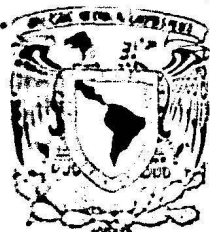


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



HALLAZGO DE CELULAS SUPRESORAS EN EL
BAZO DE RATONES INFECTADOS EXPERIMEN-
TALMENTE CON 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

LAURA ILSE SCHADTLER SIWON

MEXICO, D. F.

1979

6429



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección
del Dr. Librado Ortiz-Ortiz
en el Laboratorio de Inmunología del Departamento
de Biotecnología del Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM.

A ERNESTO...

A MIS ABUELITOS

A MI MADRE

A MI AHIJADITA KARIN

Al Dr. Ortiz-Ortiz por su valiosa dirección
y sugerencias en la elaboración del presente
trabajo.

Al Dr. Celso Ramos por su colaboración y a
todos los compañeros del laboratorio por su
apoyo.

¿ Sería acaso tan grande el fruto de las prosperidades de no haber quien de ellas se alegre tanto como nosotros...?

• HALLAZGO DE CELULAS SUPRESORAS EN EL BAZO DE
RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON TRYPANOSOMA CRUZI •

INDICE

	<u>Pág.</u>
TABLA Y LISTA DE FIGURAS	i
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	21
DISCUSION	30
BIBLIOGRAFIA	34

TABLA Y LISTA DE FIGURAS

<u>Tabla</u>		<u>Pág.</u>
1	Efecto supresor de células de bazo obtenidas de ratones infectados con <u>T. cruzi</u> .	29
 <u>Figura</u>		
1	Diagrama que ilustra los tres estadios morfológicos del <u>Trypanosoma cruzi</u> .	23
2	Determinación de parásitos en sangre a diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación i.p. de ratones BALB/c con <u>T. cruzi</u> .	24
3	Respuesta mitogénica de células de bazo de ratón infectado con <u>T. cruzi</u> .	25
4	Supresión de la mitogénesis por células de bazo infectadas con <u>T. cruzi</u> .	26
5	Efecto del tratamiento con suero anti-tímocito sobre la supresión de la mitogénesis por células del bazo infectadas con <u>T. cruzi</u> .	27
6	Efecto del tratamiento con suero anti-Ig de ratón sobre la supresión de la mitogénesis por células de bazo infectadas con <u>T. cruzi</u> .	28

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es causada por la infección con Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, un flagelado del orden Cinetoplastida, al cual pertenecen también los organismos causantes de la enfermedad del sueño (Trypanosoma brucei sp.), el kala-azar y la leishmaniasis cutánea (Leishmania sp.). El T. cruzi es transmitido por los reduvidos, insectos hematófagos de la familia Triatominae, llamados comúnmente triatomas.

La enfermedad de Chagas se encuentra ampliamente distribuida en Centro y Sudamérica, extendiéndose hasta México, y afecta principalmente a aquellas poblaciones rurales cuyas viviendas son de escasos recursos. Es difícil determinar la prevalencia exacta de la enfermedad, ya que las estadísticas de dichas poblaciones son escasas o inexistentes. Sin embargo, no deja de ser importante, puesto que ya se han reportado casos clínicos y defunciones en relación a esta enfermedad, la cual resulta ser mortal y prácticamente incurable. Aún no se ha descubierto un agente quimioterapéutico efectivo de aplicación general (22, 26, 48).

El T. cruzi presenta tres estadios morfológicamente diferentes, dependiendo del medio ambiente en el que habite: (i) Forma leishmanial o amastigote: Son organismos redondos u ovalados, no flagelados de 2 a 5 μm de diámetro, con núcleo y cinetoplasto. Su forma de multiplicación es intracelular en los mamíferos hospederos. (ii) Forma cricial o epimastigote: Son organismos fusiformes, flagelados de 15 a 20 μm de longitud. Pre-

sentan una corta membrana ondulante, un núcleo y un cinetoplasto situado cerca del núcleo. Su forma de multiplicación es extracelular, y se lleva a cabo siempre en el tubo digestivo del vector. (iii) Forma tripomastigote: También son organismos fusiformes, flagelados de 15 a 20 μ m de longitud. Presentan una membrana ondulante que abarca toda la longitud del cuerpo, un núcleo central y un cinetoplasto situado en la parte posterior al núcleo. Estos organismos representan la forma infecciosa no multiplicativa de la especie. Aparecen en la luz del recto de los reduvidos como tripomastigotes metacíclicos, siendo infecciosos para los mamíferos; así mismo, se encuentran dentro de éstos, transmitiendo la infección de una célula a otra, o bien, iniciándola en un reduvico cuando éste ingiere sangre del mamífero infectado (26, 27, 48) (Fig. 1).

Los reduvidos habitan frecuentemente en las madrigueras de los armadillos y así mismo, en diferentes tipos de construcciones pobres de casas rurales. También se les ha encontrado en establos y porquerizas. Durante el día permanecen en las grietas, en huecos o entre la paja, y por la noche, salen a alimentarse (27).

Los triatomas se infestan al ingerir tripomastigotes de la sangre periférica de mamíferos infectados. En la luz del mesogastrio de los insectos, los organismos se reproducen en forma de epimastigote. Después de 15 a 30 días, su proliferación conduce a la formación de tripomastigotes metacíclicos en el recto del insecto. Estas formas infecciosas son expulsadas junto con las heces fecales del triatoma, y los tripomastigotes inician la infección en los nuevos hospederos, al penetrar por las abrasiones de la piel, o

por las membranas mucosas (33). Estos tripomastigotes llegan a la sangre, la cual, los transporta a diversos órganos como el corazón, pulmones, hígado, bazo, etc., donde penetran a fibras musculares y endotelios. Al introducirse en las células, pierden su flagelo y se redondean, convirtiéndose en amastigotes, que se multiplican formando los denominados pseudoquistes, que son células repletas de amastigotes. En este momento los amastigotes se reproducen por fisión binaria, dando como resultado nuevos tripomastigotes, los cuales son liberados al sufrir la célula una lisis citoplásmica. De este modo, los tripomastigotes quedan libres para invadir otras células o bien, para ser ingeridas por un insecto (26, 27, 48).

En la enfermedad de Chagas, tanto en el hombre como en los animales de experimentación, se presentan dos fases importantes: la fase aguda y la fase crónica. En general, mientras más jóvenes son los individuos infectados, más severo es el problema. La forma aguda de la enfermedad predomina en los grupos jóvenes, mientras que la forma crónica es más usual entre los adultos (27).

En la fase aguda, generalmente aparece una lesión cutánea nodular en el sitio de entrada de los parásitos, denominando chagoma, que se caracteriza por presentar inflamación, eritema y edema. Cuando el sitio de entrada es la conjuntiva, se presenta el signo de Romaña, que se manifiesta como una lesión edematosa en el párpado y conjuntivitis. Ambas lesiones se caracterizan por un infiltrado casi exclusivamente mononuclear. Esta fase, que dura dos o tres semanas, va acompañada de un aumento pronunciado de organismos in situ. En casos severos, el edema facial puede extenderse y abarcar el

cuerpo entero.

Posterior a la entrada de los parásitos, ocurre una diseminación de éstos en todo el cuerpo, acompañado por fiebre, malestar, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, miocarditis y, algunas veces meningoencefalitis. Durante este tiempo, los parásitos se multiplican intracelularmente en forma de amastigotes, dañando especialmente células musculares. Sin embargo, durante el estado febril se ha demostrado la presencia de tripanosomas en sangre, los cuales desaparecen cuando la temperatura baja a los niveles normales, desapareciendo así mismo el edema.

La fase aguda de la enfermedad de Chagas es, por lo general, de corta duración, aunque puede durar varios meses. Las lesiones causadas por la parasitemia en los diversos órganos, principalmente el corazón, conducen frecuentemente a la muerte.

La fase crónica, algunas veces se presenta con el antecedente de la fase aguda. En otros casos, la fase crónica cursa asintóticamente y solo se descubre por hallazgos electrocardiográficos y radiológicos; o bien, aparecen los síntomas 10 o más años después de la infección inicial. Esta fase se caracteriza por miocarditis progresiva o dilatación irreversible de visceras huecas. La lesión cardíaca presenta una infiltración de células mononucleares, destrucción de fibras miocárdicas, fibrosis intersticial y acumulación de células plasmáticas. Durante esta fase, es muy difícil demostrar la presencia de parásitos. En ocasiones, la glándula del tiroides aumenta de tamaño produciendo megaesófago; también se pueden presentar fenó-

menos de alopecia, torpeza mental, problemas circulatorios y trastornos del sistema nervioso (22, 27, 48).

Respuesta inmune

En general, la respuesta inmune se inicia por interacción del antígeno con receptores específicos situados en la superficie de las células linfoides, las cuales, se han agrupado en dos categorías principales: linfocitos derivados de timo (T), y linfocitos derivados de la médula ósea, siendo el equivalente en las aves, la bolsa de Fabricio (B). Ambos tipos de linfocitos se originan a partir de células de un tronco común (células de médula ósea); pero se diferencian en forma distinta, bajo la influencia de los inductores locales. Esa diferenciación se lleva a cabo en los órganos linfoides primarios: el timo, en todas las especies de vertebrados, y la médula ósea o su equivalente, la bolsa de Fabricio, en las aves.

Las células T se diferencian en estos órganos linfoides primarios, luego parten por vía sanguínea, hacia sitios timo-dependientes del sistema linfoide; después, a través de los vasos linfáticos pasan al conducto torácico y de ahí de nuevo a la sangre. Las células que intervienen en esta línea son: timocitos (células T inmaduras), células T periféricas, y células T activadas, las cuales están involucradas en la cooperación celular (células de ayuda), en la citotoxicidad mediada por células (células asesinas o "K") y otras funciones como, por ejemplo, en la producción de linfocinas. Las células B son las precursoras de las células plasmáticas, formadoras de anticuerpos (16).

En la respuesta inmune, el antígeno inicia una transformación y una mitosis de los linfocitos T, formando una población que reacciona específicamente con el mismo. Por otra parte, bajo el mismo estímulo, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas, que secretan anticuerpos humorales; sin embargo, este proceso requiere usualmente la cooperación de células T. De esta manera, en la respuesta inmune se generan dos mecanismos efectores: uno, mediado por anticuerpos humorales específicos, y el otro, por linfocitos T sensibilizados específicamente (inmunidad mediada por células).

Tanto los anticuerpos como las células T sensibilizadas pueden actuar independientemente unos de otros. Pero, existen otros mecanismos inmunes específicos que requieren interacción de anticuerpos humorales con cierto tipo de células, tales como los macrófagos, células "K", etc. Así mismo, la interacción del antígeno con linfocitos T puede conducir a la liberación de linfocinas, con activación de macrófagos o, a la liberación de linfoquinas que ocasionan daño celular en zonas donde no se presenta el antígeno específico (11).

Los macrófagos juegan un papel importante en la respuesta inmune; así intervienen en la producción de anticuerpos, en la cooperación celular, en la inducción y expresión de la inmunidad mediada por células, y son importantes en la destrucción de bacterias y tumores (16).

Se ha visto que existen mecanismos inmunológicos involucrados en muchas de las características de la enfermedad de Chagas. Los ratones que se

recuperan de una fase aguda de la tripanosomiasis americana jamás vuelven a presentarla, lo cual indica que desarrollan una inmunidad adquirida contra el parásito. Esto se ha comprobado en diferentes experimentos empleando inmunosupresores, y como resultado se ha obtenido una mayor parasitemia y muerte de los animales en estudio. Drogas inmunosupresoras, tales como la ciclofosfanida, incrementan la severidad de la enfermedad en ratones infectados; igualmente, se ha visto el mismo resultado en ratones timectomizados neonatalmente o en ratones tratados con suero anti-timocito (6 y 23).

Se ha comprobado que aquellos animales que se recuperan de una fase aguda de la enfermedad de Chagas, presentan anticuerpos circulantes contra el parásito; sin embargo, esto ha sido motivo de controversia. Así mismo, se ha observado que el suero de dichos animales, al transferirlo a otros, les proporciona cierta protección (22).

A juzgar por la información disponible, los factores inmunológicos desempeñan una función importante en la enfermedad de Chagas. Tanto en personas, como en animales infectados con I. cruzi, se han detectado anticuerpos contra el parásito mediante reacciones de fijación de complemento y técnicas directas e indirectas de inmunofluorescencia y hemaglutinación (48). También se ha visto por medio de análisis electroforéticos, que el suero de estos individuos contienen un nivel incrementado de gamma globulinas. El incremento de éstas ocurre cuando el número de parásitos decrece rápidamente y la máxima concentración de gamma globulinas coincide con la desaparición total de parásitos de la sangre y órganos. Dichos estudios inmunoelectroforéticos indican que tanto la IgM como la IgG son las inmunoglobulinas

que se incrementan (22, 23).

El primer anticuerpo que se detecta al inicio de la infección es la IgM; después aparece la IgG, la cual perdura durante todo el curso de la infección (44). No se sabe con certeza, si durante la fase aguda de la enfermedad se produce en el suero un aumento de IgM y de IgG, así como si existe un aumento de IgG durante la fase crónica (48).

Experimentos de transferencia pasiva, tanto en animales de experimentación como en humanos, indican que los anticuerpos séricos están involucrados en la resistencia adquirida a la infección con T. cruzi (22). Estudios in vitro indican que, en condiciones apropiadas el suero inmune junto con complemento pueden producir lisis del parásito, lo cual sugiere que el complemento puede estar involucrado en la resistencia de dicha infección (8, 25).

Hay pruebas de que en humanos y animales con enfermedad de Chagas se presentan reacciones de hipersensibilidad celular (29, 43). Así, se ha demostrado la presencia del MIF (factor de inhibición de migración de macrófagos) (22, 36, 40) y de una reacción cutánea en cobayos infectados con T. cruzi (20). Sin embargo, no se ha determinado el papel preciso de la inmunidad celular en la protección contra la infección por el parásito.

Tanto en animales como en humanos se ha visto que hay una relación recíproca entre la inmunidad mediada por células y los anticuerpos. Esto sugiere que la presencia de anticuerpos inhibe la manifestación de la inmuni-

dad por radiación celular. Esta relación no ha sido claramente establecida en la enfermedad de Chagas.

Se ha observado también que la resistencia de ratones a la infección por T. cruzi depende mucho de la presencia de linfocitos T, necesarios para la inmunidad celular. La timectomía neonatal y el tratamiento con sueros anti-timocito, inhibe la inmunidad adquirida contra T. cruzi. Esto se debe a que estos tratamientos eliminan a los linfocitos T involucrados en la inmunidad mediada por células (22). Pero, hay que recordar que los linfocitos T, no sólo están involucrados en reacciones inmunes mediadas por células, sino que también son requeridos como células de ayuda en la producción de anticuerpos humorales dirigidos contra una gran variedad de antígenos (6). De cualquier manera, las células de bazo de un ratón recuperado de la fase aguda de la enfermedad de Chagas, confieren protección a otros ratones, ya que se ha demostrado que la parasitemia disminuye y así mismo decrece la mortalidad (22).

Los macrófagos normales poseen la propiedad de fagocitar y degradar a los organismos ingeridos y desempeñan un papel importante en la resistencia inespecífica. En otros casos, las células linfoides sensibilizadas pueden activar a los macrófagos, que destruyen a los parásitos (6). En la tripanosomiasis se ha reconocido una actividad fagocítica de los macrófagos, y también ha sido demostrado, tanto in vitro como in vivo, el papel que los anticuerpos específicos tienen al promover la fagocitosis del parásito por los macrófagos (11). Igualmente, se ha observado que ratones vacunados con BCG (bacilo Calmette-Guérin) muestran una protección significativa contra

contra la enfermedad de Chagas, debido a la activación inespecífica de los macrófagos (31), lo cual es un factor de importancia en la resistencia a la infección.

Estimulación de linfocitos

Desde que Nowell observó que la fitohemaglutinina (PHA) inducía la proliferación de linfocitos humanos, se han descubierto una serie de mitógenos de células linfoides. Estos mitógenos estimulan selectivamente subpoblaciones de linfocitos. Por ejemplo, PHA y concavalina A (Con A) estimulan linfocitos T (2, 7, 30); mientras que el lipopolisacárido (LPS) (4, 7, 42, 46) y su componente activo lípido A, así como el polisacárido S III de neumococo y la flagelina polimerizada, transforman solamente linfocitos B. La mayoría de estos mitógenos tienen un peso molecular elevado y una estructura relativamente compleja, desconociéndose la base molecular de su actividad mitogénica (47). Mientras que un determinante antigénico estimula solo una pequeña proporción de los linfocitos, los mitógenos estimulan a la gran mayoría de ellos (2).

La respuesta de linfocitos a sustancias mitogénicas tales como PHA y Con A, ha permitido detectar una serie de características y eventos bioquímicos que conducen a la transformación blástica (47). La estimulación mitogénica ocurre cuando los receptores para Con A se agregan para formar pequeños racimos polares en la superficie del linfocito. Estos receptores están ligados con el sistema citoesquelético, que traduce el estado del receptor en la superficie de la célula al citoplasma, donde posteriormente ocu-

rren cambios, probablemente por medio de moléculas mensajeras como AMP cíclico, las cuales afectan la permeabilidad, transporte, metabolismo, fosforilación, acetilación, síntesis de RNA y cambios morfológicos celulares. Después de las 48 horas iniciales ocurre una síntesis activa de DNA y más tarde, las células entran en mitosis (30, 47).

Se ha demostrado que LPS de bacterias Gram negativas induce una síntesis de DNA en linfocitos B, así mismo, que es un antígeno timo-independiente capaz de estimular una respuesta inmune de células B en ausencia de células T. El LPS puede estimular a las células uniéndose de dos maneras: (i) inespecíficamente a receptores no globulínicos de las células B, lo cual conduce a la división celular; o bien, (ii) específicamente a receptores inmunoglobulínicos dirigidos contra los determinantes antigénicos del mitógeno en cuestión; de esta manera, las células también son activadas para la división (4).

Aunque existen evidencias que sugieren que LPS actúa directamente sobre las células B, estimulando la síntesis de DNA y la producción de Ig, informaciones recientes parecen indicar que se requiere de células T y macrófagos para inducir la mitogénesis por LPS (42). Esta dependencia por el macrófago ha sido también postulada con otros mitógenos. Así, subpoblaciones específicas de células T requieren necesariamente la presencia de macrófagos para que puedan ser activadas por mitógenos tales como Con A y PHA. Esto sugiere que los linfocitos presentan una cierta dependencia de los macrófagos ante la estimulación mitogénica (38).

Supresión de la respuesta inmune

Recientemente se ha reconocido que existe una variedad de sistemas celulares supresores que juegan un papel crítico en la regulación inmunológica. Así, se ha demostrado que las células supresoras juegan un papel activo en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, en el fenómeno de competencia antigénica, en el control de la hipersensibilidad tardía, en el control genético de la respuesta inmune, en la supresión alotípica e idiopática específica y en la limitación de la respuesta de anticuerpo a antígenos timo-independientes, antígenos timo-dependientes, así como también, a antígenos que estimulan la producción de anticuerpos reagnicos. La regulación de la respuesta inmune por células supresoras claramente involucra una serie de sistemas más que un solo mecanismo supresor.

Se ha demostrado que la mayoría de los tipos celulares requeridos para una respuesta inmune, son capaces de funcionar como células supresoras. De este modo, los monocitos, linfocitos B y especialmente los linfocitos T, han demostrado ser supresores para diferentes sistemas de regulación inmunológica (45).

Ciertas funciones reguladoras son antígeno o acarreador específicas, mientras que otras no son acarreador específicas, pero pueden ser específicas para un tipo de respuesta inmune. Por ejemplo, ciertas células T supresoras pueden inhibir la respuesta de anticuerpo a un solo hapteno-acarreador, mientras que otras pueden inhibir la respuesta de anticuerpo a todos los antígenos. Las células T supresoras de este último tipo, pueden regular la

producción de todas las clases de inmunoglobulinas, la producción de una sola clase de anticuerpos o la producción de inmunoglobulinas de un determinado alotipo o idiotipo. Otras células supresoras pueden afectar solamente las funciones de la respuesta inmune celular, sin alterar la inmunidad humoral. El papel de las células supresoras en el control fisiológico de la respuesta inmune ha sido objeto de recientes revisiones (5, 13, 18, 28, 41).

Por otro lado, la pérdida de la actividad de las células supresoras ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, tanto en modelos animales (3, 17) como el hombre (45).

En el presente trabajo se analiza la reactividad de los linfocitos de bazo de ratones infectados con I. cruzi a los mitógenos Con A y LPS, que como se ha mencionado, estimulan selectivamente a linfocitos T y B respectivamente. Así mismo, se observa el efecto de las células de bazo de ratones infectados con I. cruzi, sobre la respuesta de células de bazo de ratones normales a la estimulación con los mitógenos en mención.

MATERIAL Y METODOS

Ratones. Se emplearon ratones albinos hembras de la cepa BALB/c, con un peso promedio de 18 a 22 g. Los animales se colocaron en cajas de plástico con tapa de acero y se alimentaron con tabletas de Purina (Purina de México, S.A. de C.V.) y agua ad libitum.

Trypanosoma cruzi. Se utilizó una cepa mio-reticulotrópica, proporcionada por el Dr. F. Navarrete del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. Esta cepa ha sido mantenida en el laboratorio por pases sucesivos en ratón.

Solución salina balanceada de Hanks (SSB). La SSB consta de dos soluciones que contienen

Solución I:	dextrosa	10.00 g
	fosfato monopotásico	0.60 g
	fosfato disódico	1.85 g
	solución de rojo fenol al 0.5%	2.00 g
	Se aforó a 1000 ml con agua destilada.	

Solución II:	cloruro de calcio $2H_2O$	1.96 g
	cloruro de potasio	4.00 g
	cloruro de sodio	90.00 g
	cloruro de magnesio $6H_2O$	2.00 g
	sulfato de magnesio $7H_2O$	2.00 g
	Se aforó a 1000 ml con agua destilada.	

La solución de trabajo se prepara por dilución de 100 ml de la solución 1, con 700 ml de agua destilada, y 100 ml de solución 11. Todo se mezcla y se afora a un volumen final de 1000 ml con agua destilada. Por cada 100 ml de esta solución se adicionan 10,000 UI de penicilina y 10 mg de estreptomina. La SSB se esterilizó por filtración.

Medio de cultivo completo. Se disolvió el medio RPMI-1640 (Gibco, Gran Island, N.Y. cat. N° H-18) en el volumen de agua destilada indicado por el fabricante y se adicionó 2.0 g de bicarbonato de sodio por cada litro del medio. Cada 100 ml de este medio contiene:

- 5 ml Suero fetal bovino (Gibco cat. N° 614)
- 1 ml MEM aminoácidos no esenciales 100X (Gibco cat. N° 114)
- 1 ml Piruvato de sodio 100 mM (Gibco cat. N° 136)
- 1 ml Penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 µg/ml)
- 0.1 ml L-glutamina 200 mM (Gibco cat. N° 503)

El medio se esterilizó por filtración

Medio Nutritivo.

- 10 g dextrosa
 - 700 ml medio mínimo esencial (Gibco cat. N° H-18)
 - 100 ml aminoácidos esenciales 50X (Gibco cat. N° 113)
 - 50 ml aminoácidos no esenciales 100X (Gibco cat. N° 114)
 - 50 ml L-glutamina 200 mM (Gibco cat. N° 503)
- Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH, se agregó bicarbonato de sodio al 7.5% y se esterilizó por filtración.

Antisueros. El suero anti-timocito fue donado por el Dr. D.E. Parks, de la Institución Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA, U.S.A. El suero anti-Ig de ratón fue preparado en conejos inyectándoles gamma globulina pura de ratón incorporada en adyuvante completo de Freund (ACF). Los animales se inmunizaron con la Ig, administrándoles 3 inyecciones intramusculares de 1 mg c/u en 0.5 ml de ACF, con intervalos de una semana. El antisuero se inactivó por calor a 56°C durante 30 minutos, luego se absorbió con células de timo (10 ml de antisuero/10⁸ células) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se esterilizó por filtración.

Infección con T. cruzi. La infección experimental de los animales se llevó a cabo por inoculación intraperitoneal (i.p.) de 7x10³ tripomastigotes (51.6 LD 50). La suspensión de tripomastigotes se preparó a partir de la sangre de un animal infectado, el cual presentaba, a la observación microscópica directa de una gota de sangre, un gran número de parásitos. La sangre se diluyó con SSB heparinizada (10 U.I. de heparina/ml) a una concentración de 14x10³ parásitos por ml. Cada ratón recibió por vfa i.p. 0.5 ml de esta suspensión.

Determinación del nivel de parásitos en sangre. Los ratones inoculados con T. cruzi se sangraron a diferentes días después de la infección. La técnica consistió en obtener una gota de sangre cortando la extremidad de la cola del ratón previamente desinfectada con alcohol al 70%. Dicha gota se diluyó 1:20 con cloruro de amonio al 0.83%. Con la suspensión así preparada, se llenó una cámara de Neubauer y se determinó el número de tripomastigotes por ml.

Preparación de la suspensión de linfocitos. Se removieron asépticamente los bazos de los ratones por medio de instrumentos quirúrgicos, flameados con alcohol, y se colocaron en cajas de Petri de plástico estériles de 60x15 mm (Lux Scientific Corporation, Newbury Park, CA. cat. N° 5220), que contenían 5 ml de SSB a 4° C.

Los bazos se disgregaron con pinzas de disección de punta roma, esterilizadas previamente, hasta obtener una suspensión celular, la cual se transfirió con una pipeta Pasteur estéril, a tubos de plástico estériles de 15 ml (Falcon Plastics, Oxnard, CA cat. N° 2051). Las partículas gruesas se dejaron sedimentar durante 5 minutos sobre hielo y después, se transfirió el sobrenadante, que contenía las células, a tubos de plástico cónicos estériles de 50 ml (Falcon cat. N° 2070). La suspensión se centrifugó a 750 g durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada (PR 6000 Diamond). El sobrenadante se decantó y el paquete de células se lavó dos veces con SSB, centrifugando nuevamente a 750 g durante 10 minutos. Finalmente, el paquete de células se resuspendió en 10 ml de medio completo RPMI-1640 (Gibco) estéril. De esta suspensión se tomó una alícuota que se diluyó 1:20 con azul tripano al 4%. Con esta dilución se llenó una cámara de Neubauer y se contó el número de células linfoides viables, las cuales se ajustaron a 5×10^6 células/ml. De esta concentración se colocó 0.1 ml en cada orificio de una placa de microcultivo (Falcon cat. N° 3040 y 3041).

Cultivo de linfocitos. Una vez preparados los cultivos (5×10^6 células por cultivo), se estimularon con 2 µg/ml de Con A (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. cat. N° C-2010) y con 200 µg/ml de LPS 0111:B4 (Difco Labora-

tories, Detroit, MI cat. N° 3122-25) de Escherichia coli, y se incubaron 72 horas en una estufa con 5% de CO₂ en aire húmedo a 37°C. Durante el período de incubación se alimentaron los cultivos diariamente con una gota de medio nutritivo, el cual se preparó mezclando dos partes de medio nutritivo estéril con una parte de suero fetal bovino estéril.

Dieciocho horas antes de la cosecha celular, se agregó a cada cultivo 1 μ Ci de ³H-TdR (New England Nuclear, Boston, MA cat. N° NET 027). Al final del cultivo, se colocaron individualmente 0.1 ml de las suspensiones celulares en filtros de papel Whatman N° 3 y se secaron con una lámpara de infrarojo. Después se lavaron los filtros de la siguiente forma:

- 1.- Una vez, durante una hora con una solución de TCA al 10 % con 20 mg % de timidina fría.
- 2.- Dos veces durante 15 minutos cada una, con TCA al 5%.
- 3.- Dos veces durante 10 minutos cada una, con metanol.

Los filtros se secaron nuevamente y se colocaron individualmente en frascos especiales. A cada frasco se le adicionaron 10 ml de líquido de centelleo. La incorporación de ³H-timidina se determinó en un contador Mark III (Amersham/Searle Co., Chicago, Ill).

Determinación de células supresoras en el bazo de ratones infectados con T. cruzi. Para determinar la presencia de células supresoras en el bazo de animales infectados con T. cruzi, se hicieron mezclas de células de bazo

de ratón normal con células de bazo de ratón infectado en la proporción 1:1. De esta manera se tenía en cada cultivo 2.5×10^5 células de bazo de animales normales y 2.5×10^5 células de bazo de ratones infectados, con un total de 5×10^5 células por cultivo. Los cultivos se estimularon con Con A y LPS y se determinó la incorporación de timidina tritiada.

Susceptibilidad de la célula supresora al tratamiento con suero anti-timocito o suero anti-Ig de ratón. En este caso las células de bazo del animal normal y las del animal infectado se ajustaron inicialmente, a un volumen de 100×10^6 células por ml. Se colocó 1 ml de la suspensión de células normales en tubos estériles (Falcon cat. N° 2058) y se les adicionó: (i) 1 ml de medio completo (control), (ii) 1 ml de suero anti-timocito o (iii) 1 ml de suero anti-Ig. El mismo procedimiento se llevó a cabo para la suspensión de células del animal infectado. Las células se incubaron en un baño maría a 37°C durante 35 minutos. A continuación se agregaron 10 ml de SSB estéril a cada tubo y se centrifugó 10 minutos a 750 g . Se eliminó el sobrenadante y el paquete de células de cada tubo se resuspendió con 1 ml de complemento de cobayo previamente absorbido con eritrocitos de ratón normal. Las células se incubaron de nuevo en un baño maría a 37°C por 35 minutos. Después se lavaron por centrifugación, dos veces, con SSB estéril durante 10 minutos a 750 g . Finalmente, se resuspendió cada paquete de células con 2 ml de medio completo. A continuación, se hicieron mezclas de células de bazo de ratón normal con células de bazo de ratón infectado previamente tratadas con ambos antisueros, manteniendo una proporción de 1:1. Finalmente, se estimularon los cultivos celulares con Con A y LPS, y se determinó la incorporación de ^3H -timidina.

Análisis estadístico. Se usó la prueba de Fisher para determinar la homogeneidad de varianzas entre los grupos de animales. Para determinar la significancia de las diferencias, se usó la prueba t de Student cuando las varianzas fueron homogéneas, y la prueba de U de Mann-Whitney, cuando éstas fueron heterogéneas (37). Los resultados se expresaron como índices de estimulación:

$$IE = \frac{\text{cpm del cultivo estimulado}}{\text{cpm del cultivo control no estimulado}}$$

ó como por ciento de supresión en relación a los cultivos controles estimulados con los mitógenos.

RESULTADOS

Determinación del nivel de parásitos en sangre. Las cuentas tomadas de los parásitos en sangre de ratones infectados con tripomastigotes de T. cruzi se muestran en la Fig. 2. Como puede observarse, se encontraron parásitos a partir del cuarto día de infección. El número de tripomastigotes aumentó paulatinamente a lo largo de la infección, alcanzando su máximo el día 25.

Respuesta de las células de bazo de ratón infectado con T. cruzi a la estimulación con los mitógenos Con A y LPS. Durante los primeros días de la infección con T. cruzi, la síntesis de ADN en las células de bazo de los ratones infectados como respuesta al estímulo de los mitógenos Con A y LPS, es similar a la respuesta observada en los grupos controles. Sin embargo, después del día 14, las células de los animales infectados mostraron una disminución en la respuesta a ambos mitógenos. Dicha disminución es más evidente cuando se estimula con Con A. Esto indica que posiblemente existe una mayor supresión sobre las células T que las células B (Fig. 3).

Efecto de las células de bazo de ratón infectado con T. cruzi sobre las células de bazo de ratón normal. Al llevar a cabo el sistema de mezcla de células, se observó que las células de bazo de ratones infectados por al menos 15 días, suprimían a las células de bazo de los ratones normales, en su habilidad a responder a los mitógenos Con A y LPS (Fig. 4). La síntesis de ADN manifestada en dicho sistema de mezcla de células, es menor que la respuesta de las células de bazo de ratón normal a la estimulación con los mitógenos mencionados (tabla 1).

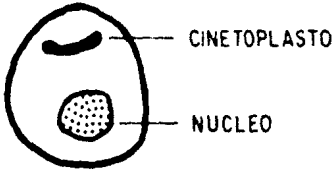
Caracterización de células supresoras. Con el fin de determinar qué célula era la responsable de la actividad supresora, las células de bazo de ratón infectado fueron tratadas con un suero anti-timocito o un suero anti-Ig más complemento. Al tratar células de bazo de ratón normal con el suero anti-timocito más complemento, la respuesta a la estimulación con el mitógeno específico para células T (Con A) se suprimió marcadamente, mientras que la respuesta de las mismas células al LPS sólo se encontraba ligeramente disminuida. Por otra parte, al mezclar las células de bazo de ratón normal con las células de bazo de ratón infectado previamente tratadas con anti-timocito + C', no se manifestó ninguna supresión de la respuesta a ambos mitógenos. Esto indica que la célula responsable del efecto supresor es un linfocito derivado del timo (Fig. 5).

La actividad supresora de las células de bazo de ratones infectados no se eliminó al tratarlas con suero anti-Ig más complemento, con lo cual se demuestra que las células B no son las responsables del fenómeno supresivo de la respuesta a los mitógenos mencionados (Fig. 6).

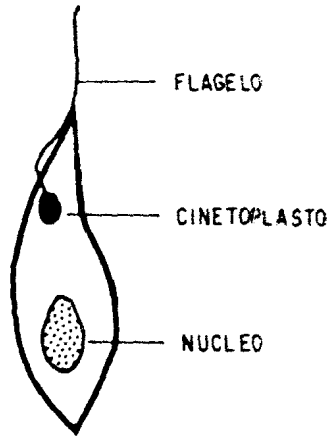
Figura 1 :

Diagrama que ilustra los tres estadios morfológicos del Trypanosoma cruzi

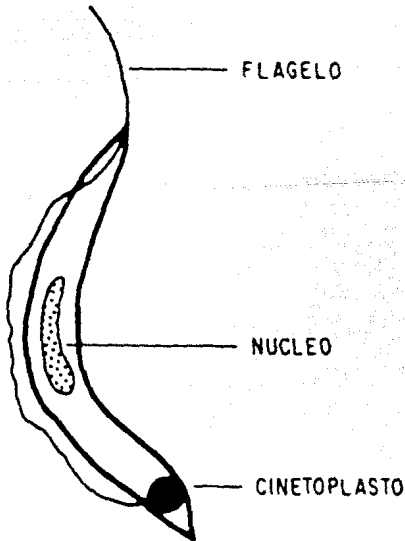




AMASTIGOTE
(LEISHMANIA)



EPIMASTIGOTE
(CRITHIDIA)



TRIPOMASTIGOTE
(TRIPANOSOMICO)

Figura 2 :

Determinación de parásitos en sangre a diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación i.p. de ratones BALB/c con T. cruzi (51.6 LD₅₀). Cada punto representa el promedio de la cuenta en 5 animales \pm error estandar.

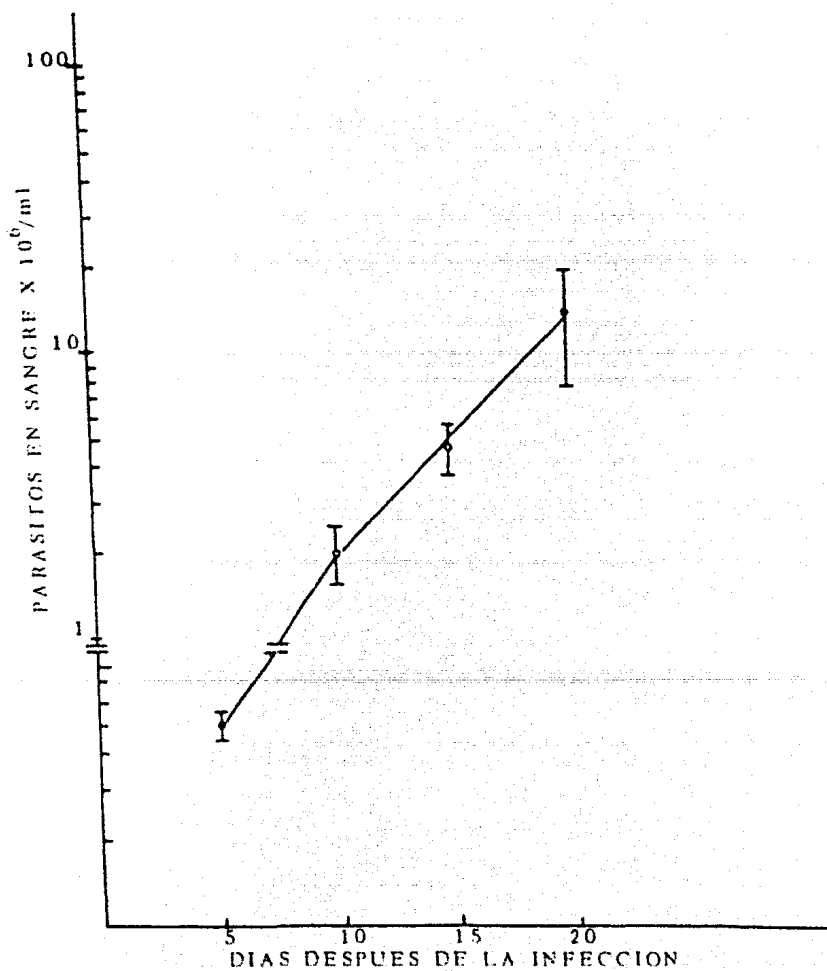


Figura 3 :

Respuesta mitogénica de células de bazo de ratón infectado con I. cruzi. Se cultivaron 5×10^5 células de bazo obtenidas a diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación con I. cruzi (51.6 LD₅₀), en 0.2 ml de medio completo durante 3 días, en presencia de Con A o LPS. Las células se marcaron con 1.0 μ Ci de ³H-TdR en las últimas 24 horas del cultivo. Los resultados están expresados como índices de estimulación (estimulado/no estimulado) de los cultivos \pm error estándar.

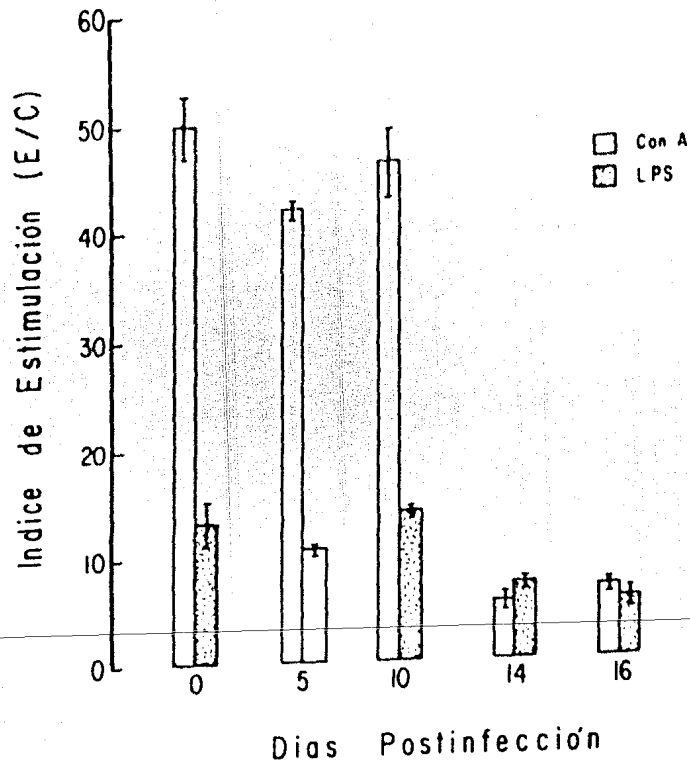


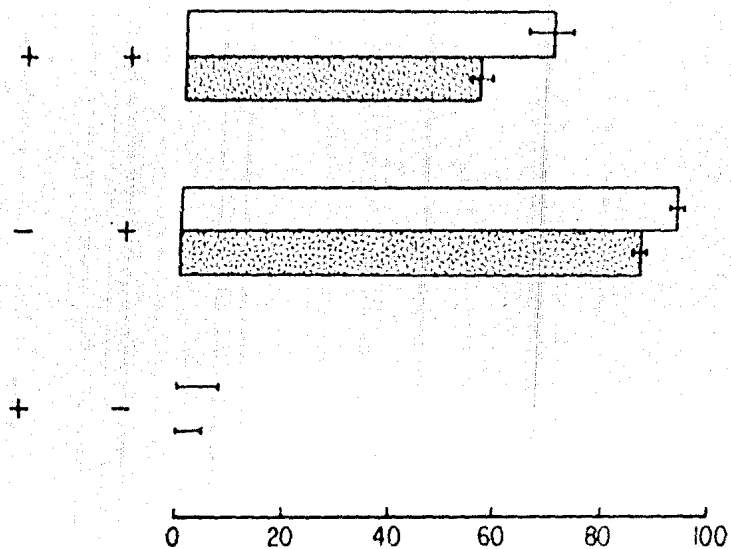
Figura 4 :

Supresión de la mitogénesis por células de bazo infectadas con I. cruzi. Se cultivaron 2.5×10^5 células de bazo de ratón infectado con I. cruzi con 2.5×10^5 células de bazo de ratón normal en 0.2 ml de medio completo durante tres días, en presencia de Con A o LPS. Se marcaron las células con 1.0 μ Ci de $^3\text{H-TdR}$ en las últimas 24 horas del cultivo. Los resultados están expresados como por ciento de supresión en relación a la estimulación mitogénica de los cultivos controles.

COMPOSICION DEL CULTIVO
DE CELULAS DE BAZO

Normal Infectado

Con A
LPS



% Supresión

Figura 5 :

Efecto del tratamiento con suero anti-timocito sobre la supresión de la mitogénesis por células de bazo infectadas con I. cruzi. Se cultivaron 2.5×10^5 células de bazo de ratón infectado con I. cruzi y tratadas con suero anti-timocito + C', con 2.5×10^5 células de bazo normal en 0.2 ml de medio completo durante tres días, en presencia de Con A o LPS. Las células se marcaron con 1.0 μ Ci de ^3H -TdR en las últimas 24 horas del cultivo. Los resultados están expresados como por ciento de supresión en relación a la estimulación mitogénica de los cultivos controles.

Composición del cultivo de células de bazo

Con A
 LPS

Normal Infectado

sin tratar

sin tratar

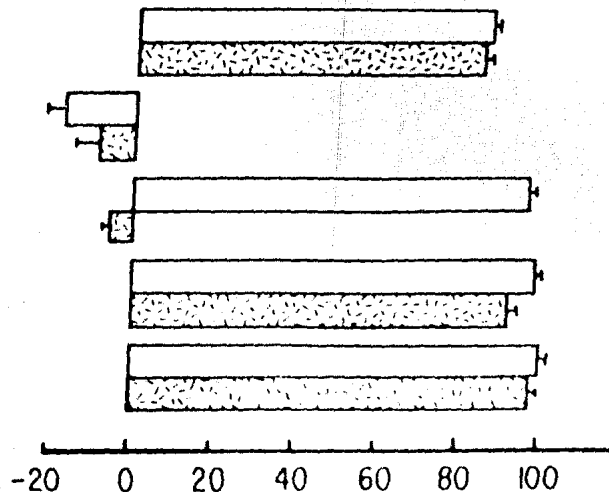
sin tratar

tratado

tratado

sin tratar

tratado



% de Supresión

Figura 6 :

Efecto del tratamiento con suero anti-Ig de ratón sobre la supresión de la mitogénesis por células de bazo infectadas con T. cruzi. Se cultivaron 2.5×10^5 células de bazo de ratón infectado con T. cruzi y tratadas con suero anti-Ig de ratón + C', con 2.5×10^5 células de bazo normal en 0.2 ml de medio completo durante tres días, en presencia de Con A o LPS. Las células se marcaron con 1.0 μ Ci de $^3\text{H-TdR}$ en las últimas 24 hrs del cultivo. Los resultados están expresados como por ciento de supresión en relación a la estimulación mitogénica de los cultivos controles.

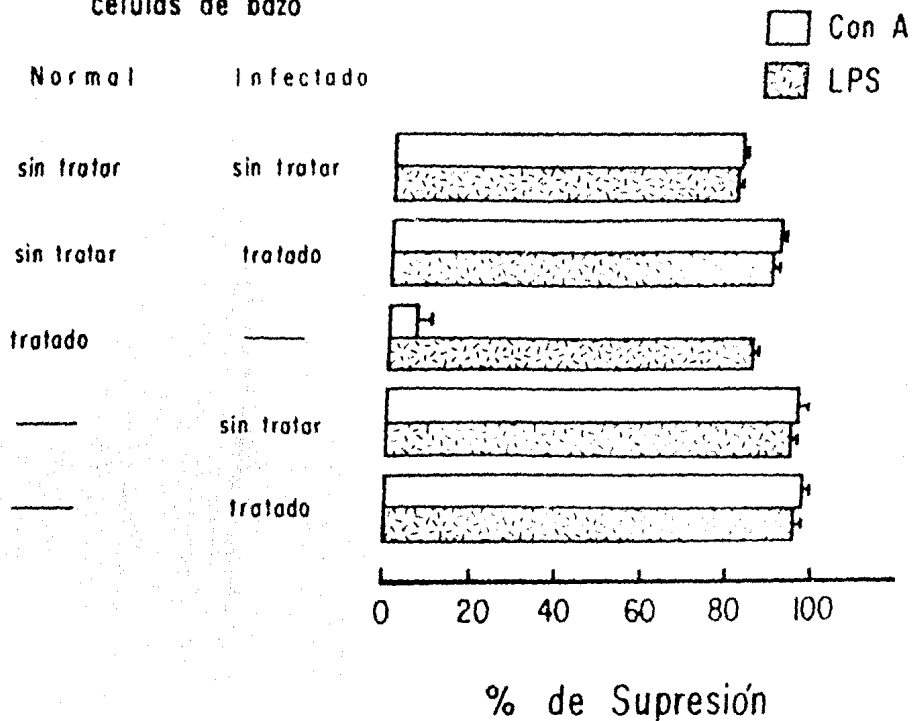
T A B L A I

Efecto supresor de células de bazo obtenidas de ratones infectados con T. cruzi*

Células	estimulado / no estimulado (cpm)	
	Con A	LPS
N	69.04	33.81
I	6.92	3.82
N + I (1:1)	13.09	5.91
% supresión	81.04	82.52

* 17 días postinfección

Composición del cultivo de células de bazo



fectados con T. cruzi existe una supresión de la respuesta inmune humoral tanto para antígenos timo-independientes como para timo-dependientes, y como de no se demuestra una alteración de los macrófagos. Este hecho está confirmado en otros experimentos donde se observa una activación de los macrófagos durante la enfermedad de Chagas (32). Esta activación se manifiesta por su habilidad a eliminar de la circulación partículas de carbón coloidal y por su capacidad de digerir organismos intracelulares filogenéticamente no relacionados (32). Inclusive se ha demostrado que la activación previa de los macrófagos, infiere protección contra la infección causada por dicho parásito (31).

En la tripanosomiasis parece haber una correlación entre parasitemia, esplenomegalia y supresión de la respuesta inmune (1). Es decir, conforme avanza la infección y el nivel de parásitos, el tamaño del bazo y la manifestación de la supresión es mayor (12, 35).

Algunos autores opinan que la depresión puede resultar de una falla a nivel de las células B, o de un mecanismo regulador a nivel de las células T (34). Esto es apoyado por los experimentos realizados por Jayawardena y Ustman (24), en ratones infectados con T. brucei y donde la inmunosupresión observada es mediada por células T supresoras. Las células T pueden ayudar o suprimir la respuesta inmune en forma específica o inespecífica (14). Gershon y col. (19) han demostrado que células T pueden suprimir directamente la respuesta de otras células T, sin la intervención de anticuerpos; esto sugiere la existencia de poblaciones de células T de ayuda y de células T supresoras. Recientemente se ha demostrado la existencia paralela de ambas po-

DISCUSION

Los resultados obtenidos indican que ratones infectados con tripomastigotes de T. cruzi presentan una respuesta disminuida a mitógenos específicos, tanto para células T como para células B. Dicha supresión manifestada in vitro, está en relación al tiempo de infección de los animales; es decir, a medida que aumenta el nivel de parásitos en circulación, la falta de respuesta a Con A y LPS, se acentúa. Esto mismo se corrobora al inicio de la infección cuando la respuesta de los linfocitos de bazo de ratones infectados es completamente normal (Fig. 3), mientras que, a los 14 días de infección, cuando la parasitemia es elevada, es anormal y se manifiesta con una disminución a la respuesta mitogénica. Los datos que se presentan en este trabajo indican la existencia de una población de células supresoras en el bazo de los ratones infectados con T. cruzi, ya que estas células son capaces de inhibir la respuesta de células de bazo normal a los mitógenos Con A y LPS.

Se ha observado que en varias infecciones parasitarias causadas por protozoarios se manifiesta en el huésped una supresión de la respuesta inmune, tanto humoral como celular. Este fenómeno ha sido observado en infecciones causadas por T. brucei (12, 15, 21, 24), T. musculi (1) y por T. cruzi (10, 34, 35, 39), de una forma tanto específica como inespecífica. Los mecanismos involucrados en dicha supresión son varios y complejos y aún no han sido bien esclarecidos.

Estudios hechos por Ramos y col. (34) han demostrado que en ratones in-

blaciones de células T (9). Otros autores suponen que el factor responsable de la inmunosupresión es una sustancia metabólica liberada por el parásito, la cual puede ser citotóxica para los linfocitos inmunocompetentes. También se ha postulado la participación del interferón, ya que éste puede modificar, en cierta forma, tanto linfocitos T como B (10).

En la tripanosomiasis africana, Eardley y Jayawardena (15), mencionan que la inmunosupresión se debe posiblemente, a una competencia antigénica, o a factores solubles producidos por células T de ratones infectados. Por otra parte, Albright y col. (1, 12) postulan que los parásitos pueden activar células T supresoras u otras células supresoras de un modo inespecífico, quizás análogo al fenómeno de competencia antigénica. También es posible que los parásitos produzcan sustancias supresivas (15).

En nuestros experimentos, la población de células infectadas que suprime la respuesta de células normales a los mitógenos, es sensible al tratamiento con el suero anti-tímocito más complemento, como lo demuestra el experimento de mezcla de células, donde la supresión fue anulada cuando se aplicó dicho tratamiento (Fig. 5). Sin embargo, el tratamiento con anti-Ig más complemento, no eliminó la actividad supresora de las células de bazo de ratones infectados (Fig. 6). Estos datos indican que las células responsables de la supresión y presentes en los animales infectados con T. cruzi son linfocitos T, o bien, células que dependen para su funcionamiento de estos linfocitos y no de las células B. Es posible que esta población de células sean las responsables tanto de la inmunosupresión humoral (1, 15) como celular (24, 38) previamente observadas. En experimentos similares, en ratones infec-

tados con T. brucei se ha determinado la existencia de células T supresoras sensibles al tratamiento con anti-timocito + C' (24).

Opuestamente a lo esperado, el tratamiento de las células de bazo infectadas, con anti-timocito más complemento, no restituyó la capacidad de las mismas para responder al LPS (Fig. 5), indicando que la respuesta inmune de las células B no es normal. Esto mismo se ha observado en experimentos hechos por Eardley y Jayawardena (15), en ratones infectados con T. brucei, donde la respuesta de las células B a la estimulación con un mitógeno no se normaliza cuando se adiciona anti-timocito + C'.

La participación de células T supresoras se ha implicado en otras enfermedades causadas por protozoarios del género Trypanosoma, donde se ha detectado una inmunosupresión tanto de la respuesta humoral como celular. Sin embargo, se desconoce su participación en la patogenia de la enfermedad de Chagas (15).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albright, J.F., Albright, J.W. y Dusanic, D.G. (1977). x Trypanosome-induced splenomegaly and suppression of mouse spleen cells responses to antigen and mitogens. *J. Reticuloendoth. Soc.* 21:21.
- 2.- Anderson, J. y Melchers, F. (1976). Lymphocyte stimulation by Concanavalin A. *En H. Bittiger y H.P. Schnebli, eds., Concanavalin A as a Tool.* John Wiley & Sons, London, p. 505.
- 3.- Allison, A.C., Denman, A.M. y Barnes, R.D. (1971). Cooperating and controlling functions of thymus-derived lymphocytes in relation to auto-immunity. *Lancet* 2:135.
- 4.- Anderson, J., Sjoeborg, O. y Moeller, G. (1972). Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides. *Eur. J. Immunol.* 2:349.
- 5.- Asherson, G.L. y Zembala, M. (1976). Inhibitory T cells. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 72:56.
- 6.- Bloom, B.R. y Rowen, A. (1973). Cell-mediated immunity in Chagas' disease. WHO meeting on immunology of Chagas' disease. México, Dec. 3-7.

- 7.- Brunson, K.W. y Watson, D.W. (1975). Concanavalin A preparations with activities related to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 115:599.
- 8.- Budzko, D.B., Pizzimenti, M.C. y Kierzenbaum, F. (1975). Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood of T. cruzi. *Infect. Immun.* 11:86.
- 9.- Chan, E.L. y Henry, C. (1976). Coexistence of helper and suppressor activities in carrier-primed spleen cells. *J. Immunol.* 117:1132.
- 10.- Clinton, B.A., Ortiz-Ortiz, L., García, W., Martínez, T. y Capín, R. (1975). Trypanosoma cruzi: Early immune response in infected mice. *Exp. Parasitol.* 37:417.
- 11.- Cohen, S. (1974). The immune response to parasites. En R. Porter y J. Knight, eds., *Parasites in the immunized host: Mechanisms of survival*. Associated Scientific Publishers, Amsterdam, p.3.
- 12.- Corsini, A.C., Clayton, Ch., Askonas, B.A. y Ogilvie, B.M. (1977). Suppressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with T. brucei. *Clin. Exp. Immunol.* 29:122.
- 13.- Droege, W. (1974). Five questions on the suppression effect of thymus derived cells. *Cur. Titles Immunol. Transplant. Allergy* 1:13.

- 14.- Eardley, D.D. y Gershon, R.K. (1976). Induction of specific suppressor T cells in vitro. J. Immunol. 117:313.
- 15.- Eardley, D.D. y Jayawardena, A.N. (1977). Suppressor cells in mice infected with T. brucei. J. Immunol. 119:1029.
- 16.- Feldmann, M. (1976). Cellular basis of immune sensitization. En S. Cohen y E.H. Sadun, eds., Immunology of parasitic Infections. Blackwell, Oxford, p.1.
- 17.- Gerber, N.L., Hardin, J.A. y Chused, T.M., et al. (1974). Loss with age in NZB/W mice of thymic suppressor cells in the graft vs. host reaction. J. Immunol. 113:1618.
- 18.- Gershon, R.K. (1974). Tcell control of antibody production. En M.D. Cooper y N.L. Warner, eds., Contemporary Topics in Immunobiology, vol. 3. Plenum Press, New York, p.1.
- 19.- Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R. y Liebhaber, S.A. (1972). Suppressor T cells. J. Immunol. 108:586.
- 20.- González-Cappa, S., Schmuñis, T., Traversa, O., Yanovsky, J. y Parodi, A. (1958). Complement-fixation tests and experimental immunization with antigens of Trypanosoma cruzi prepared under pressure. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17:709.

- 21.- Goodwin, S., Green, D.G., Guy, H.H. y Voller, A. (1972). Immuno-suppression during trypanosomiasis. Br. J. Exp. Pathol. 53:40.
- 22.- Hanson, W.L. (1976). Immunology of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). En S. Cohen y E.H. Sadun, eds., Immunology of parasitic Infections. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 222.
- 23.- Hanson, W.L. (1973). Laboratory animal models (CF, Albino mice and CDF Albino rats) of acute Chagas' disease in the study of immune mechanisms and immunizing agents. WHO meeting on immunology of Chagas' disease. México, Dec. 3-7.
- 24.- Jayawardena, A.N. y Waksman, B.H. (1977). Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. Nature 265:539.
- 25.- Kierzenbaum, F. (1973). Brief Review of the role of antibodies in immunity to Chagas' disease. WHO, México, Dec. 3-7.
- 26.- Lumsden, W.H.R. y Ketterige, D. (1973). Chagas' disease parasitological aspects. WHO, México, Dec. 3-7.
- 27.- Mackie, T., Hunter, G. y Worth, B. (1954). A manual of tropical medicine. W.B. Saunders Company, Philadelphia & London, pp. 328, 363.
- 28.- Moeller, G. (1975). Suppressor T Lymphocytes. Transplant Rev., vol. 26.

- 29.- Montufar, O., Musatti, Ch., Mendes, E. y Mendes, N. (1977). Cellular immunity in chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 5:401.
- 30.- Nicolson, G.L. (1976). Concanavalin A: The tool, the techniques and the problems. En H. Bittiger y H.P. Schnebli, eds., *Concanavalin A as a tool*. John Wiley & Sons, London, p. 3.
- 31.- Ortiz-Ortiz, L., González Mendoza, A. y Lamoyi, E. (1975). A vaccination procedure against T. cruzi infection in mice by nonspecific immunization. *J. Immunol.* 114:1424.
- 32.- Ortiz-Ortiz, L., Ortega, T., Capín, R. y Martínez, T. (1976). Enhanced mononuclear phagocytic activity during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 50:232.
- 33.- Piekarski, G. (1961). *Tablas de Parasitología Médica*. Farben-fabriken Bayer A.G. Leverkusen, Bonn, p. 19.
- 34.- Ramos, C., Lamoyi, E., Feoli, M., Rodríguez, M. Pérez, M. y Ortiz-Ortiz, L. (1978). Trypanosoma cruzi: Immunosuppressed response to different antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.* 45:190.
- 35.- Reed, S.G., Larson, C.L. y Speer, C.A. (1977). Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. *Z. Parasitenk.* 52:11.

- 36.- Reis, A., Chiari, C., Tanus, R. y Andrade, I. (1976). Cellular immunity to Trypanosoma cruzi infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 18:422.
- 37.- Rohlf, F.J. y Sokal, R.R. (1969). Statistical tables. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- 38.- Rosenstreich, D.L., Farrar, J.J. y Dougherty, S. (1976). Absolute macrophage dependency of T lymphocyte activation by mitogens. J. Immunol. 116:131.
- 39.- Rowland, E.C. y Kuhn, R.E. (1978). Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infections. Infect. Immun. 20:393.
- 40.- Schmuñis, G., Vattuone, A., Szarfman, A. y Pesce, U. (1973). Cell mediated immunity in mice inoculated with epimastigotes or trypanomastigotes of T. cruzi. Z. Tropenmed. Parasit. 24:81.
- 41.- Sinkal, S.K. y Sinclair, N.R.St.C. (1975). Suppressor Cells in Immunity. International Symposium. University of Western Ontario, Canada.
- 42.- Skidmore, B.J., Chiller, J.M., Morrison, D.C. y Weigle, W.O. (1975). Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): Correlation between the mitogenic adjuvant and - immunogenic activities. J. Immunol. 114:770.

- 43.- Tschudi, E.I., Anziano, D.F. y Dalmaso, A.P. (1972). Lymphocyte transformation in Chagas' disease. *Infect. Immun.* 6:905.
- 44.- Vattuone, N., González Cappa, S., Menes, S. y Schmuñis, G. (1974). Cell mediated and humoral immune response of mice infected with T. cruzi. *Z. Tropenmed. Parasit.* 25:267.
- 45.- Waldmann, T.A. y Broder, S. (1977). Suppressor Cells in the Regulation of the Immune Response. En R.S. Schwartz, ed., *Prog. Clin. Immunol.*, vol. 3. Grune & Stratton, New York, p. 155.
- 46.- Watson, J., Riblet, R., Cohn, M., Skidmore, B.J., Chiller, J.M. y Weigle, W.O. (1976). The mitogenic activity of bacterial lipopolysaccharide as a probe for T cell function. En J.J. Oppenheim y D.L. Rosenstreich, eds., *Mitogens in Immunobiology*. Academic Press, New York, p. 245.
- 47.- Weinstein, Y., Melmon, K.L. y Segal, S.H. (1976). Cyclic nucleotide effects on the mitogenesis of splenic B and T lymphocytes. En J.J. Oppenheim y D.L. Rosenstreich, eds., *Mitogens in Immunobiology*. Academic Press, New York, p. 119.
- 48.- World Health Organization. (1974). Immunology of Chagas' disease. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 50:459.

A José Luis:

**Con admiración y respeto por haberme
introducido en el apasionante mundo
de la investigación.**

A mis padres:

Con respeto y amor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Vacunas Experimentales, Departamento de Microbiología del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Luis Molinari Soriano.