



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ALTERACION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR  
EN RATONES INFECTADOS CON Trypanosoma cruzi.

T E S I S

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a :

JOSE LUIS SANCHEZ VARGAS



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.

CLAS TESIS 1978  
ASIG M.C. ~~394~~ 4900  
FECHA \_\_\_\_\_  
PREG \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



Jurado asignado originalmente según el tema.

PRESIDENTE Victoria Valles Sanchez  
VOCAL Rafael Santana Mondragon  
SECRETARIO Librado Ortiz-Ortiz  
1er. SUPLENTE Dolores Lastra Azpilicueta  
2do. SUPLENTE Ezequiel Murillo Garcia



Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomedicas.

Nombre del sustentate: JOSE LUIS SANCHEZ VARGAS

Nombre del asesor del tema: LIBRADO ORTIZ-ORTIZ

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Librado Ortiz-Ortiz por la sugerencia y dirección del presente trabajo. Al Dr. Celso Ramos por su valiosa colaboración y sugerencias y a todos los compañeros del laboratorio por las atenciones recibidas.

Con gratitud y cariño, a mi madre Celita cuyos sacrificios y ánimo me han permitido el alcanzar esta meta.

A mi padre y hermanos por su confianza en mi.

A mis sobrinas Ale y Gaby.

A Gris por recorrer el  
camino conmigo.

Y a todos mis familiares  
y amigos.

"Porque el pasado nos retiene y el futuro nos inquieta,  
el presente se nos escapa"



## I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	6
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	16
DISCUSION	24
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFIA	28

## INTRODUCCION

GENERALIDADES: La respuesta inmune es una característica mostrada por todos los vertebrados, la cual es inducida cuando un agente extraño penetra al organismo (antígeno) y reacciona con receptores específicos de la membrana de las células inmunocompetentes. El sistema reticuloendotelial y particularmente los macrófagos son esenciales en la fase de inducción, en la cual se lleva a cabo una serie de interacciones entre el antígeno y las células inmunocompetentes que causan proliferación de los linfocitos, dando por resultado un aumento de células activadas (efectoras) y comprometidas (memoria) (55).

Para su estudio la respuesta inmune se divide en: respuesta mediada por anticuerpos (inmunidad humoral) y la respuesta mediada por células (inmunidad celular), esta última es también expresada como hipersensibilidad retardada y puede ser transferida de un individuo a otro mediante células linfoides pero no por suero. Ambas respuestas son iniciadas por diferentes tipos de células linfoides, divididas de acuerdo a su origen en células B (derivadas de médula ósea) o células T (derivadas del timo).

Los dos tipos de linfocitos generalmente son células redondas, con escaso citoplasma y heteróneas en algunas

propiedades como son: longevidad, tejido de origen, distribución, capacidad para recircular a través de los diferentes tejidos del organismo y además se pueden distinguir por técnicas inmunológicas especiales.

Respuesta inmune humoral. Los linfocitos B son los precursores de las células formadoras de anticuerpos (34). Estas células bajo el estímulo antigénico son activadas y diferenciadas a células secretoras de anticuerpos. Los antígenos dependientes del timo requieren de la presencia de células T para llevar a cabo la activación de células B. Existen además antígenos capaces de activar a las células B en ausencia de células T, que se denominan antígenos timo independientes y que poseen una estructura que les permite enlazarse en forma multivalente a los receptores inmunoglobulínicos (Ig) localizados sobre la superficie de las células B; característica que no poseen los antígenos que requieren células tímicas para llevar a cabo esta activación.

Respuesta inmune celular. Hay evidencias que la expresión de la inmunidad mediada por células es principalmente dependiente en la interacción entre linfocitos T y fagócitos mononucleares. La respuesta efectora de la inmunidad mediada por células es iniciada por el reconocimiento antigénico y subsecuente activación de linfocitos T específicamente reactivos. La activación induce la producción de varios factores solubles llamados

linfocinas (6), las cuales probablemente generen una fase de amplificación multifactorial envolviendo reclutamiento no específico de linfocitos y monocitos circulantes. Finalmente, el proceso alcanza el nivel de inflamación alérgica la cual presumiblemente es mediada principalmente por sustancias inflamatorias derivadas de macrófagos, atraídos y activados localmente durante los pasos precedentes de la reacción.

Este mecanismo se piensa está involucrado en vertebrados, como parte de un sistema homeostático, el cual provee resistencia a infecciones con bacterias facultativas intracelulares, hongos y virus (55). Se ha implicado también como un mecanismo de vigilancia capaz de eliminar células anormales y potencialmente malignas, aunque esto permanece en controversia.

Muchos linfocitos circulantes son células inactivas, las cuales pueden ser activadas si son estimuladas por antígenos o por mitógenos no específicos lo cual causa que las células proliferen y sufran mitosis (transformación blastoide). Muchos antígenos requieren de un procesamiento por el macrófago antes de ser capaces de activar linfocitos, aunque algunos fitomitógenos como la concanavalina A (Con A) y la fitohemaglutinina (PHA) lo hacen sin la ayuda del macrófago.

Los genes localizados en la región I del complejo

principal de histocompatibilidad H-2, del ratón, controla un número de reacciones implicadas en el reconocimiento celular e interacciones, tales como la reacción injerto contra huésped, la reacción mixta de linfocitos (RML), linfotoxicidad mediada por células y la reacción entre linfocitos T, linfocitos B y macrófagos (16).

La respuesta a la reacción mixta de linfocitos (RML) es controlada por una serie de genes dentro y fuera (loci Mls) del complejo principal de histocompatibilidad (4, 15). Un locus importante en la RML está localizado en la región I cercana al locus H-2<sup>k</sup>, y varios loci menores que están diseminados en el complejo (2, 32, 46). Los genes que controlan la RML probablemente codifican los antígenos de la superficie celular, los cuales son responsables del reconocimiento y/o estimulación celular (16).

Los antígenos Ia son controlados por una serie de genes localizados en la región I, cuya principal función parece ser en interacciones célula-célula (2, 16). Estos antígenos son fácilmente detectables en linfocitos B, mientras que en linfocitos T se les encuentra en baja concentración. En la RML, los antígenos Ia pueden proveer un importante estímulo alogénico. Se piensa que los linfocitos T reconocen diferencias antigénicas en células B (51).

Para el ensayo de la RML, los linfocitos de uno de los individuos (respondedor) son cultivados por 4-7 días con linfocitos de un segundo individuo (estimulador) (2, 3, 31). Para prevenir la proliferación de las células estimuladoras se les trata con mitomicina C o con Rayos-X (3, 31), antes que se adicionen a las células respondedoras.

ANTECEDENTES. La enfermedad de Chagas en el hombre y en animales de experimentación es causada por Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, un flagelado del orden de los cinetoplástidos (8), ampliamente distribuido en Sudamérica, América Central y en algunas poblaciones de México, donde afecta sobre todo a las poblaciones rurales que habitan viviendas deficientes (21, 61). T. cruzi existe en tres formas morfológicamente distintas relacionadas a los diferentes medios en que habita el parásito (61).

Forma de amastigote, sin flagelo; organismo esférico u oval con un diámetro aproximado de 2  $\mu\text{m}$  (Fig 1); es una forma adaptada a la vida intracelular en el huésped mamífero. Esta forma se divide por fisión binaria en las células del huésped.

Forma de amastigote, con flagelo y membrana ondulante corta; organismo fusiforme de longitud aproximada de 15  $\mu\text{m}$  (Fig. 1) y representa una forma de multiplicación adaptada a vivir en el tubo digestivo del vector y en cultivos.

Forma de tripomastigote, con flagelo y membrana ondulante a lo largo del organismo; de longitud aproximada de 20  $\mu\text{m}$  y representa una forma no multiplicativa (Fig 1). Aparece en la luz del recto del triatómido, representa el final del ciclo de desarrollo en el vector el cual es infectivo en el huésped mamífero,

y también es la forma que transfiere la infección de una célula a otra y que inicia la infección en el vector cuando se ingieren con la sangre. Esta forma usualmente es encontrada en el torrente circulatorio del huésped mamífero durante la fase aguda y períodos febriles.

La enfermedad de Chagas en el hombre puede presentar una fase aguda y una fase crónica. En la fase aguda, generalmente se desarrolla en el lugar de invasión del parásito una lesión primaria llamada "Chagoma" que se caracteriza por la presencia de inflamación, eritema y edema. Posteriormente, hay una diseminación general del parásito en todo el organismo, que se acompaña por fiebre, malestar general, crecimiento del bazo e hígado, linfadenopatía, miocarditis y algunas veces meningoencefalitis. Durante este período el parásito se multiplica intracelularmente en forma de amastigote, especialmente en las fibras musculares, donde las células infectadas son destruidas.

Después de la fase aguda, en la mayoría de los casos, los signos clínicos disminuye hasta ser insignificantes, el número de parásitos en sangre y en órganos disminuye marcadamente y la infección se vuelve crónica. En el humano esta fase puede perdurar por largo tiempo sin que se presenten síntomas clínicos. En algunos pacientes se observa daño severo en órganos tales como corazón, esófago y colon, lo que puede resultar en la muerte del individuo



(21).

Se ha demostrado que los animales infectados con algunas especies de tripanosomas de baja virulencia, son resistentes a desafíos con especies más virulentas, lo que sugiere la participación de mecanismos inmunológicos en esta enfermedad (21, 28, 63).

En individuos infectados con T. cruzi se puede determinar anticuerpos contra el parásito. Estos anticuerpos han sido identificados mediante la reacción de fijación de complemento, las técnicas directas e indirectas de inmunofluorescencia y la de hemaglutinación (11, 12, 63). Los anticuerpos son inicialmente IgM detectándose después IgG que persiste mientras dura la infección (20, 33, 56).

El papel de los anticuerpos en la resistencia adquirida contra T. cruzi no ha sido bien aclarado, siendo algunas veces contradictorio (17, 21, 53). Algunos reportes muestran una protección relativa cuando se transfiere pasivamente el suero de animales recuperados de la forma aguda de la enfermedad (25, 28). Por otra parte, la eliminación in vivo del complemento por medio del veneno de cobra, resulta en un aumento de la mortalidad y una mayor parasitemia (10). Las formas virulentas de T. cruzi aisladas de animales infectados son lisadas in vitro por el suero fresco de

pacientes en fase crónica, ya sea por la vía clásica o alterna del complemento (10, 36). Los epimastigotes por de contrario son principalmente lisados por la vía alterna (37). Por otra parte, el hallazgo de tripomastigotes en pacientes con enfermedad de Chagas o en animales experimentalmente infectados que poseen anticuerpos carculantes (12, 17) parece indicar que las inmunoglobulinas y el complemento no tienen efectos nocivos notables sobre el parásito (21, 28).

La presencia de inmunidad celular en individuos infectados con T. cruzi ha sido demostrada por pruebas tanto in vivo como in vitro (19, 30, 35, 64). Entre estas últimas, se ha demostrado la inhibición de la migración de los macrófagos en presencia de antígenos de T. cruzi (30, 48, 50, 56). También se ha reportado la transformación de linfocitos periféricos obtenidos de humanos durante la etapa crónica de la enfermedad, por medio de antígenos proteicos de epimastigotes (35, 45, 54).

La inmunidad celular dependiente del timo está involucrada en la protección contra la infección con T. cruzi (7, 28, 19, 62). En ratones, la timectomia neonatal y el tratamiento con agentes inmunosupresores como el suero antitimocito, aumentan la severidad de la enfermedad, desarrollándose una parasitemia más elevada, un aumento en el número de amastigotes en células musculares y una mortalidad temprana (5, 44, 49, 58). Del mismo

modo, la transferencia de inmunidad mediante linfocitos sensibilizados aportan indicaciones de que la inmunidad celular participa en la resistencia del huésped (29, 43), aunque no se excluye la posibilidad de la transferencia de células productoras de anticuerpos (21).

Estudios in vivo como in vitro indican que el macrófago juega un papel importante en la protección contra T. cruzi. Se ha demostrado in vivo que los animales inmunizados y desafiados específicamente con T. cruzi (22) o inespecíficamente con BCG (39), Toxoplasma gondii o Besnoitia jellisoni (60), muestran resistencia a la infección por tripomastigotes mostrando una parasitemia menor y una mayor sobrevida comparada con aquellos animales sin inmunizar. In vitro, los macrófagos activados de estos animales muestran resistencia al crecimiento intracelular de tripomastigotes, los cuales son degradados intracelularmente (27, 38, 52, 60). Por otra parte, T. cruzi escapa de la vacuola fagocítica del macrófago normal y se reproduce en el citoplasma causando su destrucción (27, 38). Del mismo modo, la inyección intravenosa de partículas de sílice en el ratón, resulta en una resistencia disminuida a la infección por T. cruzi, debido a un bloqueo del sistema reticulo-endotelial (26).

Los experimentos realizados en nuestro laboratorio con ratones infectados experimentalmente, han demostrado que después

de once días de infección con el parásito, existe una disminución de la respuesta inmune humoral de tipo primario y secundario a antígenos no relacionados, dependientes e independientes de timo (13, 41). Entre los antígenos timo dependientes estudiados se cuenta a los eritrocitos de burro y a la gamma globulina; entre los segundos al lipopolisacárido de Escherichia coli y al DNP- $\frac{80}{80}$ Ficoll. La supresión observada en estos animales no parece involucrar una alteración del macrófago, ya que los animales infectados mostraron una mayor capacidad para remover carbón coloidal y procesar adecuadamente in vitro un antígeno heterólogo ( $^{131}\text{I}$ -HSA) (40, 41).

Debido a que los reportes para valorar la inmunidad celular en la fase aguda de la enfermedad son escasos y un tanto indirectos, decidimos investigarla tomando en cuenta los siguientes criterios: a) estimulación inespecífica usando un mitógeno selectivo para los linfocitos T, la concanavalina A (Con A) (31, 47) y b) estimulación específica utilizando células alógenicas (reacción mixta de linfocitos) (2, 31, 32).

## MATERIAL Y METODOS

Ratones. En todos los experimentos se usaron ratones machos de la cepa BALB/c con peso de 20-22 gramos y de la cepa C57BL/6 de 25-30 gramos de peso. Los animales se mantuvieron en cajas de material acrílico y se alimentaron con tabletas Purina (Purina de México, S.A. de C.V.) y agua ad libitum.

Trypanosoma cruzi. Se utilizó una cepa mio- y reticulotrófica proporcionada por el Dr. Navarrete del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Guadalajara, Jal., México. Esta cepa ha sido mantenida durante cinco años por pases sucesivos en ratón en el laboratorio de Inmunología del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los ratones se inocularon intraperitonealmente (i.p.) con  $7 \times 10^3$  tripomastigotes (51.6 LD<sub>50</sub>).

Cuenta de parásitos en sangre. Los parásitos en sangre se determinaron cada 5 días en grupos de 5 animales, para cada punto. Para lo cual se desinfectó la cola del animal con alcohol al 70%, se dejó secar y posteriormente se practicó un corte en la punta de la misma. Se obtuvo una gota de sangre, la cual se diluyó con una solución de cloruro de amonio al 0.83% en una pipeta cuenta glóbulos (23). La pipeta se mantuvo a temperatura ambiente durante 3-5 minutos y con la suspensión así preparada se

llenó una cámara de Neubauer y se determinó el número de tripomastigotes/mm<sup>3</sup>.

Preparación del medio de cultivo. Las células de bazo se cultivaron en medio RPMI-1640 (cat. H-18, Gibco, Grand Island, N.Y.) que contiene por cada 100 ml:

1 ml de solución de aminoácidos no esenciales, 100X (cat. 114, Gibco);

1 ml de piruvato de sodio, 100X (cat. 136, Gibco);

1 ml de penicilina y estreptomycin con 100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente;

0.1 ml de L-glutamina, 200 mM (cat. 503, Gibco) y

5 ml de suero fetal de ternera (cat. 614, Gibco).

Preparación del cultivo.

1. Se removieron los bazos asépticamente y se colocaron en cajas de Petri de plástico estériles de 60 X 15 (cat. 5220, Lux Scientific Co., Newbury Park, C.A.), que contenían de 6-10 ml de una solución salina balanceada de Hanks (BSS) estéril, con 100 U de penicilina y 100 µg de estreptomycin por ml.

2. Se disgregaron los bazos para obtener una suspensión celular.

3. Se transfirieron las células a tubos de plástico estériles (cat. 2057, Falcon Plastics, Oxnard, C.A.). Se permitió que las partículas gruesas sedimentaran por 5 minutos en hielo y se

transfirió el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril a un tubo de plástico cónico estéril de 50 ml (cat. 2070, Falcon). Se centrifugó a 750  $\mu$  por 10 min en una centrífuga refrigerada (PR 6000 Diamond).

4. Se resuspendió el sedimento que contenía las células de bazo en 30-40 ml de BSS y se centrifugó a 750  $\mu$  nuevamente. Se repitió la operación dos veces más y se resuspendieron finalmente en 5-10 ml de medio de cultivo.

5. Se contó el número de células viables por medio de azul Tripano.

6. Se ajustó el número de células a  $5-10 \times 10^6$  células/ml en el medio de cultivo.

7. Se colocó 0.1 ml de la suspensión celular en placas para microcultivo (cat. 3040 y 3041, Falcon).

8. Se adicionó por cultivo 0.1 ml de Con A ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) ó 0.1 ml de medio de cultivo a los controles.

9. Se incubaron por 3 días a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda de 5% de  $\text{CO}_2$  en aire. Para determinar el grado de estimulación de las células en estudio, se adicionó 1  $\mu\text{Ci}$  de timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ ) ( $6.7 \text{ Ci/mM}$ , New England Nuclear, Boston, MA.) por cultivo 16 hrs antes de la terminación del cultivo.

Tratamiento de las células con mitomicina C. Las células de bazo a una concentración de  $10 \times 10^6/\text{ml}$  se trataron con 500  $\mu\text{g}$  de mitomicina C (cat. M-0503, Sigma Chemical Co., St

Louis, MO.) y se incubaron en baño María a 37°C por 20 min con agitación constante. A continuación se les adicionó suficiente medio de cultivo y se centrifugaron a 300 g durante 10 min. Las células se lavaron 2 veces más. Finalmente se resuspendieron en medio a la concentración deseada.

RML. La reacción mixta de linfocitos se realizó en placas Falcon para microcultivo, en un volumen final de 0.2 ml con  $1 \times 10^6$  células respondedoras y  $0.5 \times 10^6$  células estimuladoras (32). Para el estudio de una vía las células estimuladoras se trataron con mitomicina C. Los cultivos se incubaron por 4 días a 37°C en atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Para determinar el grado de estimulación de las células en estudio, se adicionó 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-TdR por cultivo 18 hrs antes de la terminación del cultivo. Posteriormente las células se cosecharon por medio de filtros de papel Whattman No 3. Los filtros se secaron por medio de una lampara de infrarrojo y posteriormente se colocaron durante 1 hr en una solución de TCA al 10% que contenía 20% de timidina fría. Los filtro se lavaron 2 veces con TCA al 5% por 15 min y finalmente 2 veces con metanol por 10 min. Los filtros se secaron, se colocaron en viales que contenían 10 ml de líquido de centelleo y se contaron en un aparato Mark III (Amersham/Searle Co.).



## RESULTADOS

### Determinación de parásitos en sangre a diferentes intervalos después de la infección de ratones BALB/c con T. cruzi.

Los niveles de parásitos en sangre fueron determinados por cuenta directa los días 5, 10, 15 y 20. Durante los primeros 4 días de la infección no fué posible encontrar parásitos en la sangre de los animales en estudio. Sin embargo, a partir del día 5 de infección la parasitemia aumento progresivamente, llegando a un máximo 20 días después de la inoculación con el parásito (Fig. 2). El promedio de sobrevivida en estos ratones fué de 17 a 20 días.

Respuesta de las células de bazo de ratones infectados con T. cruzi a Con A. La síntesis de ADN en células de ratones infectados con T. cruzi y en las células de los grupos control estimuladas con Con A fué similar durante los primeros 10 días del experimento (Fig. 3). Sin embargo, después del día 14 de infección, la respuesta al mitógeno Con A disminuyó significativamente en las células de los animales infectados con T. cruzi. La respuesta mitogénica decreció rápidamente entre los días 10 y 14, y permaneció disminuída durante todo el experimento (Fig. 3).

<sup>5</sup>  
<sup>105</sup>  
Repuesta de células de bazo de ratones tratadas con mitomicina C a la Con A. Las células de ratones BALB/c y C57BL/6 previamente tratadas con mitomicina C son inhibidas a responder a

la Con A. Los índices de estimulación encontrados en las células tratadas con mitomicina C fueron notablemente más bajos que los índices de las células no tratadas (Tabla I).

Respuesta de las células de bazo de ratones infectados con *T. cruzi* al estímulo alógeno. En la RML de una vía y dos vías las células de ratones infectados durante 5 a 10 días no mostraron diferencias significativas con las células de ratones no infectados. En la RML de una vía las células de bazo de los ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>) sanos e infectados muestran una estimulación con células alógenas (ratones C57BL/6, H-2<sup>b</sup>). El índice de estimulación es de 2.4 a 3.9 (Tabla III). Por otra parte, la RML de dos vías muestra una estimulación más elevada debido a que en estos cultivos los dos tipos de células reconocen y responden a las diferencias mutuas en el complejo H-2 (Tabla II). Sin embargo, a partir del día 15 postinfección la respuesta de las células infectadas con *T. cruzi*, al estímulo alógeno disminuyó significativamente y perduró durante todo el experimento (Tablas II y III).

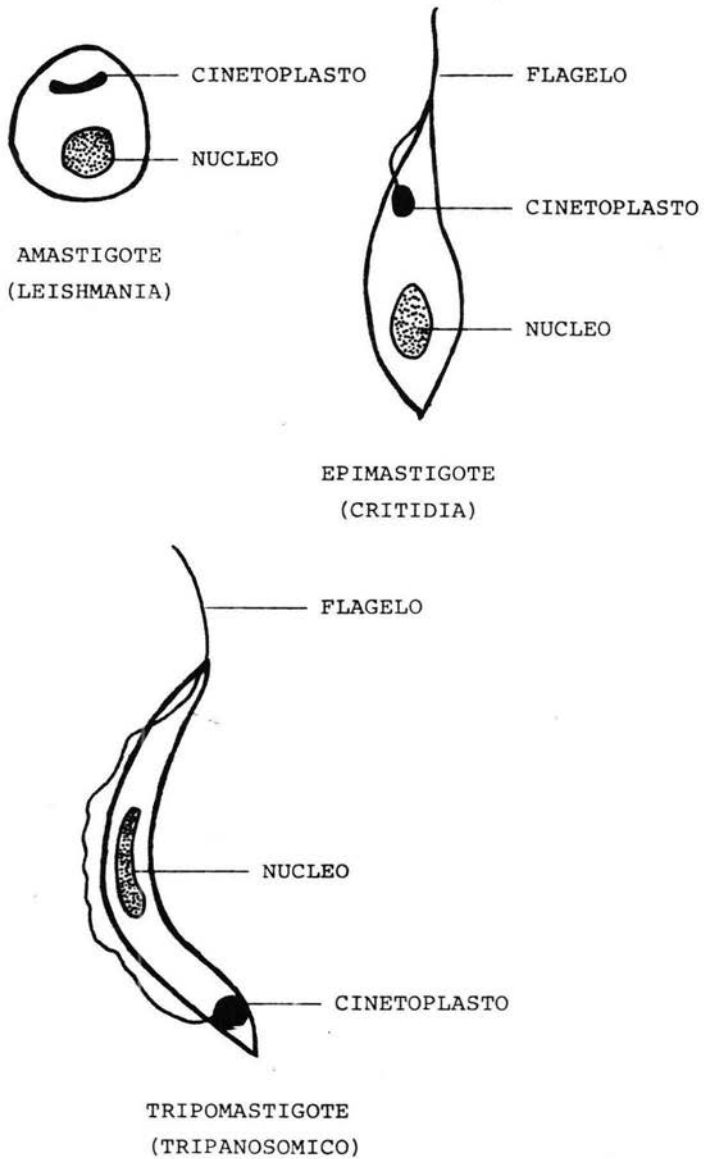


FIGURA 1- Diagrama que ilustra las formas morfológicas del Trypanosoma cruzi.

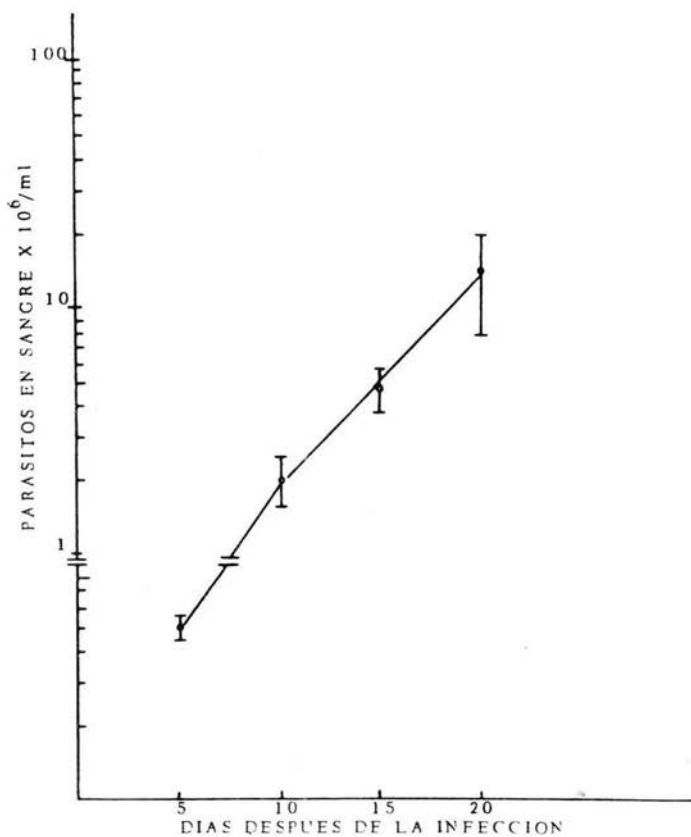


FIGURA 2- Determinación de parásitos en sangre a diferentes intervalos de tiempo después de la infección de ratones BALB/c con T. cruzi. Cada punto representa el promedio de la cuenta en 5 animales.

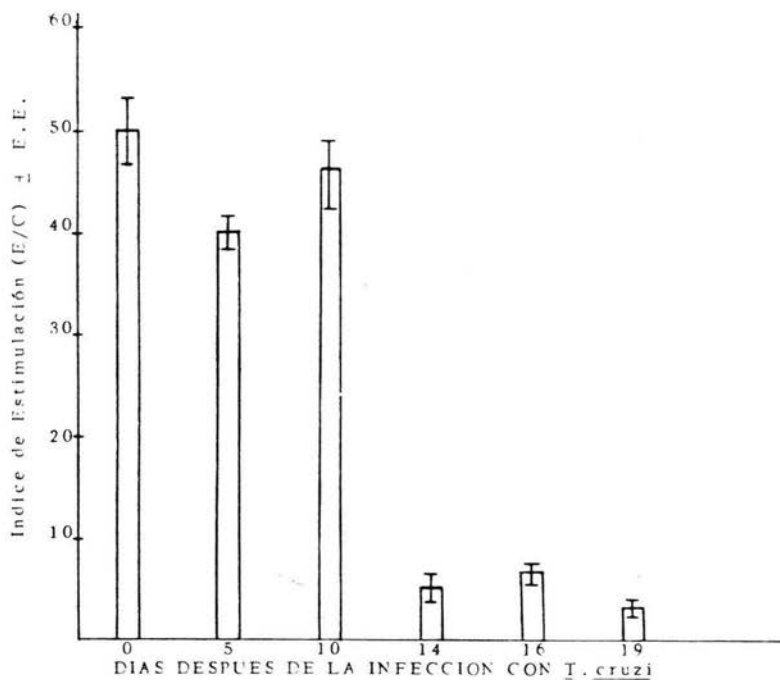


FIGURA 3- Estimulación in vitro con Con A de células de bazo de ratones BALB/c infectados con T. cruzi. Índice de Estimulación (cmp estimulados/cmp no estimulados o controles) ± E.E. Promedio de 5 animales.

TABLA I

RESPUESTA DE CELULAS DE BAZO DE RATONES TRATADAS CON MITOMICINA C A LA Con A<sup>a</sup>.

Cepa	Indice de estimulación $\pm$ E.E. <sup>b</sup> en:		<u>P</u>
	Células tratadas <sup>c</sup>	Células normales	
C57BL/6	1.15 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>	18.57 $\pm$ 0.59	< 0.025
BALB/c	1.15 $\pm$ 0.06	42.16 $\pm$ 1.65	< 0.025

- a. Los cultivos a una concentración de  $1 \times 10^6$  células de bazo se estimularon con 1  $\mu$ g de Con A.
- b. cmp estimulados/cmp no estimulados  $\pm$  E.E. Promedio de 5 animales.
- c. Tratamiento con 50  $\mu$ g de mitomicina C por  $1 \times 10^6$  células de bazo.
- d. Los analisis estadísticos se realizaron por la prueba U de Mann-Whitney.

TABLA II

REACCION MIXTA DE LINFOCITOS DE CELULAS DE RATONES BALB/c NORMALES O INFECTADOS  
 CON Trypanosoma cruzi Y C57BL/6

Días Postinfección	BALB/c		P
	Normales	Infectados <sup>b</sup>	
5	115.25 ± 3.02 <sup>c</sup>	114.16 ± 1.35	N.S. <sup>d</sup>
10	124.64 ± 2.07	119.73 ± 1.68	N.S.
15	80.81 ± 1.90	33.06 ± 1.72	< 0.001
17	88.47 ± 2.01	29.76 ± 1.17	< 0.001

- a. RML para estudiar la respuesta en ambos sentidos. La concentración de células de bazo de cada cepa fué  $1 \times 10^6$  por cultivo.
- b. Los ratones BALB/c se infectaron con 51.6 LD<sub>50</sub> de T. cruzi.
- c. Índice de estimulación ± E.E. Promedio de 5 animales.
- d. Los analisis estadísticos se realizaron por la prueba t de Student.

REACCION MIXTA DE LINFOCITOS DE CELULAS DE RATONES BALB/c NORMALES O INFECTADOS  
 CON Trypanosoma cruzi Y C57BL/6 TRATADAS CON MITOMICINA C.<sup>a</sup>

Días Postinfección	BALB/c		P
	Normales	Infectados <sup>b</sup>	
5	3.98 ± 0.60 <sup>c</sup>	5.00 ± 0.28	N.S. <sup>d</sup>
10	2.41 ± 0.47	1.81 ± 0.35	N.S.
15	2.63 ± 0.41	1.10 ± 0.23	< 0.01
17	3.14 ± 0.48	0.75 ± 0.23	< 0.001

- a. La RML se realizó para determinar la reactividad de las células de bazo de los ratones BALB/c infectados a las células de los ratones C57BL/6 tratadas con mitomicina C. El tratamiento con mitomicina C se describe en detalle en Material y Metodos. La concentración de células fué de  $1 \times 10^6$  BALB/c y  $0.5 \times 10^6$  C57BL/6 tratadas con mitomicina C. Se incluye un grupo de animales normales.
- b. Los ratones BALB/c se infectaron con 51.6 LD<sub>50</sub> de T. cruzi.
- c. Índice de estimulación ± E.E. Promedio de 5 animales.
- d. Los analisis estadísticos se realizaron por la prueba t de Student.



## DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo demuestran una relación entre los niveles de parásitos en la sangre del huésped y su respuesta inmune celular. Los niveles de parásitos en los ratones BALB/c aumentan progresivamente durante la infección hasta que sobreviene la muerte de los animales. Esto es acompañado de un aumento notable en el tamaño de los órganos linfoides, principalmente del bazo (40). Esto difiere de lo reportado con otras especies de tripanosomas, donde se ha observado parasitemias cíclicas y recuperación del tamaño de los órganos linfoides (1, 24).

La infección con T. cruzi disminuye la capacidad de las células de bazo de ratones infectados a responder al estímulo mitogénico con Con A y a la RML. La síntesis de ADN producida por la estimulación con Con A muestra que las células de bazo de animales infectados durante 14 días exhiben una disminución en los índices de estimulación. La supresión mostrada perdura durante toda la infección. Por otra parte cuando se midió la capacidad de las células de los animales infectados con T. cruzi a responder a un estímulo alógeno en la reacción mixta de linfocitos se encontró una supresión similar a la observada con el mitógeno Con A. En la RML de dos vías donde las células de bazo de ratones BALB/c normales son cultivadas con células de ratones con células de ratones C57BL/6 los niveles de estimulación son altos debido a que

los dos tipos de células responden mutuamente a las diferencias en el complejo H-2. Por el contrario, las células de los ratones BALB/c infectados con T. cruzi en la RML de dos vías muestran una disminución en los índices de estimulación a partir del día 15 de la infección, debido a que en este sistema solo una población de células las de los ratones C57BL/6 responde al estímulo alógeno, mientras que la población de células de los ratones infectados esta dañada en su capacidad de respuesta a las células alógenas. Esto fué confirmado por los estudios realizados en la RML de una vía, donde las células alógenas de ratones C57BL/6 fueron tratadas previamente con mitomicina C. El tratamiento con mitomicina C fué efectivo ya que se inhibió la mitosis de las células tratadas cuando fueron estimuladas con un mitógeno como la Con A. En la RML de una vía las células de los ratones BALB/c normales responden al estímulo alógeno, sin embargo, las células de los ratones BALB/c infectados con T. cruzi no muestran respuesta a la estimulación por células alógenas después del día 15 de infección. La supresión en ambos tipos de RMLs se manifestó después del día 10 de infección alcanzando un máximo a los 17 días subsecuentes a la misma.

Los resultados presentados concuerdan con los reportados por Reed y col. (42) quienes hicieron pruebas cutáneas en ratones infectados con T. cruzi con protoplastos de BCG u oxazolona previamente inmunizados con adyuvante completo de

Freund u oxazolona, un agente sensibilizante de la piel, Rowland y Kuhn (45) encontraron también una supresión de la respuesta de tipo celular en dos especies diferentes de ratones cuando usaron fitohemaglutinina y pruebas cútaneas con un antígeno de epimastigotes.

La capacidad disminuída de respuesta de las células T a estímulos por mitógenos específicos durante la fase aguda de la infección, puede ocasionar una mayor susceptibilidad al parásito y ser una de las posibles causas de muerte de los animales infectados. Sin embargo, se desconoce el papel que la respuesta inmune celular tiene en la protección del huésped.

Por otra parte, previamente se ha reportado la supresión humoral a antígenos heterólogos en ratones infectados con T. cruzi (13, 41). Este mecanismo de supresión en ratones ha sido reportado en infecciones por otros protozoarios como en la malaria y en las tripanosomiasis africanas (18, 59). En estas infecciones se han postulado varios mecanismos para la evasión del parásito de la respuesta inmune del huésped. Uno de los mecanismos en ambos tipos de infecciones es que los parásitos sufren variaciones antigénicas a cada nuevo ciclo de proliferación (9, 57) o como se postula en las tripanosomiasis africanas por T. rhodesiense y T. gambiense la existencia de una subpoblación de células supresoras (14, 24).

### CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que la respuesta inmune celular en ratones infectados con T. cruzi disminuye durante las etapas finales de la infección, como lo demuestra la falla de ratones infectados durante 14 días a responder a mitógenos de linfocitos T. Además, en línea con lo anterior, los animales infectados presentan una disminución en la capacidad a reconocer células alógenicas. La reducción de la respuesta inmune se presenta cuando los niveles de parasitemia son elevadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Albright, J.F., Albright, J.W. y Dusanic, D.G.: Trypanosome-induce splenomegaly y suppression of mouse spleen cell responses to antigen y mitogens. *J. Reticuloendoth. Soc.* 21: 21, (1977).
2. Bach, F.H., Bach, M.L. y Sondel, P.M.: Diferential funtion of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature (London)*. 259: 273, (1976).
3. Bach, F.H. y Voynow, N.K.: One-way stimulation in mixed leucocyte cultures. *Science*. 153: 545, (1966).
4. Bach, M.L., Widmer, M.B., Bach, F.H. y Klein, J.: Mixed leucocyte cultures and immune response region disparity. *Transplant. Proc.* 5: 369, (1973).
5. Behbehani, M.K.: Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi infections in X-irradiated and in thymectomiced mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 265, (1971).
6. Bloom, B.R.: In vitro approaches to the mechanism of cell-mediated immune reactions. *Adv. Immunol.* 13: 101, (1971).
7. Bloom, B.R. y Rowen, A.: Cell-mediated in Chagas disease. WHO Meeting on Immunology of Chagas disease. México, Dec. 3-7, (1973).
8. Brener, Z.: Biology of Trypanosoma cruzi. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 347, (1973).
9. Brown, B.N.: Antigenic variation and immunity to malaria. En

"Parasites in the Immunized Host: Mechanisms of survival". A Ciba Foundation Symposium 25. p.37. North Holland, Amsterdam, 1974.

10. Budzko, D.B., Pizzimenti, M.C. y Kierszenbaum, F.: Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 11: 86, (1975).
11. Camargo, M.E.: Serological diagnosis of Chagas' disease. p. 206. En American Trypanosomiasis research. Scientific. publ. 318, Pan American Health Organization, Washington, D.C., 1975.
12. Cerisola, J.A., Alvarez, M. y Rebosolan, J.B.: Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 24: 2, (1969).
13. Clinton, B.A., Ortiz-Ortiz, L., García, W., Martínez, T. y Capín, R.: Trypanosoma cruzi I. Early immune responses at celular level by infected mice. Exp. Parasitol. 37: 417, (1975).
14. Earley, D.D. y Jayawardena, A.N.: Supressor cells in mice infected with Trypanosoma brucei. J. Immunol. 119: 1029, (1977).
15. Festenstein, H.: Antigenic strength investigated by mixed cultures of allogeneic mouse spleen cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 129: 567, (1966).
16. Gill III, T.J., Cramer, D.V. y Kunz, H.W.: The major histocompatibility complex-comparation in mouse, man and the rats. Am.

J. Pathol. 90: 735, (1978).

- ✓17. Goble, F.C.: South American Trypanosomiasis. En "Immunity to parasitic Animals". Jackson, R. Herman y J. Singer, editores. Vol II, p. 597, Appleton, New York, 1970.
- ✓18. Goodwin, L.G., Green, D.G., Guy, M.W. y Voller, A.: Immunosuppression during trypanosomiasis. Br. J. exp. Path. 53: 40, (1972).
- ✓19. González-Cappa, S.M., Sclamuñis, G.A., Traversa, O.C., Yanoksky, J.F. y Parodi, A.S.: Complement-fixation test, skin test, and experimental immunization with antigens of Trypanosoma cruzi. Prepared under pressure. Am. J. trop. Med. Hyg. 17: 709, (1968).
- ✓20. González-Cappa, S.M., Vattuone, N.H., Menes, S. y Schamuñis, G.A.: Humoral antibody response and Ig characterization of the specific agglutinins in rabbits during experimental trypanosomiasis. Exp. Parasitol. 34: 32, (1973).
21. Hanson, W.L.: Immunology of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). En "Immunology of Parasitic Infections". S. Cohen y E.H. Sadum, editores. p. 222, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1976.
22. Hoff, R.: Killing in vitro of Trypanosoma cruzi by macrophages from mice immunized with T. cruzi or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vitro. J. Exp. Med. 142: 299, (1975).
23. Hoff, R.: A method for counting and concentrating living

- Trypanosoma cruzi in blood lysed with ammonium chloride. J. Parasitol. 60: 527, (1974).
24. Jayawardena, A.N. y Waksman, B.M.: Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. Nature (London). 265: 539, (1977).
25. Kagan, I.G. y Norman, L.: Immunologic studies in Trypanosoma cruzi. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of T. cruzi.: J. Infect. Dis. 108: 213, (1961).
26. Kierszbaum, F., Knecht, E., Budzko, D.B. y Pizzimenti, M.C.: Phagocytosis: A defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 112: 1839, (1974).
27. Kress, K., Bloom, B.R., Wittner, M., Rowen, A. y Tanowitz, H.: Resistance of Trypanosoma cruzi to killing by macrophages. Nature (London). 257: 394, (1975).
28. Krettli, A.U. y Brener, Z.: Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol. 116: 755, (1976).
29. Kuhn, R.E. y Durum, S.K.: The onset of immune protection in acute experimental Chagas' disease in C<sub>3</sub>H (HE) mice. Int. J. Parasitol. 5: 241, (1975).
30. Lelchuck, R., Pratuco, A. y Manni, J.A.: Studies of cellular immunity in Chagas' disease: Effect of glutaraldehyde-treated specific antigen on inhibition of leucocyte migration.: J. Immunol. 112: 1578, (1974).
31. Ling, N.R. y Kay, J.E.: Lymphocyte stimulation, p. 103.



North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1975.

32. Lonai, P. y Mc Devitt, H.O.: The expression of I-region gene products on lymphocytes. *Immunogenetics*. 14: 17, (1977).
33. Marsden, P.D., Seah, S.K., Mott, K.E., Prata, A. y Platt, E.: Immunoglobulins in Chagas' disease. *J. trop. Med. Hyg.* 73: 157, (1973).
34. Mitchell, G.F. y Miller, J.F.: Cell to cell interaction in the immune response. II The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128: 821, (1968).
35. Montufar, O.M., Musatti, C.C., Mendes, E. y Mendes, N.F.: Cellular immunity in chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 5: 401, (1977).
36. Muñoz, J. y Borrelío, A.: Estudo sobre a acao litica de diferentes seros as formas de cultura e sanguicolas do Schizotrypanum cruzi. *Rev. Brasil. Biol.* 5: 563, (1945).
37. Nogueira, N., Bianco, C. y Cohn, Z.: Estudios on selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi.: *J. Exp. Med.* 142: 224, (1975).
38. Nogueira, N. y Cohn, Z.: Uptake and intracellular fate in normal and activated cells. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 24: 194, (1977).
39. Ortiz-Ortiz, L., González-Mendoza, A. y Lamoyi, E.: A vaccination procedure against Trypanosoma cruzi infection in mice by non-especific immunization. *J. Immunol.* 114: 1424, (1975).
40. Ortiz-Ortiz, L., Ortega, M.T., Capín, R. y Martínez, M.T.:

- Enhanced mononuclear phagocytic activitic during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 50: 232, (1976).
41. Ramos, C., Lamoyi, E., Feoli, M., Rodriguez, M., Perez, M. y Ortiz-Ortiz, L.: Immunosuppressed response to diferent antigents in the infected mouse. *Exp. Parasitol.* 47: 190, (1978).
42. Reed, S.G., Larson, C.L. y Speer, C.A.: Suppression of cell-immunity in experimental Chagas' disease. *Z. Parasitenk.* 52: 11, (1977).
43. Roberson, E.L. y Hanson, W.L.: Transfer of immunity to T. cruzi *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68: 338, (1974).
44. Roberson, E.L. y Hanson, W.L.: Trypanosoma cruzi. Effects of antithymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol.* 34: 168, (1973).
45. Rowland, E.C. y Kuhn, R.E.: Suppression of celular response in mice during Trypanosoma cruzi infections. *Infect. Immun.* 20: 393, (1978).
46. Rychlívá, M., Démant, P. y Iványi, P.: The mixed lymphocyte reaction in H-2K, H-2D, and non-H-2 incompatibility. *Biomedicine.* 18: 401, (1973).
48. Schmuñis, G.A., Vattuone, H., Szarfman, A. y Pesce, U.J.: Cell mediated immunity in mice inoculated with epimastigotes or trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. *Z. Tropenmed. Parasit.* 24: 81, (1973).
49. Schmuñis, G.A., González-Cappa, S.M., Traversa, O.C. y Yanosky,

- J.F.: The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with Trypanosoma cruzi in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65: 89, (1971).
50. Seah, S.: Delayed hypersensitivity in Trypanosoma cruzi infections. Nature (London). 225: 1256, (1970).
51. Simpson, E.: Stimulation of mixed lymphocyte cultures and cytotoxic responses. Evidence of T cells express SD but not LD antigens, whereas B cells express both. Eur. J. Immunol. 5: 456, (1975).
52. Tanowitz, H., Wittner, M., Kress, Y. y Bloom, B.R.: Studies of in vitro infections by Trypanosoma cruzi. I. Ultraestructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. Am. J. trop. Med. Hyg. 24: 25, (1975).
53. Texeira, A.R. y Santos-Buch, C.A.: The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of Trypanosoma cruzi antigens and humoral antibody response to these antigens. J. Immunol. 113: 859, (1974).
54. Tscludi, E.I., Anziano, D.F. y Dalmaso, A.P.: Lymphocyte transformation in Chagas' disease. Infect. Immun. 6: 905, (1972).
55. Valdimarsson, H.: Effector mechanisms in cellular immunity. En "The Immune System: a course on the molecular and cellular basis of immunity". M.J. Hobart e I. Mc. Connell, editores. p. 179, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1976.
56. Vattuone, N.H., Gonzáles-Cappa, S.M., Menes, S. y Schmuñis, G.A.: Cell-mediated and humoral immune response of mice infected with

- Trypanosoma cruzi. Z. Tropenmed. Parasit. 25: 267, (1974).
57. Vickerman, K.: Antigenic variation in African trypanosomes. En "Parasites in Immunized Host: Mechanisms of survival". A Ciba Foundation Symposium 25. p. 53, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1974.
58. Vilches, A.M., Katzin, A., Golferá, H. y Schmuñis, G.A.: The effect of infection with Trypanosoma cruzi in mice. Z. Tropenmed. Parasit. 24: 279, (1973).
59. Wedderburn, N.: Immunodepression produced by malarial infection in mice. En "Parasites in Immunized Host: Mechanisms of survival". A Ciba Foundation Symposium 25. p. 123, North-Holland Publishing co., Amsterdam, 1974.
60. Williams, D.M., Sawyer, S. y Remington, J.S.: Role of activated macrophages in resistencia of mice to infections with Trypanosoma cruzi. J. Infect. Dis. 134: 610, (1976).
61. WHO.: Immunology of Chagas' disease. Bull. Wld. Hlth. Org. 50: 459, (1974).
62. Yanovsky, J.F. y Albado, E.: Humoral y cellular response to Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol. 109: 1159, (1972).
63. Yanovsky, J.F., Traversa, O.L., Taratuto, A.L., Schmuñis, G.A., González-Cappa, S.M. y Parodi, A.S.: Trypanosoma cruzi: Experimental immunization of mice. Exp. Parasitol. 26: 73, (1969).
64. Zeledon, R. y Ponce, C.: A skin test for the diagnosis of Chagas' disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 68: 414, (1974).