grado de sobrevivencia de los ratones a la infección (Rauet et al., 2001).

Otras citocinas importantes que se han descrito como estimuladoras de células NK y promotoras de la producción de INF- γ son las interleucinas IL-12, IL-18 e IL-2, mientras que la interleucina IL-10 regula la producción de INF- γ (Thornton et al., 2001). Otros resultados *in vitro* e *in vivo* indican que INF- γ es secretado por células de bazo después de la incubación con tripomastigotes vivos y que la producción se puede bloquear con un tratamiento previo de las células NK con anticuerpos monoclonales anti-NK1.1 (Cardillo et al., 1996).

Otro factor que se ha observado es que la modulación de la actividad tanto de células B como de células NK puede estar mediada por glicolípidos purificados de *T. cruzi* especialmente por glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) que son los más abundantes presentes en la superficie de *T. cruzi*, estos pueden estimular la secreción de inmunoglobulinas por parte de las células B y también pueden estimular y activar células NK como se ha observado en experimentos *in vitro* (Luciana et al., 1999). También se ha observado que *T. cruzi* activa e induce una respuesta citotóxica temprana de células NK (Une et al., 2000).

1.5.c. Fagocitos Mononucleares.

El sistema fagocítico mononuclear constituye la segunda población celular en importancia del sistema inmunitario y consta de células que tienen una estirpe común y cuya función principal es la fagocitosis, todas las

células del sistema fagocítico mononuclear se originan en la médula ósea y tras su maduración y posterior activación, pueden adquirir diferentes tipos morfológicos. El primer tipo de célula que entra en la sangre periférica después de dejar la médula ósea no está completamente diferenciada y se le denomina monocito. Los monocitos tienen un diámetro de 10 a 15 μm , y poseen un núcleo bilobulado y un citoplasma finamente granular que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueléticos, una vez que colonizan los tejidos estas células maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos pueden activarse por una gran variedad de estímulos y pueden adquirir formas diferentes, pueden responder a microorganismos como una reacción de inmunidad innata que también sirve para disparar la respuesta de linfocitos específicos frente a un microorganismo. Por el contrario, los linfocitos efectores y sus productos estimulan las funciones de los macrófagos contra agentes extraños. Los macrófagos fagocitan partículas extrañas como microorganismos, macromoléculas, entre ellas antígenos e incluso tejidos propios que están dañados o muertos, como por ejemplo los eritrocitos viejos, también fagocitan activamente partículas recubiertas por proteínas del complemento, las cuales pueden ser producidas tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la específica. En el reconocimiento de sustancias extrañas y tejidos dañados por parte de los macrófagos probablemente intervienen receptores de fosfolípidos y azúcares pero no se conoce el mecanismo preciso (Abbas y Litchman, 2001).

Estudios *in vivo* han demostrado que la citocina $\text{INF-}\gamma$ ofrece un efecto protector en la infección experimental con *T. cruzi* llevando a la activación de macrófagos para inhibir la multiplicación intracelular del parásito por mecanismos que involucran la producción de metabolitos de óxido nítrico previniendo una inmunosupresión y evitando la muerte del hospedero durante la fase aguda (Celentano et al., 1993; DosReis, 1997). Se ha determinado que la función de los macrófagos en la enfermedad de Chagas es sumamente importante en la regulación de *T. cruzi*. En experimentos *in vivo* la internalización del parásito en macrófagos puede variar dependiendo de la cepa del parásito y se ha observado que los parásitos pertenecientes a cepas que se internalizan eficientemente son por consiguiente más letales para el hospedero, mientras que, los parásitos pertenecientes a cepas que se internalizan de una manera muy pobre parecen ser los que provocan una nula virulencia para los ratones (Celentano et al., 1993).

La infección de macrófagos con *T. cruzi* hace a estas células candidatas potenciales para la presentación de antígenos del parásito a linfocitos específicos contra *T. cruzi*, por lo que la activación de linfocitos CD4+ y CD8+ resulta muy importante en la defensa del hospedero (Caulada-Benedetti et al., 1998). Sin embargo, se ha observado que linfocitos CD4+ Th1 pero no Th2 activan eficientemente a macrófagos para eliminar a *T. cruzi* mediante mecanismos dependientes de óxido nítrico (Rodríguez et al., 2000). La producción de óxido nítrico puede cuantificarse mediante la producción de nitrilos, la activación de macrófagos mediante INF- γ incrementa la producción de óxido nítrico y esta producción se puede inhibir mediante un análogo de la L-arginina la cual exacerba la infección con *T. cruzi* (Müller et al., 2001).

1.5.d. Neutrófilos.

Los neutrófilos también llamados leucocitos polimorfonucleares por su núcleo multilobulado y de variada morfología, son los más numerosos en la circulación, responden rápidamente a los estímulos quimiotácticos; fagocitan y destruyen partículas extrañas, pueden ser activados por citocinas producidas sobre todo por macrófagos y células endoteliales y son la población celular principal en la respuesta inflamatoria aguda. Los neutrófilos también poseen receptores para Inmunoglobulinas y para proteínas del complemento migran y se acumulan en lugares en donde se activa el complemento. Por lo tanto, fagocitan partículas opsonizadas y actúan como células efectoras de la inmunidad humoral (Abbas y Lichtman, 2001).

Por largo tiempo el papel de los neutrófilos en la inmunoregulación de la infección con *T. cruzi* había recibido poca atención, sin embargo, evidencias recientes de varios estudios sugieren que los neutrófilos pueden contribuir significativamente en la respuesta inmune modulando tanto la inmunidad humoral como la celular especialmente por la liberación de citocinas inmunoregulatorias (Kudo et al., 1993). Estudios recientes han demostrado que los neutrófilos están involucrados en la inmunomodulación de la enfermedad de Chagas y se ha observado que la eliminación de neutrófilos mediante la administración de anticuerpos monoclonales en ratones BALB/c exacerba la infección con *T. cruzi*, mientras que la eliminación de estos en otra cepa de ratones como los C57BL/6 los protegen de la infección, por lo que juegan un papel opuesto, con respecto a la protección versus exacerbación de la infección y posiblemente modulan la respuesta Th1/Th2 en diferentes direcciones (Chen et al., 2001).

I.5.e. Linfocitos T.

Los linfocitos son las células que específicamente reconocen y responden a los antígenos extraños, sin embargo, las fases de reconocimiento y activación de las respuestas inmunes específicas dependen de las células no linfoides. Los linfocitos son las únicas células en el organismo capaces de reconocer específicamente y distinguir determinantes antigénicos, estos tienen de 8 a 10 μm de diámetro y poseen un gran núcleo con una heterocromatina densa, hay un delgado anillo de citoplasma que contiene unas pocas mitocondrias, ribosomas y lisosomas, pero no organelos especializados, los linfocitos constan de diferentes subgrupos que difieren en sus funciones y productos proteicos, aunque todos ellos son morfológicamente similares.

Los linfocitos T, cuyos precursores provienen de la médula ósea y después migran y maduran en el timo se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas, siendo las mejor definidas las células T cooperadoras y las células T citotóxicas, estas poblaciones expresan distintas proteínas de membrana, las cuales sirven como marcadores fenotípicos; la mayoría de las células T cooperadoras expresan una proteína de superficie llamada CD4^+ , mientras que la mayoría de los linfocitos citotóxicos (CTL) expresan un marcador diferente llamado CD8^+ . Las funciones principales de los linfocitos T son regular la respuesta inmune frente a antígenos proteicos y ayudar en su calidad de células efectoras en la eliminación de microorganismos intracelulares. Las células T no producen anticuerpos, sus receptores para antígenos son moléculas de membrana diferentes pero estructuralmente relacionadas con los anticuerpos. Los linfocitos T citotóxicos y cooperadores muestran una especificidad poco común por los antígenos que son péptidos unidos a proteínas que están codificadas por genes del complejo mayor de histocompatibilidad y que se expresan sobre la superficie de otras células; como resultado estas células T reconocen y responden a antígenos asociados a la superficie celular pero no a los antígenos solubles. En respuesta a la estimulación antigénica las células T colaboradoras secretan proteínas llamadas citocinas cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células T así como de otras células, entre ellas las células B y los macrófagos, además de realizar las funciones cooperadoras y citotóxicas, las células T también pueden inhibir la respuesta inmune (Abbas y Lichtman, 2001).

Como se indicó anteriormente, al progresar la infección con *T. cruzi*, el sistema inmune del hospedero es movillado por una activación polidonal de linfocitos la cual afecta a todas las poblaciones de células linfocíticas periféricas, sin embargo, algunos estudios muestran que estas células T son capaces de modular la intensidad

de la parasitemia, la mortalidad y la inflamación de los tejidos, y todo esto se encuentra relacionado también con la edad del hospedero (DosReis, 1997).

Se ha observado que la eliminación de células T mediante la administración de suero anti-timo o por timectomía exacerba marcadamente el curso de la infección con *T. cruzi* (DosReis, 1997). El papel protector de los linfocitos T CD8⁺ en fases tempranas de la infección con *T. cruzi* está bien determinado ya que algunos experimentos muestran un incremento en la susceptibilidad en ratones a los que se les elimino esta población de linfocitos o cuando se infectaron ratones genéticamente deficientes en CD8⁺. Por otro lado, linfocitos CD8⁺ activados y transferidos adoptivamente a ratones normalmente susceptibles a la infección con *T. cruzi* demostraron proveer una protección importante en estos ratones (Grisotto et al., 2001).

Se ha demostrado que los linfocitos CD8⁺ son requeridos durante la fase aguda de la infección en la resistencia contra *T. cruzi*, sin embargo, los mecanismos por los cuales estos linfocitos T median la protección *in vivo* no están determinados completamente, mientras que las células CD8⁺ pueden exhibir funciones citolíticas también secretan citocinas como INF- γ la cual se sabe incrementa la protección contra *T. cruzi*, por otro lado, los mecanismos citolíticos dependientes de perforinas indican claramente una contribución en la resistencia aguda a la infección ya que experimentos *in vivo* con ratones deficientes de perforinas C57BL/6 (B6- PKO) infectados con la cepa Y de *T. cruzi* resultaron altamente susceptibles y murieron, mientras que los ratones con la expresión normal de perforinas sobrevivieron a la infección (Nickell y Sharma, 2000).

Los linfocitos CD4⁺ Th1 también son de gran importancia en la resistencia contra el parásito ya que producen IL-2 e INF- γ citocinas que son importantes para la protección sistémica contra un gran espectro de patógenos intracelulares. Los linfocitos CD4⁺ inducen la activación de macrófagos llevando a la inhibición de la multiplicación intracelular de *T. cruzi* y también pueden lisar directamente a células infectadas y pueden ayudar a la expansión de las células citotóxicas CD8⁺ las cuales reconocen y destruyen a células infectadas (Hoft et al., 2000). Los linfocitos CD4⁺ Th1 específicos constituyen una población que se ha identificado como relevante dentro de la protección contra el parásito además de ofrecer protección en la infección contra diferentes cepas de *T. cruzi*, esta protección se puede transferir a otros individuos mediante la transferencia adoptiva de células CD4⁺ Th1 específicas, la cual se ha observado que protege a ratones normalmente susceptibles a la infección con *T. cruzi* (Hoft et al., 2000). Se ha observado que ratones Knockout que no presentan linfocitos CD4⁺ tienen

un marcado incremento de la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* y se sabe que estos linfocitos ayudan en la producción de citocinas que activan y estimulan a macrófagos que destruyen al parásito. También se ha visto que durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* los linfocitos CD4⁺ sufren apoptosis *in vivo* y una inducción de la activación de la muerte celular *in vitro* la cual es mediada por la interacción de los receptores Fas/FasL (Zuñiga et al., 2002).

Ambas subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ participan en la resistencia contra *T. cruzi*, la muerte del parásito o con el control de su multiplicación y parecen estar relacionadas con la activación de macrófagos parasitados mediante la secreción de citocinas (Beltz et al., 1989); también están relacionadas con las funciones efectoras de citotoxicidad desarrolladas por células NK (Rottenberg et al., 1988). Por otro lado, los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ están implicados en el desarrollo de lesiones a tejidos asociadas con la patogénesis de la enfermedad (Sun y Tarleton, 1993; Tarleton et al., 1994). Se ha observado que ratones infectados con *T. cruzi* y deficientes en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, son más susceptibles e incrementan la parasitemia y su muerte (DosReis, 1997).

1.6. CITOCINAS EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *T. cruzi*.

Varios estudios han demostrado que el INF- γ induce efectos protectores en la infección experimental con *T. cruzi* llevando a una activación de macrófagos regulando la infección aguda, la inmunosupresión y la muerte de ratones infectados (Reed, 1988). Diversos estudios han demostrado que los tripomastigotes vivos (pero no los tripomastigotes muertos) o los epimastigotes pueden provocar una rápida secreción de IL-12, citocina que es capaz de inducir la producción de INF- γ *in vitro* producción que puede neutralizarse con anticuerpos anti-IL-12, los cuales controlan los niveles de INF- γ (Aliberti et al., 1996). Otras citocinas como IL-10 pueden regular los efectos y la producción misma del INF- γ en etapas tempranas de la infección (Reed et al., 1994). Además, se ha observado que la IL-10 es secretada en mayor o menor cantidad dependiendo de la cepa del ratón a la que se infecte. Junto con la IL-4 y TGF- β , la citocina IL-10 es un potente bloqueador de las funciones de los macrófagos, también se ha observado que en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* hay una disminución de mRNA para INF- γ y un aumento de mRNA para la IL-10 (Moore et al., 1993).

La polarización de la respuesta de las células T CD4⁺ en los procesos de producción de citocinas Th1 o Th2 es una característica importante de la infección crónica que parece ser el resultado de un antagonismo

funcional mutuo ejercido por INF- γ e IL-10, en contraste con la infección de *Leishmania major* la infección con *T. cruzi* no resulta en la polarización de la respuesta Th1 o Th2, ya que la secreción de INF- γ e IL-10 puede ser simultánea e intensa en diferentes modelos. Las funciones tempranas de INF- γ e IL-10 juegan un papel benéfico o dañino respectivamente, esto se ha observado en experimentos con anticuerpos anti-INF- γ o anti-IL-10. También se sabe que INF- γ ejerce un efecto protector en etapas tempranas (pero no en etapas tardías) de la infección. Se sabe que INF- γ es secretado por diferentes fuentes, en etapas tempranas las células NK son las que secretan esta citocina y después es secretada por células T, esta citocina es de las más importantes en cuanto al control del parásito. La citocina IL-10 es producida en etapas tempranas por células B CD5⁺ y por macrófagos, y esta citocina es capaz de reducir la extensión de la activación de los macrófagos, posteriormente esta citocina puede ser secretada por células T Th2. Por otro lado, la producción temprana de la interleucina IL-2 por células T Th1 está relacionada con la resistencia en ratones infectados con la cepa Brazil de *T. cruzi* y esta actividad desaparece durante la fase aguda con la secreción de IL-10. La regulación de las células Th1 puede estar mediada por IL-10, por la muerte celular, por apoptosis o por ambas. La producción de citocinas tipo Th2 como IL-4 o IL-5 y la persistencia de estas desde la fase aguda y hasta la fase crónica está relacionada con una prolongada persistencia del parásito en tejidos, pero también con la producción de anticuerpos líticos protectores. Varios mecanismos efectores son los que juegan un papel desfavorable colaborando con el daño al tejido, entre estos se encuentran la secreción de INF- γ , TNF α , la vía Fas/FasL para células T CD4⁺, la vía de las perforinas/granzimas para las células CD8⁺, así como la secreción de intermediarios tóxicos reactivos producidos por macrófagos y complejos antígeno-anticuerpo disparadores de la inflamación. Se ha observado que el parásito controla la respuesta del huésped induciendo una activación policlonal seguida de una apoptosis de linfocitos. El bloqueo de la actividad de los macrófagos y la supresión celular, puede estar mediado por factores conocidos como factores inmunosupresivos del tripanosoma (TIF), como las transilidasas y glicoproteínas de membrana (GIPLs) y otros factores por caracterizar (DosReis, 1997).

II. JUSTIFICACIÓN.

La enfermedad de Chagas transcurre con diversos cambios inmunológicos en el organismo infectado, estos cambios son los que permiten que la enfermedad se presente con una sintomatología de leve a severa e incluso en algunos casos Inadvertida. En estos fenómenos inmunológicos participan diversos tipos celulares, los cuales intervienen para controlar la proliferación del parásito en el hospedero evitando una multiplicación descontrolada la cual resulta perjudicial. Se han caracterizado diferentes tipos celulares que intervienen en la infección con cepas de *T. cruzi*, esto se ha realizado principalmente con cepas sudamericanas que pueden pertenecer al genotipo 1 o 2, pero la caracterización de tipos celulares que intervienen en la infección con cepas Mexicanas de *T. cruzi* no se ha realizado por lo que resulta importante analizar los tipos celulares que intervienen en la infección con estas cepas que pertenecen al genotipo 1 y que muestran diferentes grados de virulencia.

III. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

* Estudiar los principales tipos celulares que participan en la respuesta inmune celular en ratones infectados con 2 cepas Mexicanas de *Trypanosoma cruzi*, las cuales presentan diferente grado de virulencia.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- * Estudiar sistemáticamente el grado de virulencia de 2 cepas Mexicanas de *T. cruzi* en ratones BALB/c.
- * Analizar la relación virulencia cantidad de parásitos inoculados.
- * Determinar la proliferación celular de linfocitos de bazo de los ratones infectados con estas cepas.
- * Cuantificar el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en infecciones experimentales con estas cepas.
- * Analizar el porcentaje de células NK en ratones infectados con estas cepas durante la fase aguda de la infección.

IV. MATERIAL Y MÉTODO.

IV.1. RATONES.

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad, ya que se sabe que esta cepa de ratón es relativamente susceptible a la infección con *T. cruzi* (Chen et al, 2001). Los ratones fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en donde se criaron y mantuvieron bajo condiciones libres de organismos patogénicos. Se colocaron de 5 a 6 ratones máximo por caja, teniendo libre acceso en todo momento a alimento y agua. Todos los procedimientos que se siguieron con los animales fueron de acuerdo a los principios de ética en el uso de animales de laboratorio (Suckow et al., 2001).

IV.2. PARÁSITOS E INFECCIÓN EXPERIMENTAL.

Las cepas utilizadas son mexicanas, genotipo I y pertenecen al cepario de *T. cruzi* del laboratorio de Inmunología de la Dra. Bertha Espinoza que consta de 160 aislados diferentes, la mayoría ya caracterizados genéticamente (Espinoza et al., 1998; López-Olmos et al., 1998; Bosseno et al., 2002). Se obtuvieron los tripomastigotes en los picos máximos de la parasitemia en ratones BALB/c previamente infectados con estas cepas, los parásitos se mantienen en el ratón por reinfecciones periódicas efectuadas cada 28 días para la cepa avirulenta y cada 21 días para la cepa virulenta. Se infectaron por vía intraperitoneal de 9 a 12 ratones por cada grupo experimental con 10 mil y 100 mil parásitos de cada cepa. Los parásitos se inocularon en volúmenes de 200 µl de PBS estéril a cada ratón. Los grupos control fueron inoculados solamente con PBS estéril, realizándose por lo menos 3 repeticiones por experimento (Caballero, 1996).

IV.3. DETERMINACIÓN DE LA PARASITEMIA.

Se sangraron de 4 a 5 ratones de cada grupo mediante punción del plexo ocular con capilares heparinizados de vidrio de 75 mm de largo, se aseguró que cada ratón se sangrara una sola vez por semana para evitar alguna anemia. Las parasitemias se determinaron individualmente cada tercer día por examen microscópico de la sangre en dilución 1:20, 1:50 o por conteo directo de 10µl de sangre en cámara de Neubauer, esto último por que al principio de la infección existen muy pocos parásitos en circulación y en ésta etapa el número de parásitos se puede determinar mejor a diluciones menores (Caballero, 1996).

IV.4. DETERMINACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA.

Los ratones se monitorearon diariamente para observar las manifestaciones físicas de la infección, como el erizamiento de pelo, la parálisis de los miembros pélvicos y su muerte. El porcentaje de sobrevivencia se obtuvo dividiendo el número de ratones muertos entre el número total de ratones de cada grupo y multiplicado por 100 (López-Olmos et al., 1998).

IV.5. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO.

Se realizaron ensayos de proliferación de células de bazo y se determinó la capacidad de división que presentaron éstas ante estímulos específicos (antígenos del parásito) y no específicos (concanavalina A). Durante la fase aguda de la infección, los ensayos se estandarizaron al día 15 postinfección (p.i.) para los ratones infectados con la cepa virulenta y al día 21 p.i. para los ratones infectados con la cepa avirulenta, esta diferencia en cuanto al día de la proliferación en los grupos se debió principalmente a que las parasitemias en estos días fueron similares en los ratones infectados con ambas cepas, ya que el número de parásitos se encontraba en ascenso en ambos casos. También se realizó el ensayo durante la fase crónica al día 98 p.i., sólo en los ratones infectados con la cepa avirulenta. Se utilizaron linfocitos activados que provenían de ratones infectados y linfocitos que provenían de ratones controles sin infectar. Se obtuvieron los bazos de 3 ó 4 ratones de cada grupo infectado con 10 mil y 100 mil parásitos de cada cepa, se hicieron pooles y se repitieron los experimentos 3 veces, la técnica utilizada ya ha sido reportada con anterioridad (Pinge-Filho et al., 1999), los ratones fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical, obteniéndose quirúrgicamente los bazos, estos se lavaron y disgregaron en medio de cultivo RPMI complementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato al 1%, vitaminas al 1%, antibióticos al 1% (Apéndice I). Posteriormente se colectaron las células y el medio con pipeta Pasteur y se colocaron en tubos falcon de 15 ml estériles, dejándose reposar por 20 minutos en hielo, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 250 gs durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y al paquete celular se le agregaron 3 ml de solución de lisis (ACK) (Apéndice II), ésta se dejó actuar durante 3 minutos a 4°C, después se le agregaron 5 volúmenes de RPMI, se centrifugó durante 10 minutos a 250 gs., y se descartó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 5 ml de RPMI se contó el número de células en un hemocitómetro y se ajustó el número de células a utilizar (200 mil/100µl por pozo), el volumen final al agregar los estimulantes específicos y no

específicos fue de 200 μ l. Se colocaron en placas Costar de 96 pozos de baja evaporación (Corning Incorporated No. Cat. 3595) y se estimularon con concanavalina A, esta técnica se estandarizó ya que al principio se utilizaron varias concentraciones del mitógeno que fueron: 10, 5, 2 y 1 μ g por ml, posteriormente se optó por utilizar la concentración de 1 μ g por ml, también se estimuló con un extracto antigénico total de epimastigotes a una concentración de 20 μ g por ml (Coligan et al., 2000). Posteriormente, las placas se incubaron a 37° C durante 48 horas. Las células se marcaron con 1 μ Cl de timidina 3 H (NEN™ Life Science Products Inc. No. Cat. NET027E) por pozo, diluido en 9 μ l de RPMI y se mantuvieron en incubadora durante 20 horas más, posteriormente las células se cosecharon en membranas de fibra de vidrio para Beta plate-1205 de 102 x 258 mm. (Wallac Oy No. Cat. 719658/411000), esto se realizó con un cosechador automático Skatron Instruments, Norway. Una vez cosechadas las células, las membranas se dejaron secar con ayuda de una lámpara de 40 watts por aproximadamente 40 minutos, se colocaron en bolsas para membrana (Wallac Oy No. Cat. 722473) a las que se les agregaron 10 ml. de líquido de centelleo (Optiphase Hisafe 3 liquid Scintillation Cocktail Wallac Oy No Cat. 9806946079), posteriormente, las bolsas fueron selladas y colocadas en casetes del Beta-plate y fueron leídas en un detector de centelleo líquido Beta-plate 1205 (Wallac). Las cuentas por minuto (c.p.m.) obtenidas sirvieron para calcular los índices de estimulación, los cuales se obtienen con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Estimulación} = \frac{\text{Cuentas por minuto de los grupos experimentales.}}{\text{Cuentas por minuto del grupo control.}} \quad (\text{Pinge-Filho et al., 1999}).$$

IV.6. DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS CD4⁺ Y CD8⁺.

Para determinar cuales son las poblaciones de células de bazo que intervienen en la respuesta celular contra *T. cruzi*, se empleó citometría de flujo (Coligan et al., 2000). Para esto se obtuvieron los bazos de por lo menos 3 ratones de cada grupo con los dos inóculos, se hicieron pools y se repitieron los experimentos por lo menos 3 veces. La obtención tanto de los bazos de los ratones como de las células fue la misma descrita en la sección anterior. Se colocaron 1x10⁶ células de cada ratón en tubos falcon de poliestireno de 5 ml estériles, ésta cantidad de células se ajustó a 1ml de medio RPMI, se centrifugaron a 250 gs por 5 minutos, se descartó el sobrenadante cuidando de dejar una pequeña capa de éste para no llevarse el pellet, posteriormente se le agregó 1 μ g de los anticuerpos anti-CD8⁺ y anti-CD4⁺, los cuales fueron anticuerpos anti-CD8⁺ de ratón acoplados a ficoeritrina (Pharmingen No. Cat. 553032) y anti-CD4⁺ de ratón acoplados a fluoresceína

(Pharmingen No Cat. 553055), así como sus controles de isotipo anti-IgG2a acoplados a ficoeritrina y anti-IgG2b acoplados a fluoresceína (donados amablemente por la Dra. Armida Báez del Instituto de Investigaciones biomédicas de la UNAM), una vez colocados los anticuerpos las células se agitaron y se dejaron incubando en total oscuridad por 30 minutos, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS+azida de sodio, se centrifugaron a 250 gs por 5 minutos se obtuvo el pellet y se fijaron con paraformaldehído al 0.05%, para posteriormente ser analizadas en un citómetro de flujo FACScan, Beckton and Dickinson (www.biotech.ufl.edu/~fcl/direct.html).

IV.7. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS NK.

También se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células NK, durante los primeros días de la infección, para esto se infectaron ratones BALB/c con 100 mil tripomastigotes tanto de la cepa avirulenta como de la cepa virulenta, posteriormente se realizó una cinética de la infección obteniendo y marcando células NK a partir del bazo de los ratones infectados con ambas cepas, así como sus respectivos controles sin infectar. La cinética comenzó el día 0 ó preinfección siguiendo los días p.i. 1, 3, 5, 7, 9 y 11, los bazos se obtuvieron de por lo menos 3 ratones de cada grupo en los días señalados, de los cuales se hicieron pools, se repitió el experimento 3 veces bajo las mismas condiciones. El tratamiento de las células del bazo fue el mismo que para la determinación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ descrito anteriormente, excepto que, se marcó el pellet con 1µg de los anticuerpos para células NK anti-Ly49C y Ly49I de ratón acoplados a ficoeritrina (Pharmingen No. Cat. 553277) y como control de isotipo se utilizó anti-IgG2a que es una inmunoglobulina estándar de ratón acopladas a ficoeritrina (Pharmingen No. Cat. 553457), una vez colocados los anticuerpos las células se trataron y analizaron como se menciona en la sección anterior (Stoneman et al., 1995).

IV.8. ESTADÍSTICA.

Cada punto graficado tanto en las cargas parasitarias como en las tablas de sobrevivencia, así como en los índices de estimulación, en la determinación de células CD4⁺, CD8⁺ y NKs, representa la media de por lo menos tres animales por grupo, repitiéndose los experimentos de 3 a 5 veces. El análisis estadístico empleado fue análisis de varianza de una vía (ANOVA) así como X^2 con una significancia de $P < 0.05$ (Hays, 1998).

V. RESULTADOS.

V.1. APARIENCIA FÍSICA DE LOS RATONES INFECTADOS.

Se llevó a cabo un registro de la apariencia física general de los ratones infectados así como de los controles. La Figura 3, muestra los síntomas físicos más notorios en los ratones infectados con la cepa virulenta, como fueron el erizamiento de pelo y la parálisis de los miembros pélvicos los cuales se presentaron en los grupos infectados con 10 mil y con 100 mil parásitos (Fig. 3 B), mientras que los síntomas en los ratones infectados con la cepa avirulenta fueron casi imperceptibles y muy similares a los ratones control sin infectar (Fig. 3 A).

También se detectó la presencia de esplenomegalia, la cual se observa en la Figura 4, en donde el considerable tamaño que alcanzaron los bazo de los ratones infectados con *T. cruzi* (B y C) con respecto al bazo de los ratones control (A) fue muy evidente. Además se observó que los bazo de los ratones infectados con la cepa virulenta (C) fueron significativamente mayores que los de los ratones infectados con la cepa avirulenta (B). Cabe mencionar que, solamente para los grupos infectados con 100 mil parásitos se obtuvieron datos numéricos, pero los ratones infectados con 10 mil parásitos presentaron un comportamiento similar a simple vista. La Tabla 1, muestra el tamaño en cm. del bazo de los ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas y las medidas de los bazo de los ratones control sin infectar. Al aplicar la prueba estadística de ANOVA con un rango de confianza de 0.05, se observó una diferencia significativa en el tamaño promedio de los bazo de los grupos infectados con respecto al grupo control sin infectar, diferencia que también se presentó entre los grupos infectados con ambas cepas, en donde el grupo infectado con la cepa virulenta presentó un tamaño significativamente mayor al que presentaron los bazo de los ratones infectados con la cepa avirulenta.

V.2. PARASITEMIA.

Se determinó la cantidad de parásitos en circulación durante la fase aguda en los ratones infectados con ambos inóculos de la cepa avirulenta. Los datos individuales de cada experimento se encuentran en el apéndice VI y VII. La Figura 5, muestra la cinética observada en 3 experimentos independientes. Se observó que en los grupos infectados con 10 mil parásitos la primera aparición de estos en circulación ocurrió entre los días 6 a 10 p.i. mientras que en los grupos infectados con 100 mil parásitos fue entre los días 2 a 7 p.i. La parasitemia máxima en los grupos infectados con 10 mil tripanosomátidos osciló entre 8.5×10^5 y 9.5×10^5 parásitos por ml y

ésta se presentó entre los días 25 a 28 p.i., mientras que en los grupos infectados con 100 mil parásitos la parasitemia máxima osciló entre 1.05×10^6 y 1.2×10^6 parásitos y se presentó entre los días 25 a 28 p.i. La desaparición de los parásitos de circulación ocurrió en los grupos infectados con 10 mil parásitos entre los días 37 a 57 p.i., mientras que en los grupos infectados con 100 mil parásitos fue entre los días 39 a 50 p.i. (tabla 2).

En la Figura 6, se muestran las parasitemias encontradas en 3 experimentos independientes en los ratones que fueron infectados con ambos inóculos de la cepa virulenta. Se observó que en los grupos infectados con 10 mil tripomastigotes la aparición de parásitos en circulación ocurrió entre los días 7 a 8 p.i., mientras que en los grupos infectados con 100 mil parásitos ocurrió entre los días 2 a 4 p.i. La cantidad máxima de parásitos en circulación en los grupos infectados con 10 mil parásitos osciló entre 2.6×10^5 y 2.8×10^6 parásitos, y en los grupos infectados con 100 mil parásitos fue entre 3.3×10^6 y 4.4×10^6 parásitos. Los grupos infectados con 10 mil parásitos presentaron un pico máximo entre los días 28 a 35, mientras que en los grupos infectados con 100 mil parásitos esto fue entre los días 24 a 28. La desaparición de los parásitos de la circulación en los grupos infectados con 10 mil tripomastigotes ocurrió entre los días 42 a 52, y en los grupos infectados con 100 mil parásitos fue entre los días 42 a 45 (tabla 2).

La parasitemia en los grupos infectados con la cepa avirulenta presentó una meseta ya que los niveles máximos de parasitemia se mantuvieron por varios días, en contraste, en los grupos infectados con la cepa virulenta la tendencia fue la de presentar picos bien definidos en pocos días. Se observaron diferencias significativas en la cantidad máxima de parásitos, entre los grupos infectados con la cepa avirulenta y la cepa virulenta con ambos inóculos, principalmente en los días de máxima parasitemia. También hubo diferencias significativas entre inóculos de la misma cepa.

V.3. EFECTOS DEL INÓCULO EN LA SOBREVIVENCIA.

Se analizó la sobrevivencia al infectar grupos de 9 a 12 ratones con 10 mil y 100 mil parásitos de ambas cepas. La Figura 7, muestra los porcentajes de sobrevivencia de los grupos de ratones infectados y representa los resultados de 3 experimentos independientes con un total de 19 ratones por grupo. Los grupos infectados con la cepa virulenta, alcanzaron una mortalidad del 100 % con algunos días de diferencia entre ambos inóculos, alcanzándola en un tiempo más corto el grupo infectado con 100 mil parásitos. La mortalidad empezó a registrarse en ambos grupos al día 21. El 50% de mortalidad en el grupo infectado con 10 mil parásitos

ocurrió al día 50, mientras que en el grupo infectado con 100 mil parásitos ocurrió 7 días antes en el día 43. El 100% de mortalidad en los grupos infectados con 10 mil y 100 mil parásitos se presentó con 3 días de diferencia ya que para los infectados con 100 mil parásitos ocurrió al día 54 y en los infectados con 10 mil parásitos fue al día 57. Los grupos de ratones infectados con la cepa avirulenta presentaron 100% de sobrevivencia y esta no se modificó con ninguno de los 2 inóculos.

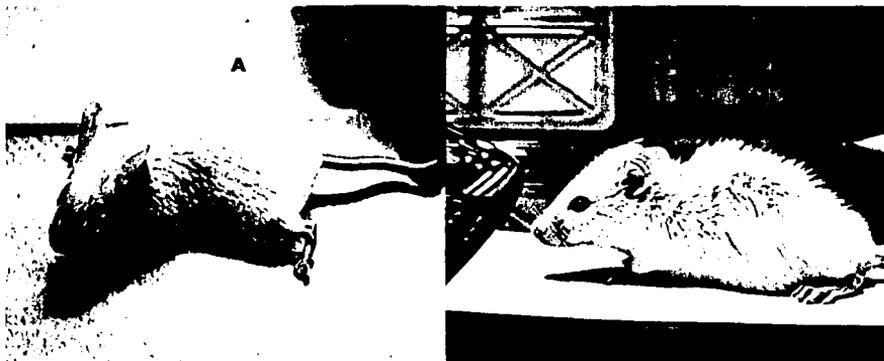


Fig. 3 Apariencia Física de los ratones. A) Ratón BALB/c control sin infectar. B) Ratón infectado con 100 mil parásitos de la cepa virulenta, presentó erizamiento de pelo y parálisis de los miembros pélvicos. El aspecto de los ratones infectados con la cepa avirulenta fue similar al de los ratones no infectados.



Fig. 4 Esplenomegalia presente en los ratones infectados. A) Bazo de ratón sin infectar. B) Bazo de ratón infectado con 100 mil parásitos de la cepa avirulenta. C) Bazo de ratón infectado con 100 mil parásitos de la cepa virulenta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. ESPLENOMEGALIA EN RATONES INFECTADOS CON *T. cruzi*.

	Bazo 1 Longitud. (cm.)	Bazo 2 Longitud. (cm.)	Bazo 3 Longitud. (cm.)	Promedio. Longitud. (cm.)
Controles no infectados.	1.2	1.4	1.6	1.4 ± 0.2
Infectados con cepa avirulenta.	2.3	2.5	2.1	2.3 ± 0.2 ★★
Infectados con cepa virulenta.	3.1	2.9	3.0	3.0 ± 0.1 ★★

Tamaño del bazo en cm. de los ratones infectados con 100 mil parásitos tanto con la cepa virulenta como con la avirulenta y de ratones control.

★ Diferencias estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratones control. $P < 0.05$

★ Diferencias estadísticamente significativa entre los grupos que presentan el símbolo. $P < 0.05$

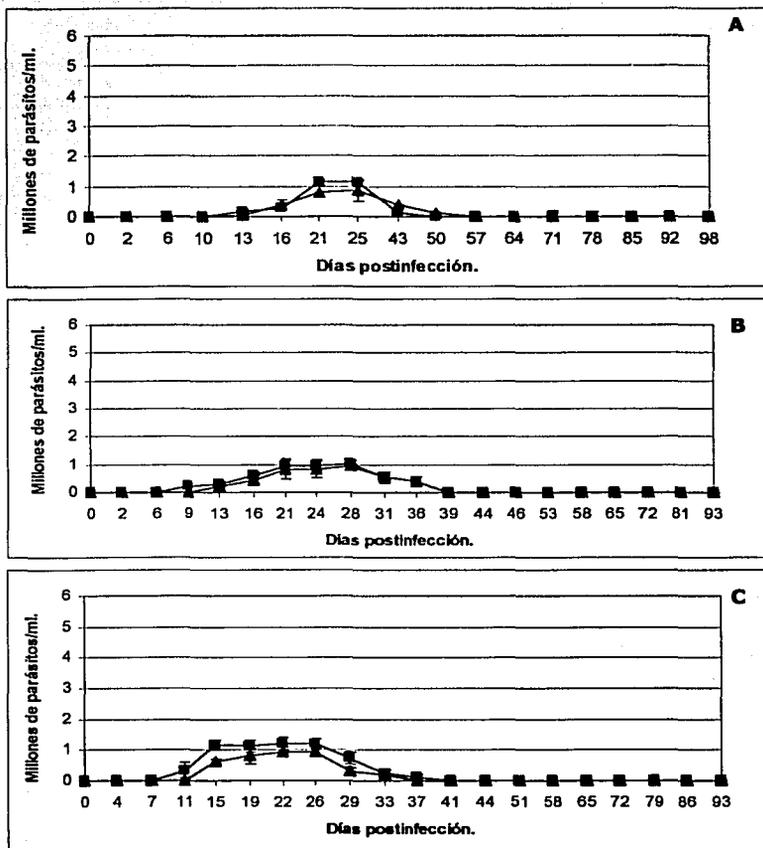


Fig. 5. Gráficas de parasitemia de ratones infectados con la cepa avirulenta. Se evaluaron un total de 4 a 5 individuos por grupo. ▲ Ratones infectados con 10 mil parásitos. ■ Ratones infectados con 100 mil parásitos. A, B y C representan 3 experimentos independientes bajo las mismas condiciones.

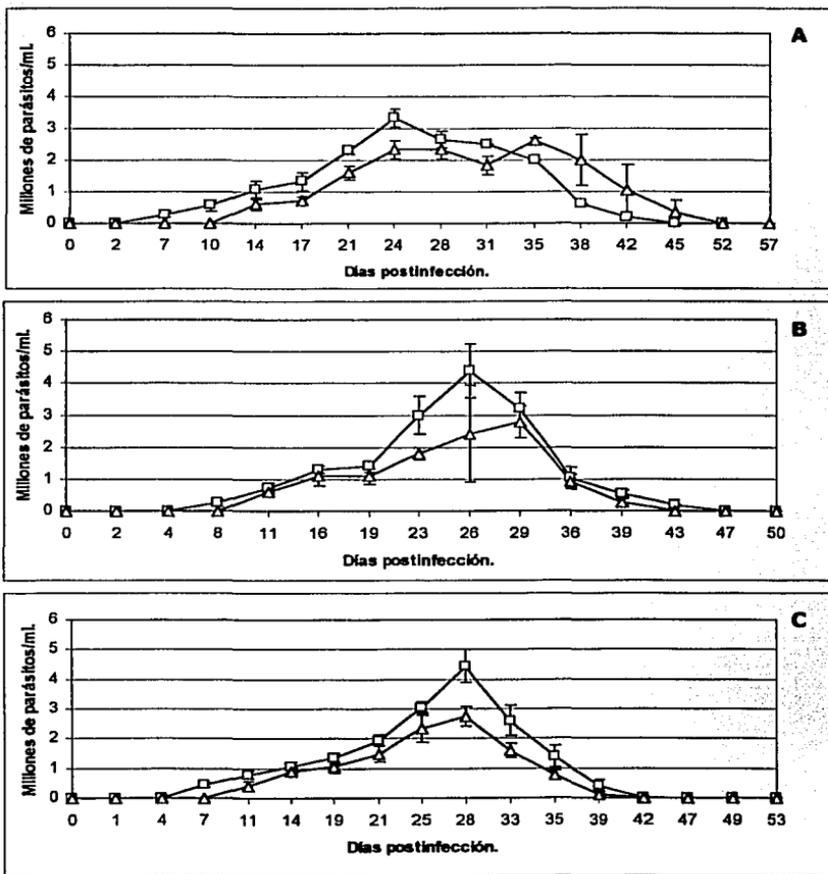


Fig. 6. Gráficas de parasitemia de ratones infectados con la cepa virulenta. Se evaluaron un total de 4 a 5 individuos por grupo. △ Ratones infectados con 10 mil parásitos. □ Ratones infectados con 100 mil parásitos. A, B y C representan 3 experimentos independientes bajo las mismas condiciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. DATOS DE PARASITEMIA.

Ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa avirulenta.				
	Día de aparición de parásitos.	Día de máxima parasitemia.	Cantidad máxima de parásitos.	Día de desaparición de parásitos.
1er Exp.	6	25	1,133,333	50
2do Exp.	2	28	1,050,000	39
3er Exp.	7	26	1,200,000	41
Promedio.	5 ± 2.6	26.3 ± 1.5	1,127,777 ± 75,154 *	43.3 ± 5.8
Ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa avirulenta.				
	Día de aparición de parásitos.	Día de máxima parasitemia.	Cantidad máxima de parásitos.	Día de desaparición de parásitos.
1er Exp.	10	25	850,000	57
2do Exp.	6	28	950,000	39
3er Exp.	7	26	950,000	37
Promedio.	7.6 ± 2	26.3 ± 1.5	916,666 ± 57,735 *	44.3 ± 11
Ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta.				
	Día de aparición de parásitos.	Día de máxima parasitemia.	Cantidad máxima de parásitos.	Día de desaparición de parásitos.
1er Exp.	2	24	3,333,333	45
2do Exp.	4	26	4,400,000	47
3er Exp.	4	28	4,450,000	42
Promedio.	3.3 ± 1.1 *	26 ± 2	4,061,111 ± 630,769 *	44.6 ± 2.5
Ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa virulenta.				
	Día de aparición de parásitos.	Día de máxima parasitemia.	Cantidad máxima de parásitos.	Día de desaparición de parásitos.
1er Exp.	7	35	2,666,666	52
2do Exp.	8	29	2,866,666	43
3er Exp.	7	28	2,750,000	42
Promedio.	7.3 ± 0.5 *	30.6 ± 3.7	2,761,110 ± 100,461 *	45.6 ± 5.5

* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que presentan el símbolo. P < 0.05

* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que presentan el símbolo. P < 0.05

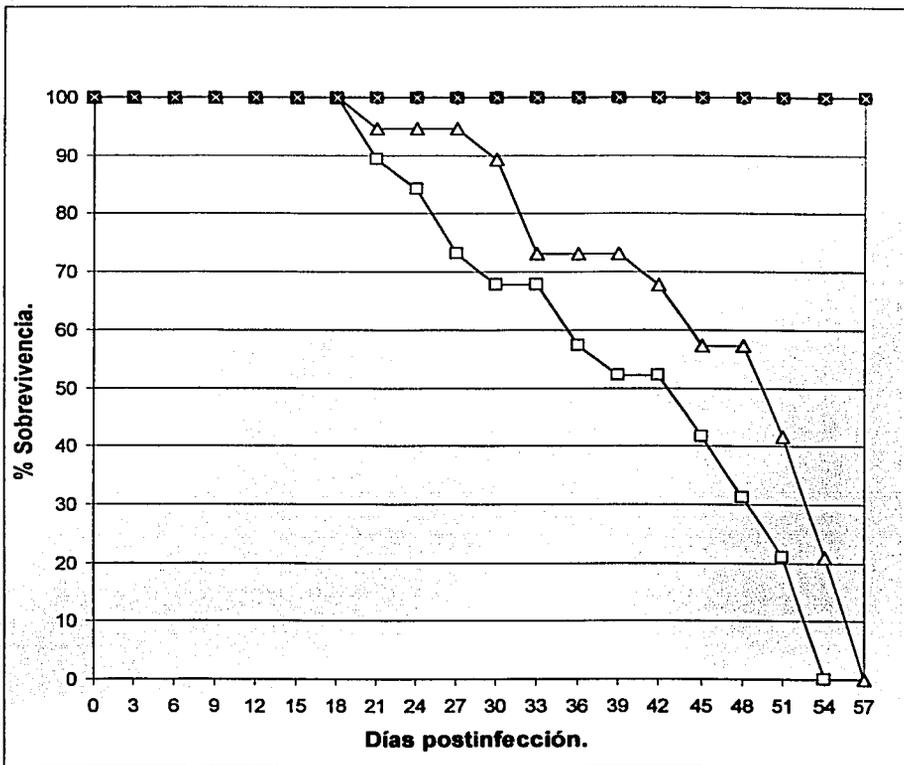


Fig. 7. Gráfica de sobrevivencia de ratones infectados con la cepa virulenta y avirulenta. La gráfica representa 3 experimentos independientes de 6 a 8 ratones por grupo. Δ Sobrevivencia de ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa virulenta. \square Sobrevivencia de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta. \blacksquare Sobrevivencia de los ratones infectados con la cepa avirulenta. La sobrevivencia en todos los experimentos en donde se infectó con la cepa avirulenta fue del 100%. \times Grupo control sin infectar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V.4. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO EN RATONES INFECTADOS.

Se determinó la capacidad de proliferación de las poblaciones de esplenocitos de los grupos de ratones infectados, analizando la incorporación de timidina ^3H en el núcleo de las células que se dividieron. Se obtuvieron las cuentas por minuto (c.p.m.) totales debidas a la incorporación de esta timidina a las células de bazo de los ratones infectados con 10 mil y 100 mil parásitos de ambas cepas, durante las fases aguda y crónica de la infección. Las células se estimularon con antígeno, el cual consistía en un extracto total de epimastigotes de cada cepa a una concentración de $20\mu\text{g}$ por ml y con el mitógeno concanavalina A con una concentración de $1\mu\text{g}$ por ml, se realizaron un total de 3 experimentos. Las células de bazo en los ratones control y las células de los grupos infectados con 10 mil y 100 mil parásitos con ambas cepas que no recibieron estímulo, presentaron cuentas basales muy bajas.

Al estimular con antígeno durante la fase aguda de la infección se observaron diferencias entre los grupos infectados con ambas cepas en donde las células de los grupos infectados con la cepa avirulenta proliferaron más que los grupos infectados con la cepa virulenta, (tabla 3 y 4). Durante la fase crónica de la infección, la cual fue alcanzada solamente por los grupos infectados con ambos inóculos de la cepa avirulenta, la estimulación con el antígeno no presentó diferencias con respecto a los grupos control sin infectar (tabla 5). En contraste, cuando se estimuló usando concanavalina A las células de los grupos infectados con ambos inóculos y con ambas cepas tanto en la fase aguda como en la crónica proliferaron de forma similar o menor que las células de los ratones control sin infectar (tabla 3, 4 y 5).

V.5. ÍNDICES DE ESTIMULACIÓN.

En la tabla 6, se muestran los índices de estimulación promedio obtenidos de los experimentos mencionados anteriormente y anotados en las tablas 3, 4 y 5. Los índices de estimulación se obtuvieron dividiendo las cuentas por minuto de los grupos experimentales entre las cuentas obtenidas del grupo control (Pinge-Filho et al., 1999). En la figura 8, se observa que durante la fase aguda de la infección al estimular con antígeno de epimastigotes los grupos infectados con ambas cepas y con ambos inóculos presentaron índices de estimulación significativamente mayores con respecto a los de las células del grupo control sin infectar, también se observó que las células de los grupos infectados con la cepa avirulenta proliferaron de manera significativamente mayor que las células de los grupos infectados con la cepa virulenta, ésto solamente en el

grupo infectado con 100 mil parásitos. Sin embargo, durante la fase crónica la cual fue alcanzada solamente por los grupos infectados con ambos inóculos de la cepa avirulenta, se observó que los índices de estimulación al utilizar antígeno ya no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control sin infectar.

Al utilizar concanavalina A los índices de estimulación de las células de los grupos infectados con ambas cepas y con ambos inóculos resultaron ser iguales o menores que los de los grupos control sin infectar tanto en la fase aguda como en la crónica, resultados que sugieren una inmunosupresión en los ratones infectados (Figura 9).

V.6. PORCENTAJES DE CÉLULAS CD4⁺ Y CD8⁺.

Conociendo que las células CD4⁺ y CD8⁺ presentan un papel muy importante en la regulación de la infección con *T. cruzi* y que la cantidad de estos tipos celulares puede verse modificado dependiendo de la cepa infectante alterando el curso de la infección, se decidió determinar el porcentaje de estas poblaciones mediante citometría de flujo. La determinación fue a partir de células totales de bazo ya que en el bazo existe una gran cantidad de linfocitos y éste es uno de los órganos participantes en la regulación de la respuesta inmune. Las figuras 10 y 11, muestran las gráficas de experimentos representativos analizados por citometría de flujo en donde se determinó el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ presentes en ratones infectados con la cepa avirulenta y virulenta respectivamente obtenidos durante la fase aguda y crónica de la infección con ambos inóculos, los porcentajes de todos los experimentos se pueden ver en el apéndice V.

Durante la fase aguda se observó que los ratones infectados con la cepa avirulenta presentaron un porcentaje de linfocitos CD8⁺ ligeramente mayor con respecto al control, solamente cuando se utilizaron 100 mil parásitos, mientras que los ratones infectados con la cepa virulenta no presentaron diferencias con los ratones control sin infectar. Por otro lado el porcentaje de linfocitos CD4⁺ en los ratones infectados con ambas cepas presentó una disminución significativa en esta fase.

En la fase crónica alcanzada solamente por los ratones infectados con la cepa avirulenta se observó que los linfocitos CD8⁺ se incrementaron de manera significativa, mientras que el porcentaje de linfocitos CD4⁺ recuperó sus valores normales, esto con ambos inóculos (tabla 7).

V.7. PORCENTAJES DE CÉLULAS NK DURANTE LA FASE AGUDA.

Se realizó una cinética cuantificando células NK durante la infección con *T. cruzi* analizando los porcentajes de estas durante los días 0, 1, 3, 5, 7, 9 y 11 p.i. La tabla 8 muestra el incremento o decremento con respecto al control de células NK, cada punto es el promedio de los pooles de células de bazo de 3 ó 4 ratones, en 3 experimentos independientes. La tendencia de incremento o decremento se obtuvo dividiendo el porcentaje de células NK de los ratones infectados con 100 mil tripomastigotes de ambas cepas y dividiendo éste entre el porcentaje de células NK del grupo control.

Se encontró para ambas cepas un incremento en el día 5 p.i., el cual presentó diferencias significativas con respecto al grupo control, aunque no hubo diferencias entre los ratones infectados con ambas cepas, además en el día 9 p.i. se observó otro incremento en el porcentaje de células NK de los ratones infectados con la cepa virulenta el cual resultó significativo con respecto al grupo de ratones control, este comportamiento no fue observado en los ratones infectados con la cepa avirulenta, que después del día 5 p.i. mantuvieron porcentajes muy cercanos al de los ratones control (Figura 12).

Tabla 3. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO CEPA AVIRULENTE. Fase Aguda.

1ER. EXP. 20 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10 MIL.	INFECT. 100 MIL.
Sin estímulo.	156 ± 57 (1)	109 ± 43 (0.7)	105 ± 28 (0.7)
Estímulo con 20µg/ml de Ag Epis.	651 ± 253 (1)	1,647 ± 933 (2.5)	3,111 ± 3,114 (4.7)
Estímulo con 1µg ConA.	98,020 ± 97,875 (1)	70,581 ± 49,629 (0.7)	70,256 ± 44,010 (0.7)
2DO. EXP. 20 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10MIL.	INFECT. 100 MIL.
Sin estímulo.	240 ± 83 (1)	280 ± 114 (1.1)	226 ± 86 (0.9)
Estímulo con 20µg/ml de Ag Epis.	5,695 ± 1,932 (1)	2,566 ± 2,232 (0.5)	3,566 ± 950 (0.6)
Estímulo con 1µg ConA.	228,060 ± 160,838 (1)	155,697 ± 126,870 (0.7)	239,069 ± 76,229 (1)
3ER. EXP. 20 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10 MIL.	INFECT. 100 MIL.
Sin estímulo.	108 ± 21 (1)	169 ± 36 (1.5)	202 ± 113 (1.87)
Estímulo con 20µg/ml de Ag Epis	817 ± 712 (1)	2,731 ± 1,842 (3.3)	4,436 ± 5,117 (5.4)
Estímulo con 1µg ConA	52,642 ± 33,904 (1)	38,110 ± 27,700 (0.7)	30,690 ± 10,805 (0.6)

Los valores representan las cuentas por minuto (c.p.m.) correspondientes al promedio de triplicados ± su desviación estándar. Los valores entre paréntesis corresponden al índice de estimulación.

★ c.p.m. estadísticamente significativas con respecto al control. $P < 0.05$

Tabla 4. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO CEPA VIRULENTE. Fase Aguda.

1ER. EXP. 15 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10 MIL.	INFECT.100 MIL.
Sin estímulo	136 ± 9 (1)	213 ± 3 (1.5)	298 ± 52 (2.1)
Estímulo con 20µg/ml de Ag Epis	1,002 ± 294 (1)	2,580 ± 1,200 (2.5)	1,678* ± 299 (1.6)
Estímulo con 1µg de ConA	103,589 ± 28,091 (1)	92,082 ± 50,811 (0.8)	39341* ± 9,906 (0.4)
2DO EXP. 15 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10 MIL.	INFECT.100 MIL.
Sin estímulo	113 ± 14 (1)	209 ± 39 (1.8)	177 ± 44 (1.5)
Estímulo con 20µg/ml de Ag Epis	1,040 ± 1,408 (1)	3,188 ± 2,472 (3)	2,664 ± 1,804 (2.5)
Estímulo con 1µg de ConA	78,125 ± 74,576 (1)	87,800* ± 85,876 (1.1)	50,520* ± 9,082 (0.6)
3ER. EXP. 15 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10 MIL.	INFECT.100 MIL.
Sin estímulo	213 ± 30 (1)	205 ± 41 (0.9)	872 ± 445 (4)
Estímulo con 20µg/ml de Ag Epis	1,075 ± 1,233 (1)	1,213 ± 1,124 (1.1)	3,931* ± 2,343 (3.6)
Estímulo con 1µg de ConA	102,424 ± 123675 (1)	102,559 ± 124351 (1)	74,429 ± 37,535 (0.7)

Los valores representan las cuentas por minuto (c.p.m.) correspondientes al promedio de triplicados ± su desviación estándar. Los valores entre paréntesis corresponden al índice de estimulación.

* c.p.m. estadísticamente significativas con respecto al control. P < 0.05

Tabla 5. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO CEPA AVIRULENTA. Fase Crónica.

1ER EXP. 98 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10 MIL.	INFECT. 100 MIL.
Sin estímulo.	114 ± 35 (1)	226 ± 102 (1.9)	106 ± 41 (0.9)
Estímulo con 20µg/ml Ag de Epis.	1,188 ± 467 (1)	1,534 ± 686 (1.2)	439* ± 124 (0.4)
Estímulo con 1µg/ml de ConA	241,521 ± 38,434 (1)	206,181* ± 25,153 (0.8)	149,091 ± 91,681 (0.6)
2DO EXP. 98 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10 MIL.	INFECT. 100 MIL.
Sin estímulo.	125 ± 27 (1)	150 ± 14 (1.2)	95 ± 28 (0.8)
Estímulo con 20µg/ml de Ag Epis	462 ± 209 (1)	300 ± 57 (0.6)	429 ± 218 (0.9)
Estímulo con 1µg/ml de ConA	134,190 ± 118,886 (1)	70,250 ± 23,109 (0.5)	83,663 ± 28,443 (0.6)
3ER. EXP. 98 Días P.I.	CONTROL	INFECT. 10 MIL.	INFECT. 100 MIL.
Sin estímulo.	95 ± 13 (1)	115 ± 16 (1.2)	115 ± 9 (1.2)
Estímulo con 20µg/ml de Ag Epis	159 ± 85 (1)	290 ± 102 (1.8)	319 ± 88 (2)
Estímulo con 1µg/ml de ConA	28,636 ± 24,078 (1)	37,236* ± 9,923 (1.3)	18,962* ± 4,434 (0.6)

Los valores representan las cuentas por minuto (c.p.m.) correspondientes al promedio de triplicados ± su desviación estándar. Los valores entre paréntesis corresponden al índice de estimulación.

* c.p.m. estadísticamente significativas con respecto al control. P < 0.05

Tabla 6. ÍNDICES DE ESTIMULACIÓN PROMEDIO.

RATONES INFECTADOS CON LA CEPA AVIRULENTE (FASE AGUDA).			
	CONTROL	INFECT. 10MIL.	INFECT. 100MIL.
Estímulo con 20µg/Ag de Epis.	1 ± 0	2.9 ± 0.5 *	5 ± 0.4 **
	CONTROL	INFECT. 10MIL.	INFECT. 100MIL.
Estímulo con 1µg de ConA.	1 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0.07
RATONES INFECTADOS CON LA CEPA VIRULENTE (FASE AGUDA).			
	CONTROL	INFECT. 10MIL.	INFECT. 100MIL.
Estímulo con 20µg/Ag de Epis.	1 ± 0	2.2 ± 1 *	2.5 ± 1 **
	CONTROL	INFECT. 10MIL.	INFECT. 100MIL.
Estímulo con 1µg de ConA.	1 ± 0	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
RATONES INFECTADOS CON LA CEPA AVIRULENTE (FASE CRÓNICA).			
	CONTROL	INFECT. 10MIL.	INFECT. 100MIL.
Estímulo con 20µg/Ag de Epis.	1 ± 0	1.2 ± 0.6	1.1 ± 0.8
	CONTROL	INFECT. 10MIL.	INFECT. 100MIL.
Estímulo con 1µg de ConA.	1 ± 0	0.86 ± 0.4	0.6 ± 0

Índices de estimulación de células de bazo de ratones infectados con ambas cepas (promedio de 3 experimentos independientes ± su desviación estándar).

* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. $P < 0.05$

** Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que presentan el símbolo. $P < 0.05$

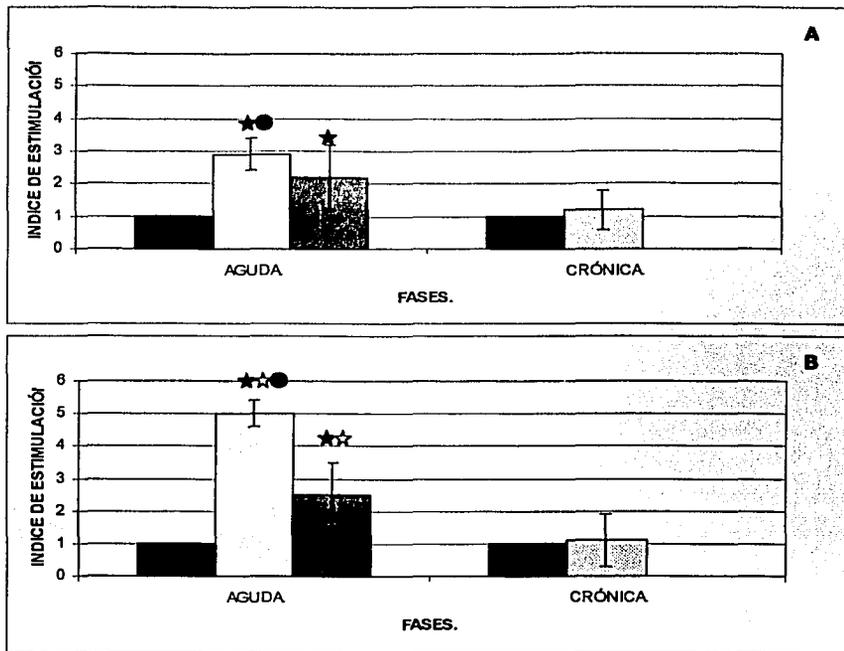


Fig. 8. Índices de estimulación de células de bazo de ratones infectados con la cepa virulenta y la avirulenta estimuladas con 20 µg por ml de antígeno del parásito (promedio de 3 experimentos independientes). Barras negras con puntos claros ratones control sin infectar. Barras blancas con puntos negros ratones infectados con la cepa avirulenta. Barras con diagonales ratones infectados con la cepa virulenta. A) Grupos de ratones infectados con 10 mil parásitos. B) Grupos de ratones infectados con 100 mil parásitos.

★ Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. $P < 0.05$

★ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que presentan el símbolo. $P < 0.05$

● Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que presentan el símbolo. $P < 0.05$

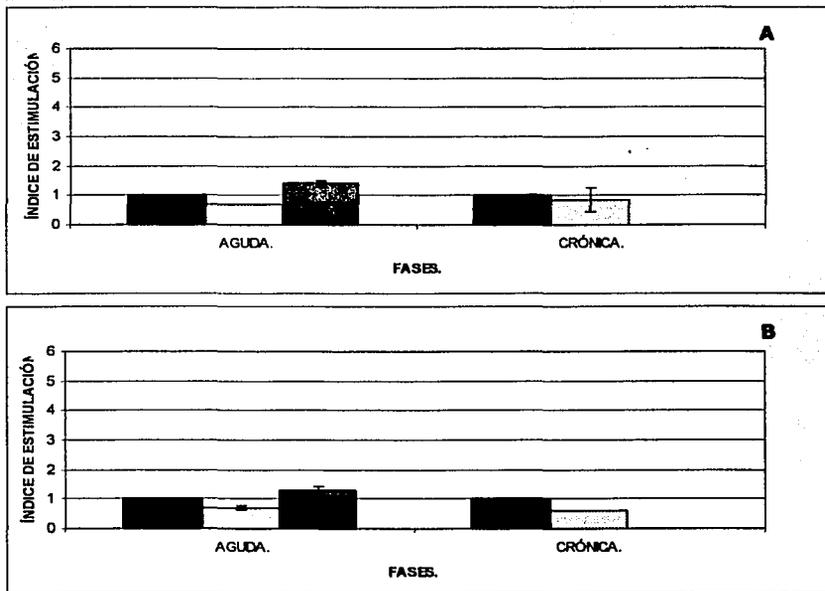


Fig. 9. Índices de estimulación de células de bazo de ratones infectados con la cepa virulenta y la avirulenta estimuladas con $1 \mu\text{g}$ por ml de concanavalina A; (promedio de 3 experimentos independientes). Barras negras con puntos claros ratones control sin infectar. Barras blancas con puntos negros ratones infectados con la cepa avirulenta. Barras con diagonales ratones infectados con la cepa virulenta. A) Grupos de ratones infectados con 10 mil parásitos. B) Grupos de ratones infectados con 100 mil parásitos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

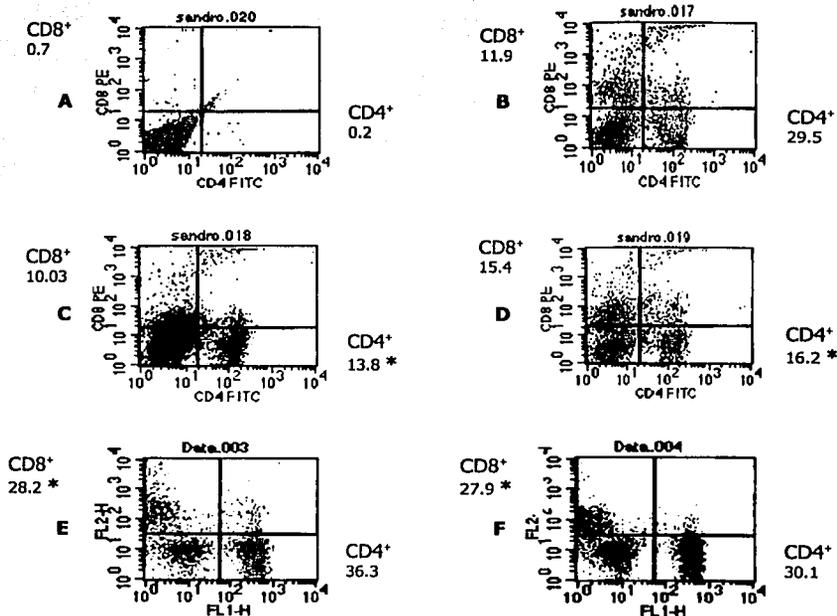


Fig. 10. Porcentajes de células CD4⁺ y CD8⁺ presentes en bazo. Experimento representativo analizado mediante citometría de flujo. A) Representa el porcentaje de células diferentes a linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones, marcadas con un control de isotipo. B) Representa el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones controles sin infectar. C) Corresponde a la fase aguda de la infección y representa el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa avirulenta. D) Corresponde a la fase aguda de la infección y representa el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones infectado con 100 mil parásitos de la cepa avirulenta. E) y F) Corresponden a la fase crónica de la infección y representan el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones infectados con 10 y 100 mil parásitos respectivamente de la cepa avirulenta.

* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. P < 0.05

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

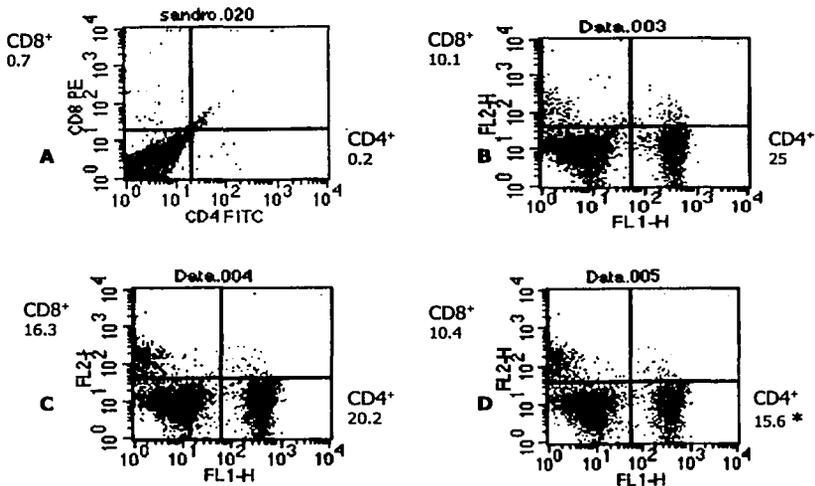


Fig. 11. Porcentajes de células CD4⁺ y CD8⁺ presentes en bazo. Experimento representativo analizado mediante citometría de flujo. A) Representa el porcentaje de células diferentes a linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones, marcadas con el control de Isotipo. B) Representa el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones controles sin infectar. C) Corresponde a la fase aguda de la infección y representa el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa virulenta. D) Corresponde a la fase aguda de la infección y representa el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ de un pool de células de bazo de 3 ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta.

* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. P < 0.05

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. PROMEDIO DE LINFOCITOS CD4⁺ Y CD8⁺ DE RATONES INFECTADOS CON *T. cruzi*.

AVIRULENTA AGUDA.			
LINFOCITOS.	CONTROLES.	INFECT. 10 MIL	INFECT. 100 MIL.
% CD8 ⁺	11.8 ± 0.1	11.8 ± 2.6	16.3 ± 1.9
% CD4 ⁺	28.8 ± 1	15.1 ± 2.6 *	18 ± 2.5 *
VIRULENTA AGUDA.			
LINFOCITOS.	CONTROLES.	INFECT. 10 MIL	INFECT. 100 MIL.
% CD8 ⁺	10.5 ± 4.6	11.7 ± 4.3	10 ± 6
% CD4 ⁺	24 ± 3.3	17 ± 3.3 *	14 ± 2.5 *
AVIRULENTA CRONICA.			
LINFOCITOS.	CONTROLES.	INFECT. 10 MIL	INFECT. 100 MIL.
% CD8 ⁺	9.9 ± 4.1	23.2 ± 7.8 *	18 ± 8.7 *
% CD4 ⁺	25.8 ± 8	30.3 ± 11.6	25.3 ± 7.4

La tabla representa el promedio de 3 experimentos diferentes bajo las mismas condiciones.

* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control del mismo grupo. P < 0.05

Tabla 8. CÉLULAS NK DE BAZO DE RATONES INFECTADOS CON *T. cruzi*

Experimento 1.							
Días Postinfección.	0	1	3	5	7	9	11
Cepa avirulenta.	1	1.04	0.65	1.45	0.62	0.98	1.06
Cepa virulenta.	1	1.74	0.51	1.96	1.17	1.53	1.65
Experimento 2.							
Días Postinfección.	0	1	3	5	7	9	11
Cepa avirulenta.	1	0.59	0.79	1.47	0.73	0.97	0.96
Cepa virulenta.	1	0.69	0.78	1.85	1.15	1.23	0.79
Experimento 3.							
Días Postinfección.	0	1	3	5	7	9	11
Cepa avirulenta.	1	1.07	2.03	1.69	1.28	1.11	1.23
Cepa virulenta.	1	1.48	2.01	1.51	1.61	1.66	0.87

Cada valor representa el incremento o disminución con respecto al control en el porcentaje de células NK de un pool de células de bazo de 3 ratones.

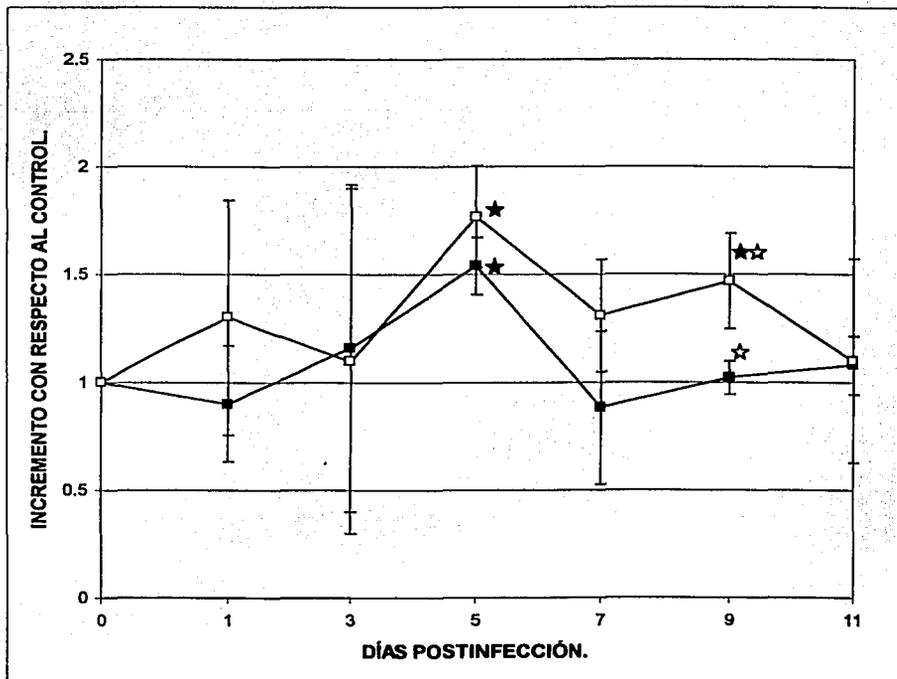


Fig. 12. Porcentajes de células NK presentes en bazo. Índices de incremento de los grupos experimentales con respecto al grupo control. Los índices de incremento se calcularon con la misma fórmula que los índices de estimulación. Cada punto corresponde al promedio de 3 experimentos. ■ Pools de células de bazo de 3 ratones infectados con 100 mil tripomastigotes de la cepa avirulenta. □ Pools de células de bazo de 3 ratones infectados con 100 mil tripomastigotes de la cepa virulenta.

★ Diferencias significativas con respecto al grupo control sin infectar. $P < 0.05$

★ Diferencias significativas entre los grupos que presentan el símbolo. $P < 0.05$

El grupo control equivale a 1.

VI. DISCUSIÓN.

VI.1. VIRULENCIA.

Al estudiar los aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares se han encontrado grandes diferencias en el comportamiento de las cepas de *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo* y se han descrito posibles implicaciones del vector en la modulación de la virulencia de las cepas cuando estas circulan en los insectos (Lammel et al., 1985). La variabilidad en su comportamiento biológico y la heterogeneidad que presentan en su caracterización bioquímica y molecular han impedido establecer parámetros adecuados para su clasificación y taxonomía, así como para poder determinar el comportamiento de las cepas en el hospedero, lo que ha hecho que su caracterización sea una condición necesaria para su estudio y control (Guzmán-Marín et al., 1999). Resulta de gran importancia el conocer la respuesta inmune celular que prevalece en la infección con cepas Mexicanas de *T. cruzi*, las cuales pertenecen al genotipo I (López-Olmos et al., 1998; Bosseno et al., 2002) dado que se sabe que aunque las cepas sean del mismo genotipo, pueden diferir enormemente en sus características biológicas (Espinoza et al., 1998; López-Olmos et al., 1998). Las cepas utilizadas en este estudio presentan diferencias como el tropismo y su origen ya que una se aisló de un caso humano crónico y la otra se aisló del vector, y sabiendo que ambas pertenecen al genotipo 1, es importante su estudio ya que su comportamiento biológico difiere.

VI.2. SÍNTOMAS FÍSICOS.

A simple vista se observó que los ratones infectados con ambos inóculos de la cepa avirulenta no presentaron síntomas físicos diferentes a los de ratones control sin infectar, sin embargo, los ratones infectados con la cepa virulenta presentaron un notable erizamiento de pelo a los pocos días después de la infección, así como parálisis de los miembros pélvicos antes de morir. La susceptibilidad del hospedero juega un papel muy importante ya que los ratones Balb/c han demostrado ser relativamente susceptibles al parásito (Chen et al., 2001).

Un aspecto que es de gran importancia para poder correlacionar la virulencia de ambas cepas es el tropismo que estas cepas presentan, por ejemplo, se sabe que la cepa avirulenta presenta un tropismo a diferentes órganos, aunque, en ratones BALB/c el tropismo es preferencial hacia músculo esquelético (Monteón et al., 1996), mientras que la cepa virulenta se ha reportado que es cardíaca (Fernández-Presas et al., 2001), lo

cual es de gran importancia para la virulencia, ya que procesos de invasión e inflamación son mucho más graves en órganos como bazo o músculo cardíaco que en músculo esquelético (Salazar-Schettino et al., 1987).

La esplenomegalia que se presentó en los ratones infectados con *T. cruzi* resultó muy evidente y es indicativa de un proceso inflamatorio importante ya que se ha propuesto que el incremento en el tamaño del bazo, es consecuencia tanto de los procesos de reacción inflamatoria, producidos por el incremento en el número de células proinflamatorias principalmente neutrófilos y monocitos (Chen et al., 2001; Abbas y Lichtman, 2001), eosinófilos (Roitt et al., 1989) así como linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y células B las cuales son necesarias para mantener una respuesta inmune efectiva contra el parásito (Sun y Tarleton, 1993). Se observó que los ratones infectados con la cepa virulenta presentaron una esplenomegalia significativamente mayor que los ratones infectados con la cepa avirulenta Fig. 4.

VI.3. PARASITEMIA.

La parasitemia mostró grandes diferencias entre los grupos infectados con estas cepas, observándose que la tendencia en los grupos infectados con la cepa virulenta fue la de presentar parásitos en circulación significativamente más rápido cuando el inóculo fue mayor, mientras que la aparición de parásitos en circulación en los grupos infectados con la cepa avirulenta no presentó diferencias significativas entre inóculos (10 mil y 100mil parásitos).

La cantidad máxima de parásitos fue significativamente mayor en los grupos infectados con la cepa virulenta, lo cual indica que la infectividad en las células blanco debe ser mayor con esta cepa, y esto concuerda con otros resultados *in vitro* obtenidos en el laboratorio, donde la cepa virulenta invade líneas celulares mucho más rápido y presenta más cantidad de amastigotes por célula que la cepa avirulenta, lo cual podría ocasionar que los parásitos de la cepa virulenta se establezcan en órganos blanco con mayor rapidez y en mucho mayor número que los parásitos de la cepa avirulenta, esto concuerda con otros estudios en donde se ha analizado la virulencia de distintas cepas mexicanas de *T. cruzi* y se determinó que las más virulentas son las que se establecen de forma más abundante y más rápida en órganos blanco importantes (Salazar-Schettino et al., 1987).

VI.4. SOBREVIVENCIA.

La sobrevivencia de los grupos infectados con la cepa avirulenta en todos los experimentos con ambos inóculos fue del 100 %, sin embargo, ninguno de los grupos infectados con la cepa virulenta pudo alcanzar la fase crónica de la infección ya que en estos se presentó un 100 % de mortalidad. Por trabajos realizados en el laboratorio se ha observado que la cepa virulenta presenta una mayor capacidad para invadir líneas celulares que la cepa avirulenta, esta habilidad puede ser un paso crítico en el establecimiento de la infección y en el curso de ésta. Además la invasión de células por parte de los tripomastigotes metacíclicos se ha sugerido que puede estar determinada por la expresión de algunas glicoproteínas de superficie, como la glicoproteína gp90 que se expresa diferencialmente dependiendo de la cepa de *T. cruzi* y la habilidad del parásito para invadir células blanco está inversamente correlacionado con la expresión de esta proteína. La gp90 se une a un receptor en las células del hospedero que puede mediar la activación de la señalización del flujo de calcio, el cual se requiere para que *T. cruzi* penetre a los diferentes tipos celulares y se ha observado que la inhibición en la síntesis de gp90 del parásito afecta la capacidad de las formas metacíclicas para penetrar a las células (Málaga y Yoshida, 2001). Por otra parte la glicoproteína gp82 también induce significativamente la movilización de calcio por lo que al igual que la gp90 se encuentra relacionada con la invasividad del parásito a las células (Ruiz et al., 1998). Por lo tanto proteínas como estas que se expresan diferencialmente en cada cepa de *T. cruzi* podrían estar ejerciendo un papel importante en la potencialidad la invasión del parásito y por consiguiente afectar la habilidad del huésped para controlar la parasitemia, la supervivencia y la activación de ciertos tipos celulares en los hospederos expuestos a estas cepas. En nuestro caso sería de interés evaluar la presencia de estas proteínas en las cepas estudiadas.

VI.5. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO.

Se observó durante la fase aguda que cuando se estimuló con antígeno de epimastigotes las células de bazo de los ratones infectados con ambos inóculos tanto de la cepa avirulenta como de la cepa virulenta presentaron un índice de estimulación significativamente mayor con respecto a los grupos control sin infectar, y este incremento fue mayor en el grupo infectado con la cepa avirulenta.

Con estos resultados se demostró que durante la fase aguda se llevó a cabo una respuesta proliferativa en los grupos infectados con ambas cepas, la cual fue mayor en las células de bazo que procedían de los

ratones infectados con la cepa avirulenta, diferencia que resulta favorable en la sobrevivencia de estos ratones, ya que sí se produce mayor cantidad de linfocitos estos pueden controlar de una mejor manera la multiplicación del parásito (Tarleton et al., 1994), y con esto atenuar la presencia de los síntomas físicos, aumentando la sobrevivencia de los ratones. En la fase crónica, la cual fue alcanzada solamente por los ratones infectados con la cepa avirulenta, la proliferación de células de bazo no presentó diferencias significativas con respecto a los grupos control sin infectar, lo cual podría explicarse por la ausencia del parásito en circulación, otras causas que explican esta situación han sido reportadas por varios autores. De acuerdo a Monteón et al., 1996, hay una escasa presencia en los tejidos de ratones BALB/c por lo cual se sugiere que la producción de linfocitos es baja en esta fase, además, otros tipos celulares podrían estar ejerciendo un papel importante durante este periodo, como por ejemplo células plasmáticas que se ha reportado producen una alta cantidad de Inmunoglobulinas de diferente clase (Caballero, 1996) y también se ha descrito que para ratones Balb/c infectados con la cepa Tuláhuen, tipos celulares como neutrófilos y macrófagos presentan un rol importante en el control de *T. cruzi* en esta fase (Caulada-Benedetti et al., 1998; Rodrigues et al., 2000; Chen et al., 2001) por tanto, sería de gran utilidad determinar el papel de estas células durante la infección con las cepas utilizadas en este estudio, cabe mencionar que estos resultados difieren de otros trabajos en donde se ha reportado que en la infección experimental con la cepa sudamericana Y de *T. cruzi*, existe una inmunosupresión en la estimulación de linfocitos T empleando antígeno de la fase de tripomastigotes (Pinge-Filho et al. 1999). Mientras que los resultados de este trabajo se obtuvieron utilizando antígenos de epimastigotes, aunque en primera instancia se intentó estimular a las células de bazo de los ratones infectados con antígeno de tripomastigotes, lo cual no se consiguió ya que el antígeno obtenido en el laboratorio nunca se purificó totalmente con la fase infectiva del parásito, por lo que siempre se mantuvo contaminado con algún porcentaje de células Vero las cuales sirvieron para mantener el cultivo de tripomastigotes y se observó que las células Vero (Células de riñón de mono verde africano) son muy eficientes en estimular y hacer proliferar a células de bazo (Datos no mostrados). Por lo cual, no se pudo determinar si la estimulación observada con este antígeno se debió a antígenos del parásito o de las células Vero. Sería de gran utilidad poder obtener antígenos puros del parásito en su fase de tripomastigote y repetir los experimentos, ya que esto aportaría resultados mucho más cercanos a los que pasan en una infección natural.

Tanto en la fase aguda como en la crónica cuando se utilizó concanavalina A para estimular a las células, se observó que los índices de estimulación de los grupos experimentales, no presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos control sin infectar e incluso en algunos casos se observó una inmunosupresión en la producción de linfocitos, esto podría ser debido principalmente a que la concanavalina A es un estimulante no específico por lo cual estimuló clones de linfocitos en general de los ratones infectados, como células no activadas procedentes de los ratones control sin infectar.

VI.6. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETERMINAR LINFOCITOS CD4⁺ CD8⁺.

La citometría de flujo demostró que las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de los ratones infectados tanto con la cepa virulenta como con la virulenta sufrieron variaciones importantes. Durante la fase aguda en los ratones infectados con la cepa virulenta no se presentaron modificaciones en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ con respecto al control, en cambio el porcentaje de linfocitos CD4⁺ disminuyó con respecto al de los ratones control, estos datos tomados en conjunto indican una falta de estimulación de células CD8⁺ y una inmunosupresión de linfocitos CD4⁺ lo que indica que estos últimos no están siendo generados para proveer una protección importante durante la fase aguda.

En cuanto a los ratones infectados con la cepa avirulenta el porcentaje de linfocitos CD8⁺ presentes durante la fase aguda mantuvo una tendencia de incremento que se prolongó hasta la fase crónica en donde se volvió estadísticamente significativa, sin embargo, también durante la fase aguda se observó una reducción significativa de linfocitos CD4⁺, los cuales recuperaron sus niveles normales en la fase crónica. La disminución en los porcentajes de linfocitos CD4⁺ ya ha sido reportada durante la infección con la clona de *T. cruzi* Dm28c (Lopes et al., 1995), lo cual resultaría en una mayor susceptibilidad en los ratones. En este trabajo, esta diferencia no es tan relevante dado que se presentó con ambas cepas. En éste modelo se observó que el incremento en linfocitos CD8⁺ es importante ya que intervienen en la reducción de la parasitemia y la mortalidad de los ratones por vías como la secreción de citocinas importantes para la regulación de la infección como INF- γ , TNF- α e IL-10 (Tarleton, 1990; Paiva et al., 1999). Aunque el incremento significativo en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ durante la fase crónica de la infección podría presentar problemas principalmente de autoinmunidad por parte de linfocitos CD8⁺ autoreactivos (Engman y Leon, 2001), esto no se determinó en este trabajo. Además sería de gran importancia poder analizar estos tipos celulares no solamente en el día 15 para

los ratones infectados con la cepa virulenta y al día 21 y 98 para los ratones infectados con la cepa avirulenta, sino tomar más puntos, principalmente en los ratones infectados con la cepa virulenta y que estos puntos estén mucho más cercanos a los días de la muerte para determinar que sucede con estas poblaciones de linfocitos cuando la muerte de los ratones esta muy próxima. Otro punto que debería analizarse es determinar si los linfocitos que se están produciendo y que se analizaron son Th1 o Th2 específicos resultados que aportarían más elementos para evaluar las diferencias presentes en el modelo.

V.7. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETERMINAR CÉLULAS NK DURANTE LA FASE AGUDA.

El comportamiento de las células NK analizado mediante citometría de flujo durante los primeros días de la infección 0, 1, 3, 5, 7, 9 y 11 indicó que durante los días 0, 1 y 3, no se presentaron diferencias en los grupos de ratones infectados con la cepa avirulenta, la virulenta con el control. Si embargo, en el día 5 p.i. los grupos de ratones infectados con ambas cepas presentaron un incremento con respecto al control, y el día 9 se encontró que el grupo infectado con la cepa virulenta tuvo un incremento significativo con respecto a los grupos control e infectado con la cepa avirulenta. Puesto que se ha reportado que las células NK son una de las principales fuentes de INF- γ y que estas brindan una protección durante las primeras fases de la infección con *T. cruzi* (Cardillo et al., 1996; Scharton-Kemster y Sher, 1997; Raulet et al., 2001), resulta incierto el papel que estas células juegan en los ratones infectados con la cepa virulenta en este trabajo, debido a que las células NK son las principales productoras de INF- γ , lo cual podría exacerbar la respuesta inflamatoria en el bazo de estos ratones, ya que la secreción de INF- γ contribuye a producir reacciones inflamatorias en los tejidos y resulta en la exacerbación de infiltrados inflamatorios, lo que podría explicar la esplenomegalia en el bazo de los ratones infectados con la cepa virulenta, además la activación de macrófagos por INF- γ resulta en la descarga de productos inflamatorios que aumentan la respuesta inflamatoria en el bazo (Antúñez y Cardoni, 2000). Debido a los resultados obtenidos en este trabajo sería de gran importancia seguir con esta línea de investigación, contemplando un mayor número de cepas mexicanas de *T. cruzi* determinando la participación y posibles funciones de otros tipos celulares no abordados en este trabajo y añadiendo nuevas variables que resultarían en una mejor comprensión de la infección con *T. cruzi*.

VII. CONCLUSIONES.

- Se pudo confirmar sistemáticamente el comportamiento de ambas cepas en la infección a ratones Balb/c y por lo tanto sabemos que una de las cepas se comporta como avirulenta mientras que la otra cepa es virulenta.

- Se determinó la carga parasitaria y se observó que la cepa virulenta induce parasitemias más altas que la cepa avirulenta y que la parasitemia en los ratones está determinada por la cantidad de parásitos inoculados, más no así la mortalidad.

- Durante la fase aguda de la infección los índices de estimulación obtenidos para las células de bazo de los ratones infectados con ambas cepas presentaron en general una proliferación mayor que las células de bazo de los ratones control sin infectar, proliferaciones que fueron mayores en los grupos infectados con la cepa avirulenta, lo cual parece ser una ventaja para la sobrevivencia.

- Durante la fase crónica de la infección la cual fue alcanzada solamente por los ratones infectados con la cepa avirulenta, los índices de estimulación obtenidos de estos ratones presentaron proliferaciones similares a la de los ratones control sin infectar, lo que indica que durante esta fase no se están produciendo cantidades importantes de células de bazo debido principalmente a la ausencia del parásito en la circulación.

- Los ratones infectados con la cepa virulenta no presentaron modificaciones en el porcentaje de linfocitos CD8⁺, en cambio el porcentaje de linfocitos CD4⁺ en comparación fue menor respecto al de los ratones control sin infectar, por lo que los linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ no están siendo generados en cantidades importantes como para brindar una protección importante durante la fase aguda.

- En cuanto a los ratones infectados con la cepa avirulenta el porcentaje de linfocitos CD8⁺ mantuvo una tendencia de incremento desde la fase aguda hasta la fase crónica en donde se volvió estadísticamente significativa, mientras que se observó una reducción significativa en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ durante la fase aguda, los cuales recuperaron sus niveles normales en la fase crónica, por lo tanto en este modelo los linfocitos CD8⁺ son muy importantes en la defensa contra *T. cruzi*.

- El porcentaje de células NK durante los primeros días de la infección, en los ratones infectados con ambas cepas se incrementó respecto al control al día 5 p.i. además los ratones infectados con la cepa virulenta presentaron un incremento significativamente mayor que el control y el grupo infectado con la cepa avirulenta al día 9 p.i., lo que podría producir altos niveles de INF- γ y mantener una respuesta inflamatoria importante en el bazo de los ratones infectados con la cepa virulenta.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas A.K. and Lichtman A.H. 2001. *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw Hill. México. 552 pp.
- Acosta A.M. and Santos-Buch C.A. 1985 Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation*. 71 : 1255-1261.
- Aliberti J.C., Cardoso M.A., Martins G.A., Gazzinelli R.T., Vieira L.Q. and Silva J.S. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. and Immunity*. 64 : 1961-1967.
- Andrade S.G., 1985 Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18 : 39-46.
- Andrade S.G., Rassl A., Magalhaes J.B., Ferriolli Filho F. and Luquetti A.O. 1992. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86 : 624-626.
- Andrade Z.A. 1999. Immunopathology of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94 : 71-80.
- Antúnez M.I. and Cardoni R.L. 2000. IL-12 and INF- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol. letters*. 71 : 103-109.
- Barten R. and Trowsdale J. 1999. The human Ly-49L gene. *Immunogen*. 49 : 731-734.
- Beltz L.A., Sonnenfeld G. and Kierszenbaum F. 1989. Inhibition by *Trypanosoma cruzi* of Interferon-gamma production by mitogen-stimulated mouse spleen cells. *Int. J. Parasitol.* 19 : 555-559.
- Bice D.E. and Zeledon R. 1970. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.* 56 : 663-670.
- Biron C.A. and Brossay L. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 13 : 458-464.
- Biron C.A. and Byron K.S. 1989. Severe Herpes Virus infections in an adolescent without natural killer cells. *New. England. J. Med.* 320 : 1731-1735

- Biron C.A., Nguyen K.B., Plén G.C., Cousens L.P. and Salazar-Mather T.P. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17 : 189-220.
- Bosseno M.F., Barnabe C., Magallon-Gastelum E., Lozano Kasten F., Ramsey J., Espinoza B. and Breniere S.F. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 40 : 627-32.
- Brener Z. 1985. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18 : 1-8.
- Brisse S., Dujardin J.C. and Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111 :95-105.
- Bustamante J.M., Rivarola H.W., Fernández A.R., Enders J.E., Fretes R., Palma J.A. and Pagliani-Oliva P.A. 2002. *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. *Int. J. Par.* 32 : 889-896.
- Caballero M.L. 1996. Respuesta inmune humoral de *Trypanosoma cruzi* en modelo murino. Tesis Prof. Facultad de Ciencias, UNAM. 96 pp.
- Cardillo F., Voltarelli J.C., Reed S.G. and Silva J.S. 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma Interferon and Interleukin 10: role of NK cells. *Infect. Immunol.* 64 : 128-134.
- Carrasco R.E. 2000. Estandarización y Evaluación del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la detección de antígenos circulantes de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Facultad de Ciencias, UNAM. 91 pp
- Carneiro M, Romanha A.J. and Chiari E. 1991. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86 : 387-397.
- Caulada-Benedetti Z., Vecchio L.C., Pardi C.A., Massironi M.G., D'Império Lima M.R. and Abrahamsohn I.A. 1998. Activation of CD4⁺ and CD8⁺ parasite-specific T-cells by macrophages Infected with live *T. cruzi* amastigotes. *Immunol. Letters.* 63 : 97-105.
- Celentano A., Stella M. and González C. 1993. *In vivo* macrophage function In experimental infection with *T. cruzi* subpopulations. *Acta Tropica.* 55 : 171-178.

- Chen L., Watanabe T., Watanabe H. and Sendo F. 2001. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *Eur. J. Immunol.* 31 : 265-275.
- Collgan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W. 2000. Current protocols in immunology. John Wiley and Sons, Inc. Someersset New Jersey 920 pp.
- Cordeiro da Silva A., Espinoza A G., Taibi A., Ouassli A. and Minoprio P. 1998. A 24 000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is B-cell activator. *Immunol.* 94 : 189-196.
- Coura J. R. and de Castro S.L. 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 97 : 3-24,
- de Diego J.A., Penin P., del Rey J., Mayer R. and Gamallo C. A 1991. Comparative pathological study of three strains of *Trypanosoma cruzi* in an experimental model. *Histol. Histopathol.* 6 : 199-206.
- Dietrich P., Dussan M del P., Floeter-Winter L.M., Alfonso M.H., Camargo E.P. and Soares M.B. 1990. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorthini*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42 : 13-19.
- DosReis G.A. 1997. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Today.* 13 : 335-342.
- Dumontel E. 1999. Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública. Mex.* 41 : 322-327.
- Dusanic G. D. 1991. *Trypanosoma cruzi (Schistotrypanum cruzi)* In Parasitic Protozoa Academic Press. London. Vol 1. p 137-194.
- Engman D.M. and Leon J.S. 2001. Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int. J. Parasitol.* 31 : 555 561.
- Espinoza B., Vera-Cruz J.M., González H., Ortega E. and Hernández R. 1998. Genotype and virulence correlation within mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica.* 70 : 63-72.
- Fernández A.R., Enders J.E., Rivarola H.W., Paglini P.A. and Palma J.A., 1996. Cardiac β receptors density or affinity modified by different *Trypanosoma cruzi* amount. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 47 : 137-143.

- Fernández-Presas A.M., Tay J.Z., Becker I.F., Merchant M.T., Robert L.G. and Willms K. 2001. Ultrastructural damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes exposed to de complemented immune sera. *Parasitol. Res.* 87 : 619-625.
- Ferreira M.S., Nishioka A., Silvestre M.T., Borges A.S., Nunes-Araujo F.R. and Rocha A. 1997. Reactivation of Chagas' disease In patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 25 : 1397-400.
- Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez-Villar J.J., Lopez-Botet M., Duggan-Ken M. and Stern P.L. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol. Today.* 18 : 89-95.
- Gomes N.G., Perelra F.E., Domínguez G.C. and Alves J.R. 1994. Effects of severe protein restriction in levels of parasitemia and in mortality of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27 : 19-24.
- Goncalves da Costa S.C. 1999. Mouse as a model for Chagas disease: does mouse represent a good model for Chagas disease? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94 : 269-272.
- Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R. and Ferguson T.A. 1995. Fas ligand-induces apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 270 : 1189-1192.
- Grisotto M.G., D'Imperio-Ulma M.R., Marinho C.R.F., Tadokoro C.E., Abrahamsohn I.A. and Alvarez J.M. 2001. Most parasite-specific CD8⁺ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor- $\alpha\beta$ and CD8 molecules. *Immunol.* 102 : 209-217.
- Guzmán-Bracho C. 2001. Epidemiology of Chagas disease In Mexico: an update. *TRENDS In Parasitol.* 17 : 372-376.
- Guzmán-Marín S., Zavala-Castro J., Acosta-Viana K. and Rosado-Barrera M. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Biomed.* 10 : 177-184.
- Hays W.L. 1998. STATISTICS The Dryden Press. New York. 1102 pp.
- Hernández R., Herrera J., Bosseno M.F., Brenière S.F. and Espinoza B. 2001. *Trypanosma cruzi*. Data supporting donality in mexican stocks. *J. Parasitol.* 87 : 1178-1181.
- Hernández-Becerril N., Nava A., Reyes P.A. and Monteón V.M. 2001. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Arch. Cardiol. Mex.* 71 : 199-205.
- Hoft D.F., Schnapp A.R., Eickhoff and Roodman S.T. 2000. Involvement of CD4⁺ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. and Immunity.* 68 : 197-204.

- Kane K.P. 1994. Ly-49 mediates EL4 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* 179 : 1011-1015.
- Kierszenbaum F. 1986. Autoimmunity in Chagas disease. *J. Parasitol.* 72 : 201-211.
- Kudo C., Yamashita T., Araki A., Terashita M., Watanabe T., Atsumi M., Tamura M. and Sendo, F. 1993. Modulation of *In vivo* immune response by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody, RP-3.1 Inhibition by RP-3 treatment of the priming and effector phases of delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in rats. *J. Immunol.* 150: 3728-3738.
- Lammel E.L., Muller L.A., Isola L.D., González-Cappa S.M. 1985. Effect of vector on infectivity of *T. cruzi*. *Acta Tropica.* 42 : 149-155.
- Leedale, G.F. and K. Vickerman. 2000. Phylum Euglenozoa. En: Lee, J.J., G.F. Leedale and P.C. Bradbury. And Illustrated guide to the protozoa. Organisms traditionally referred to as protozoa, or newly discovered groups. Society of Protozoologists, Lawrence. 1432 pp.
- Lopes M.F., da Velga V.F., Santos A.R., Fonseca M.F. and DosReis G.A. 1995. Activation induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. *J. Immunol.* 154 : 744-752.
- López-Olmos V., Pérez-Nasser N., Piñero D., Ortega E., Hernández R. and Espinoza B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* 69 : 239-254.
- Luciana B., Hinds A., Previato L.M., Previato J.O., Vos Q., Mond J.J. and Peçanha L.M.T. 1999. Modulation of B-lymphocyte and NK cell activities by glycoinositolphospholipid purified from *Trypanosoma cruzi*. *Infect. and Immunity.* 67 : 6177-6180.
- Magalhaes J.B., Andrade S.G. and Sherlock Y. 1996. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (biological and biochemical patterns). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 38 : 23-28.
- Málaga S. and Yoshida N. 2001. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increased parasite infection. *Infect. and Immunity.* 69 : 353-359.
- Martínez-Díaz R.A., Escario J.A., Nogal-Ruiz J.J. and Gomez-Barrio A. 2001. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96 : 53-59

- Miles M.A., Toyé P.J., Oswald S.C. and Godfrey D.G., 1977. The identification by isozyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71 : 217-225.
- Miles M.A., Cedillos R.A., Pova M.M., Souza A.A., de Prata A. and Macedo V. 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian form Chagas' disease. *Lancet*. 1 : 1338-1340.
- Monteón V.M., Furuzawa-Carballeda J., Alejandro-Aguilar R., Aranda-Fraustro A. and Rosales-Endnas J.L., Reyes P.A. 1996. American trypanosomiasis: In situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp. Parasitology*. 83 : 267-274.
- Monteón V.M., Ramos A. and Reyes P.A. 1993 Reactivity of sera from Chagas patients to extracts of Mexican *Trypanosoma cruzi* isolates. *Rev. Biol. Trop.* 41 : 861-865.
- Moore K.W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P. and Mosmann T.R. 1993. Interleukin-10. *Annu Rev. Immunol.* 11 : 165-190
- Morel C., Chiari E., Camargo E.P., Mattel D.M., Romanha A.J. and Simpson L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 : 6810-6814.
- Mortatti R.C., Fonseca L.S., Coelho J., Oliveira A. and Moreno M. 1992. Follow-up of patent and subpatent parasitemias and development of muscular lesions in mice inoculated with very small numbers of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 75 : 233-239.
- Müller U., Kölller G., Mossmann H., Schaub G.A., Albert G., Di Santo J.P., Brombacher F. and Höltscher C. 2001. IL-12-Independent IFN- γ production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J. Immunol.* 167 : 3346-3353.
- Nickell S.P. and Sharma D. 2000. *Trypanosoma cruzi* : roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. *Exp. Parasitol.* 94 : 207-216.
- Paiva C.N., Castelo-Branco T.L., Lannes-Vieira J. and Gattas C.R. 1999. *Trypanosoma cruzi*: protective response of vaccinated mice is mediated by CD8⁺ cells, prevents signs of polyclonal T lymphocyte activation, and allows restoration of a resting immune state after challenge. *Exp. Parasitol.* 91 : 7-19.

- Pedrosa M.L., Nicoll J.R., Silva M.E., Vieira L.Q., Bambilra E.A. and Vieira E.C. 1993. The effect of Iron nutritional status on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 106 : 813-21.
- Pinge-Filho P., Tadokoro C.E. and Abrahamsohn I.A. 1999. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell. Immunol.* 193 : 90-98.
- Rangel-Flores H., Sánchez B., Mendoza-Duarte J., Bamabé C., Brenière S.F., Ramos C. and Espinoza B. 2001. Serological and parasitological demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban central area of Mexico: Correlation with electrocardiographic alterations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65 : 887-895.
- Rassi A. Jr., Rassi A., William C. and Little. 2000. Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol.* 23 : 883-889.
- Raulet D.H., Vance R.E. and McMahon C.W. 2001. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 19 : 291-330.
- Reed S.G. 1988. *In vivo* administration of recombinant INF- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immunosuppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 140 : 4342-4347.
- Reed S.G., Brownell C.E., Russo D.M., Silva J.S., Grabstein K.H. and Morrissey P.J. 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 153 : 3135-3140.
- Rodrigues M., Riberão M. and Boscardin S. 2000. CD4⁺ Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol. Letters.* 73 : 43-50.
- Roitt I., Brostoff J., and Male D. 1989. Immunology. Gower Medical Pubs, New York. 423 pp.
- Romero C.R. 1993 Bases biológicas de las Enfermedades Infecciosas. Panamericana, México. P 543-549.
- Rottenberg M., Cardoni R.L., Andersson R., Segura E.L. and Orn A. 1988. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol.* 28 : 573-82.
- Ruiz R.C., Favoreto S., Dorta M.L., Oshiro E.M., Ferreira A.T., Manque P.M. and Yoshida N. 1998. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem. J.* 330 : 505-511.

- Salazar-Schettino P.M., Haro I., Tay J., Buclo M.I. and Robert L. 1987. Estudio de la virulencia de cepas de *Trypanosoma cruzi* en el ratón blanco. *Rev. Mex. Patol. Clinica.* 34 : 105-109.
- Scharton-Kersten T.M. and Sher A. 1997. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr. Opin. Immunol.* 9 : 44-51.
- Smith H.R.C., Karhofer F.M. and Yokoyama W.M. 1994. Ly49 multigene family expressed by IL-2 activated NK cells. *J. Immunol.* 153 : 1068-1079.
- Souto R.P., Fernandes O., Macedo A.M., Campbell D.A. and Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20 : 141-52.
- Stoneman E.R., M. Bennett J., An K.A., Chesnut E.K., Wakeland J.B., Scheerer M.J., Siciliano V., Kumar and P.A. Mathew. 1995. Cloning and characterization of SE6 (Ly-49c), a receptor molecule expressed on a subset of murine natural killer cells. *J. Exp. Med.* 182 : 305-313.
- Suckow M A., Welchbrod RH. and Douglas FA. 2001. Management of Laboratory Animals Care and Use Programs. CRC Press. Washington D.C. 147 pp.
- Sun J. and Tarleton R.L. 1993. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Med. Hyg.* 48 : 161-169.
- Tarleton R.L. 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 144 : 717-724.
- Tarleton R.L., Sun J., Zhang L. and Postan M. 1994. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect. and Immunity.* 62 : 1820-1829.
- Thomson S., Kuhn K.A., Finkelman F.D. and Hirsch R. 2001. NK cells secrete high levels of IFN- γ in response to *in vivo* administration of IL-2. *Eur. J. Immunol.* 31 : 3355-3360.
- Tomlinson S. and Raper J. 1998. Natural immunity to Trypanosomes. *Parasitol. Today.* 14 : 354-359.
- Tortorella D., Gewurz B.E., Furman M.H., Schust D.J. and Ploegh H.L. 2000. Viral subversion of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 18 : 861-926
- Tyler K.M. and Engman D.M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 31 : 472-481.

- Umekita L.F. and Mota I. 2000. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? Antibody and *T. cruzi* susceptible mice. *Braz. J. of Med. and Biol. Res.* 33: 253-258
- Une C., Andersson J., Eloranta M.L., Sunnemark D., Harris R.A. and Örn A. 2000. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived Interferon-gamma (IFN- γ) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Exp. Immunol.* 121 : 499-505.
- Vago A.R., Andrade L.O. and Leite A.A. 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissue of patients with chronic Chagas disease. Differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* 156 : 1805-1809.
- WHO-World Health Organ Tech. Rep. Ser. 1991. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report.
- WHO-World Health Organization 1997. Chagas disease. Thirteenth Programme Report UNDP/TDR, Geneva.
- Zavala-Castro J.E., Velazco-Castrejón O. and Hernández R. 1992. Molecular characterization of mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47 : 201-209.
- Zuñiga E., Motran C.C., Montes C.L., Díaz F.L., Bocco J.L. and Gruppi A. 2000. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide arrest their proliferation during acute infection. *Clin. Exp. Immunol.* 119 : 507.
- Zuñiga E., Motran C.C., Montes C.L., Yagita H. and Gruppi A. 2002. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. *J. Immunol.* 168 : 3965-3973.

APÉNDICE I.

PREPARACIÓN DE MEDIOS. (Carrasco 2000).

MEDIO RPMI 1640.

Disolver un sobre de RPMI de 13.4 grs. en 900ml de H₂O desionizada bidestilada y adicionar 3.7 grs. por litro de NaCO₃ y ajustar el pH entre 7.1 y 7.3 con NaOH o HCl. Después se esteriliza por filtración al vacío con membrana de 0.22µm Vaciar el medio estéril en botellas de vidrio y dejar 48 hrs como prueba de esterilidad a 37° C. Si durante la prueba de esterilidad el medio continúa siendo transparente (completamente) y de color rojo proceder a complementar, agregando lo siguiente:

CANTIDAD PARA 1 LITRO DE MEDIO.

L-glutamina 100 grs. Cat. No. 810-10511M	al 1%	10ml.
Aminoácidos no esenciales 10mN 100X Cat. No. 11140-019	al 1%	10ml.
Piruvato 100mM Cat. No. S-8636	al 1%	10ml.
Vitaminas 100X Cat. No. 11120-052	al 1%	10ml.
Antibióticos 100X Cat. No. 15240-062	al 1%	10ml.

Volver a filtrar de la misma manera en que se hizo la primera vez, entonces agregar directamente la cantidad de suero fetal bovino deseada de acuerdo al % que se desee, si es al 5% hay que adicionar 25ml/500ml de suero, si es al 10% agregar el doble. Los aminoácidos, vitaminas y piruvato ya vienen listos para usar. Para preparar los antibióticos y L-glutamina seguir los procedimientos abajo descritos.

L-GLUTAMINA.

Para preparar 100ml de L-glutamina pesar 2.92grs y disolver en PBS 1X. Esterilizar con membrana de 0.22µm y conservar en tubos de 50 ml o frascos de 150 ml procurando no llenar hasta el tope y congelar si no se van a usar de inmediato.

MEDIO D-MEM (Gibco).

Disolver un sobre de D-MEM (Gibco Cat. No. 12100-038) alto en glucosa en 900 ml de H₂O desionizada y destilada y adicionar 3.7 g de NaCO₃ por litro y ajustar el pH entre 7.1 y 7.3 con NaOH o HCl. Una vez ajustado el pH aforar a 1 lt.

Esterilizar por filtración al vacío con membrana de 0.22µm Vaciar el medio estéril en botellas de vidrio con tapón de baquelita (estéril y seco), y dejar 2 días a 37°C como prueba de esterilidad. Si durante la prueba de esterilidad el medio continua siendo transparente (completamente) y de color rojo proceder a complementar como se indicó para RPMI (Carrasco, 2000).

APÉNDICE II.

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO.

- * Se remueve el bazo de los ratones a utilizar.
- * Los bazos se lavan en cajas de petri falcon de 60 x 15 mm con RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, NaCO₃, glutamina, piruvato, vitaminas, aminoácidos no esenciales y antibióticos (Apéndice I).
- * Los bazos se disgregan con pinzas quitando la membrana principal.
- * Posteriormente, se colecta el homogenizado con pipetas tratando de no llevarse los fragmentos grandes de membranas.
 - * Las células se colocan en tubos falcon de 15 ml estériles, se deja reposar por 20 min. en hielo para que las partículas de tejido se depositen, entonces se obtiene el sobrenadante que contienen las células y se centrifuga a 250 gs durante 10 minutos.
 - * El sobrenadante se desecha y al paquete celular se le agregan de 2 a 3 ml de solución de lisis ACK (ver más adelante). Se deja actuar durante 3 minutos a 4°C con agitación suave.
 - * Posteriormente se agregan 5 volúmenes de RPMI, la muestra se centrifuga durante 10 minutos a 250 gs., y se descarta el sobrenadante.
 - * El paquete celular se resuspende en 5 ml de RPMI y se cuenta el número de células en hemocitómetro con dilución de 1:100, posteriormente se ajusta el número de células a utilizar y se resuspenden en 100µl.
 - * Se colocan en placas Costar de 96 pozos de baja evaporación (Corning Incorporated No. Cat. 3595), sin utilizar los pozos exteriores.
 - * Se estimula con concanavalina A con una concentración de 1 µg por ml, también se estimula con un extracto antigénico total de epimastigotes a una concentración de 20 µg por ml.
 - * Posteriormente, las placas se colocan en incubadora a 37° C. con 5% de CO₂ y 90% de humedad, durante 48 horas.
 - * Después las células se marcan con 1 µCi de timidina ³H (NEN™ Life Science Products Inc. No. Cat. NET027E) por pozo, diluida en 9µl de RPMI.

* Las células se mantienen en incubadora durante 20 horas. Posteriormente las células se cosechan en membranas de fibra de vidrio para Beta plate-1205 de 102 x 258 mm. (Wallac Oy No. Cat. 719658/411000) con un cosechador automático Skatron Instruments, Norway.

* Una vez cosechadas las células las membranas se dejan secar con ayuda de una lámpara a 40 cm de distancia por aproximadamente 40 minutos.

* Las membranas se colocan en bolsas para membrana (Wallac Oy No. Cat. 722473) y se les agrega 10 ml. de líquido de centelleo el cual generalmente es benceno (C₆H₆) o una mezcla de benceno y tolueno (C₆H₆CH₃).

* Posteriormente las bolsas se sellan por calor con un sellador de bolsas y se colocan en casetes del Beta-plate y se leen en un detector de centelleo líquido Beta-plate 1205 (Wallac).

* Se obtiene el índice de estimulación, el cual se obtiene dividiendo las cuentas por minuto de los grupos experimentales entre las cuentas por minuto de los grupos control (Colligan et al., 2000).

Preparación de Buffer de Lisis (ACK).

NH ₄ Cl	8.29 grs.
KHCO ₃	1 g.
Na ₂ EDTA	37.2 mg.

Se agregan a los reactivos 800 ml de agua destilada en un matraz aforado de 1 Lt, una vez disueltos se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1 Normal y se afora a 1 Lt con agua destilada.

Se pasa a través de un filtro estéril y con membrana de 0.22µm y se almacena a temperatura ambiente (Colligan et al., 2000).

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE III.

DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ POR CITOMETRIA DE FLUJO.

- * Se remueve el bazo de los ratones a utilizar.
- * Los bazos se lavan en cajas de petri (falcon) de 60 x 15 mm con RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, NaCO₃, glutamina, piruvato, vitaminas, aminoácidos no esenciales y antibióticos (Apéndice I).
- * Los bazos se disgregan con pinzas quitando la membrana principal.
- * Posteriormente, se colecta el homogenizado con pipetas tratando de no llevarse los fragmentos grandes de membranas.
- * Las células se colocan en tubos falcon de 15 ml estériles, se deja reposar por 20 min. en hielo para que las partículas de tejido se depositen, se obtiene el sobrenadante que contiene las células y se centrifuga a 250 gs durante 10 min.
- * El sobrenadante se desecha y al paquete celular se le agregan de 2 a 3 ml de solución de lisis (ACK). Se deja actuar durante 3 min. a 4°C con agitación suave.
- * Posteriormente se agregan 5 volúmenes de RPMI, la muestra se centrifuga durante 10 min. a 250 gs., y se descarta el sobrenadante.
- * El paquete celular se resuspende en 5 ml de RPMI y se cuenta el número de células en hemocitómetro con dilución de 1:100 posteriormente se ajusta el número de células a 1 millón por ml. con medio de cultivo.
- * Se coloca 1ml de la suspensión en tubos cónicos de 15 ml 12x 75, se necesita un tubo por cada anticuerpo más el control de isotipo, si se van a marcar simultáneamente con 2 o más anticuerpos utilizar un tubo por cada combinación de anticuerpos.
- * Centrifugar a 250 gs, usar una pipeta para remover el líquido cuidando de no traerse el pellet, (puede dejarse un poquito de sobrenadante, para evitar traerse el pellet).
- * Posteriormente se agrega al pellet 1µg de los anticuerpos anti-CD8+ y anti-CD4+, se utilizan anticuerpos anti-CD8+ de ratón acoplados a ficoeritrina (Pharmingen No. Cat. 553032) y anti-CD4+ de ratón acoplados a fluoresceína (Pharmingen No Cat. 553055), así como sus controles de isotipo anti-IgG2a cadena cappa acoplado a ficoeritrina y anti-IgG2b cadena cappa acoplado a fluoresceína.
- * Mezclar en vortex. Incubar los tubos en hielo por 30 minutos cubriéndolos de la luz.

- * Primer lavado. Agregar 1ml de PBS+azida de sodio y agitar en vortex.
- * Centrifugar durante 5 min. a 250 gs y remover el sobrenadante sin llevarse el pellet.
- * Segundo lavado. Igual que el primer lavado.
- * Centrifugar durante 5 minutos a 250 gs y remover el sobrenadante sin llevarse el pellet.
- * Agregar 1ml de paraformaldehido al 0.05% para posteriormente ser analizadas en un citómetro de flujo FACScan Beckton and Dickinson, se recomienda analizar inmediatamente, pero el marcaje se mantiene hasta por 6 días a 4°C (www.biotech.ufl.edu/~fcd/direct.html).

CELULAS NK.

El marcaje de células NK se llevó a cabo de la misma forma que para las células CD4 y CD8 descrito anteriormente, los anticuerpos utilizados fueron anti-LY-49C CD8+ receptor de las células NK (Pharmingen. Anticuerpo Fluoresceinado anti-ratón LY-49C de 0.2mg No. Cat. 01625B, Isotipo Estándar Fluoresceinado anti-IgG2a 0.1 mg. No. Cat. 03025[®]) (Stoneman et al., 1995).

APÉNDICE IV.

PORCENTAJE DE LINFOCITOS CD4⁺ Y CD8⁺ EN EL BAZO DE RATONES.

Experimento 1, 21 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	11.81	13.67	18.10
% CD4 ⁺	28.18	17.52 *	19.85
Experimento 2, 21 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	11.92	10.03	15.42
% CD4 ⁺	29.53	13.88 *	16.26 *
Experimento 1, 98 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	12.04	27.04 *	11.88
% CD4 ⁺	30.25	37.66	29.13
Experimento 2, 98 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	12.48	28.29 *	27.99 *
% CD4 ⁺	30.57	36.32	30.11
Experimento 3, 98 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	5.13	14.24 *	14.14 *
% CD4 ⁺	16.49	16.83	16.79
Experimento 1, 15 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	16.8	14.2	18.2
% CD4 ⁺	19.9	18.12	16.3
Experimento 2, 15 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	10.19	16.37	10.42
% CD4 ⁺	25.03	20.20	15.68 *
Experimento 3, 15 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	9.05	9.6	7.19
% CD4 ⁺	27.67	12.46 *	13.31 *
Experimento 4, 15 Días p.i.	CONTROLES.	INFECT. 10MIL	INFECT. 100MIL.
% CD8 ⁺	5.93	6.86	4.19
% CD4 ⁺	22.73	17.07	10.68 *

Se analizaron el día 15 p.i. para los ratones infectados con la cepa virulenta y el día 21 y 98 en los ratones infectados con la cepa avirulenta.

* Valor significativo con respecto al control del mismo grupo. ANOVA P < 0.05

APÉNDICE V.

TABLAS DE PARASITEMIAS DE RATONES INFECTADOS CON CEPA AVIRULENTA.

1ER EXP. FECHA	DÍA POSTIN.	PROMEDIO DE PARÁSITOS ± D.S.	INFECT/C
07-Feb-01	0	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
09-Feb-01	2	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
13-Feb-01	6	425 ± 320	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
16-Feb-01	10	980 ± 258	100MIL
		200 ± 122	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
20-Feb-01	13	150,325 ± 99,350	100MIL
		50,375 ± 99,750	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
23-Feb-01	16	280,000 ± 109,544	100MIL
		400,000 ± 141,421	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
27-Feb-01	21	1,133,333 ± 115,470	100MIL
		800,000 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
02-Mar-01	25	1,133,333 ± 115,470	100MIL
		850,000 ± 335,232	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
07-Mar-01	29	1,900,000 ± X	100MIL
		4,100,000 ± X	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
09-Mar-01	31	1,600,000 ± X	100MIL
		1,600,000 ± X	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
13-Mar-01	35	1,600,000 ± X	100MIL
		1,600,000 ± X	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
16-Mar-01	38	400,000 ± X	100MIL
		600,000 ± X	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
21-Mar-01	43	133,333 ± 115,470	100MIL
		400,000 ± 200,000	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
28-Mar-01	50	0 ± 0	100MIL
		133,333 ± 115,470	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
04-Abr-01	57	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
11-Abr-01	64	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
18-Abr-01	71	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
25-Abr-01	78	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
02-May-01	85	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
09-May-01	92	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
15-May-01	98	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL

2DO EXP. FECHA.	DÍA POSTINF.	PROMEDIO DE PARÁSITOS ± DS.	INFECT/C.
29-May-01	0	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
31-May-01	2	1400 ± 289.8	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
04-Jun-01	6	2800 ± 189.7	100MIL
		1166.6 ± 242.2	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
07-Jun-01	9	233333.3 ± 81649.6	100MIL
		1900 ± 219	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
11-Jun-01	13	300000 ± 109544.5	100MIL
		200000 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
14-Jun-01	16	600000 ± 126491.1	100MIL
		433333.3 ± 150554.5	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
19-Jun-01	21	950000 ± 251661.1	100MIL
		800000 ± 346410.1	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
22-Jun-01	24	950000 ± 191485.4	100MIL
		850000 ± 300000	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
26-Jun-01	28	1050000 ± 100000	100MIL
		950000 ± 100000	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
29-Jun-01	31	550000 ± 100000	100MIL
		550000 ± 191485.4	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
03-Jul-01	36	400000 ± 163299.3	100MIL
		400000 ± 163299.3	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
06-Jul-01	39	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
11-Jul-01	44	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
13-Jul-01	46	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
17-Jul-01	50	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
20-Jul-01	53	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
25-Jul-01	58	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
01-Ago-01	65	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
06-Ago-01	72	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
15-Ago-01	79	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
17-Ago-01	81	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
22-Ago-01	86	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
29-Ago-01	93	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL

3ER EXP. FECHA.	DÍA POSTINF.	PROMEDIO DE PARÁSITOS ± DS.	INFECT/C.
08-Nov-01	0	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
12-Nov-01	4	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
15-Nov-01	7	1000 ± 89.4	100MIL
		150 ± 54.7	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
19-Nov-01	11	333333.3 ± 242212	100MIL
		1583.3 ± 263.9	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
22-Nov-01	15	1166666.6 ± 150554.5	100MIL
		633333.3 ± 816492.6	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
26-Nov-01	19	1133333.3 ± 206599.1	100MIL
		800000 ± 252982.2	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
29-Nov-01	22	1200000 ± 219089	100MIL
		933333.3 ± 163299.3	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
03-Dic-01	26	1200000 ± 163299.3	100MIL
		950000 ± 191485.4	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
06-Dic-01	29	750000 ± 191485.4	100MIL
		300000 ± 115470	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
10-Dic-01	33	250000 ± 100000	100MIL
		200000 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
14-Dic-01	37	100000 ± 115470	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
18-Dic-01	41	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
21-Dic-01	44	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
28-Dic-01	51	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
04-Ene-02	58	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
11-Ene-02	65	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
18-Ene-02	72	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
25-Ene-02	79	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
01-Ene-01	86	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
	93	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
	96	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL

Promedio de por lo menos 3 ratones en cada punto.

X Puntos sin desviación estándar por que eran menos de tres individuos.

APÉNDICE VI.

TABLAS DE PARASITEMIAS DE RATONES INFECTADOS CON CEPA VIRULENTA.

1ER EXP. FECHA.	DÍA POSTINF.	PROMEDIO DE PARÁSITOS ± DS.	INFECT/C.
24-Abr-01	0	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
26-Abr-01	2	340 ± 54.77	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
30-Abr-01	7	280000 ± 109544.51	100MIL
		420 ± 109.544	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
03-May-01	10	560000 ± 167332	100MIL
		540 ± 194.93	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
07-May-01	14	1080000 ± 268328.15	100MIL
		600000 ± 163299.31	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
10-May-01	17	1333333.33 ± 305505.04	100MIL
		733333.33 ± 115470.05	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
14-May-01	21	2300000 ± 115470.05	100MIL
		1600000 ± 200000	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
17-May-01	24	3333333.33 ± 288675.13	100MIL
		2333333.33 ± 288675.13	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
21-May-01	28	2666666.6 ± 288675.1	100MIL
		2333333.3 ± 288675.1	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
24-May-01	31	2500000 ± 0	100MIL
		1833333.3 ± 288675.1	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
28-May-01	35	2000000 ± 0	100MIL
		2666666.6 ± 1040833	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
31-May-01	38	600000 ± 0	100MIL
		2000000 ± 865025.4	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
04-Jun-01	42	200000 ± 0	100MIL
		1033333.3 ± 838649.7	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
07-Jun-01	45	0 ± 0	100MIL
		333333.3 ± 416333.2	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
14-Jun-01	52	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
19-Jun-01	57	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL

2DO EXP.FECHA.	DÍA POSTINF.	PROMEDIO DE PARÁSITOS ± DS.	INFECT/C.
07-Ene-02	0	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
09-Ene-02	2	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
11-Ene-02	4	1000 ± 282.84	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
15-Ene-02	8	266666.6 ± 103279.5	100MIL
		460 ± 134.1	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
18-Ene-02	11	723333.3 ± 163299.3	100MIL
		600000 ± 163299.3	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
22-Ene-02	16	1300000 ± 115470.05	100MIL
		1133333.3 ± 305505.04	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
25-Ene-02	19	1400000 ± 163299.3	100MIL
		1100000 ± 258198.8	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
29-Ene-02	23	3000000 ± 588784.05	100MIL
		1800000 ± 200000	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
01-Feb-02	26	4400000 ± 848528.1	100MIL
		2425000 ± 1528343.3	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
04-Feb-02	29	3200000 ± 529150.2	100MIL
		2866666.6 ± 503322.2	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
11-Feb-01	36	1050000 ± 341565	100MIL
		933333.3 ± 230940.1	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
14-Feb-01	39	533333.3 ± 115470	100MIL
		266666.6 ± 115470	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
18-Feb-01	43	200000 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
22-Feb-02	47	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
25-Feb-02	50	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL

3ER EXP.FECHA.	DÍA POSTINF.	PROMEDIO DE PARÁSITOS ± DS.	INFECT./C.
02-May-02	0	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
03-May-02	1	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
06-May-02	4	950 ± 129	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
09-May-02	7	450000 ± 100000	100MIL
		150 ± 57.7	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
13-May-02	11	800000 ± 163299.3	100MIL
		400000 ± 163299.3	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
16-May-02	14	1050000 ± 191485.4	100MIL
		900000 ± 115470	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
21-May-02	19	1350000 ± 191485.4	100MIL
		1050000 ± 191485	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
23-May-02	21	1950000 ± 191485.4	100MIL
		1500000 ± 258198.8	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
27-May-02	25	3050000 ± 191485.4	100MIL
		2350000 ± 443471.1	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
30-May-02	28	4450000 ± 550757	100MIL
		2750000 ± 341565	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
04-Jun-02	33	2600000 ± 529150.2	100MIL
		1650000 ± 251661.1	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
06-Jun-02	35	1400000 ± 365148.3	100MIL
		800000 ± 163299.3	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
10-Jun-02	39	400000 ± 200000	100MIL
		133333.3 ± 115470	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
13-Jun-02	42	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
18-Jun-02	47	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
20-Jun-02	49	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL
24-Jun-02	53	0 ± 0	100MIL
		0 ± 0	10MIL
		0 ± 0	CONTROL

Promedio de por lo menos 3 ratones en cada punto.