

35  
200



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

INFLUENCIA DE LA PARASITOSIS CAUSADA POR  
Trypanosoma Cruzi SOBRE LA RESPUESTA  
INMUNOLOGICA HUMORAL A LA  
VACUNA D. P. T.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO

P R E S E N T A :  
MARTIN EMILIANO ROSAS PEREZ



1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# C O N T E N I D O

FUNDAMENTO DEL TEMA.....	1
INTRODUCCION	
Enfermedad de Chagas. Importancia y distribución.....	3
<u>Trypanosoma cruzi</u> y tripanosomiasis americana .....	8
Vacuna D.F.T. Enfermedades contra las que confiere protección .....	13
<u>T. cruzi</u> ; Enfermedad de Chagas e Inmunosupresión .....	16
Inmunosupresión durante la enfermedad de Chagas .....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
OBJETIVO.....	27
HIPOTESIS DE TRABAJO .....	27
MATERIAL.....	28
EQUIPO.....	29
REACTIVOS.....	29
MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
METODOS	
Procedimiento para la cuenta de <u>T. cruzi</u> .....	32
Procedimiento para el sangrado del ratón .....	32
Inoculación de <u>T. cruzi</u> .....	33
Preparación de material y soluciones .....	34
Ajuste de la suspensión de <u>B. pertussis</u> .....	34
Técnica de depilación del cobayo .....	35
Titulación de anticuerpos contra la toxina diftérica ..	36
Titulación de anticuerpos contra la toxina tetánica..	38
Ensayo de aglutinación para <u>B. pertussis</u> .....	41
DESARROLLO EXPERIMENTAL	
Consideraciones previas .....	44
Diseño experimental .....	46
RESULTADOS .....	47
DISCUSION .....	50
CONCLUSIONES .....	53
BIBLIOGRAFIA .....	57
ANEXO .....	65

## FUNDAMENTO DEL TEMA

Muchas de las enfermedades, tanto del hombre como de los animales, cuya etiología se conoce, son producidas por agentes biológicos.

La importancia que siempre se ha dado a las enfermedades infecciosas en la medicina se debe, en gran parte, a su enorme frecuencia, a sus implicaciones en la salud pública y a la contagiosidad de muchas de ellas. Es preciso señalar que el progreso de la ingeniería sanitaria, el control de vectores, la quimioterapia específica y las técnicas de inmunización las han modificado favorablemente. Si bien hay todavía importantes excepciones, las enfermedades infecciosas, en conjunto, se pueden prevenir y controlar con mayor facilidad que cualquier otro grupo importante de padecimientos, mediante procedimientos de inmunización, ya que estos se encuentran entre las medidas más eficaces y económicas disponibles en la actualidad.

Los procedimientos de inmunización, ya sea que utilicen microorganismos vivos atenuados, virulentos inactivos o productos derivados, llevan como propósito desarrollar anticuerpos y estimular la inmunidad celular, que mientras persistan por arriba de ciertos niveles, serán responsables de un estado de inmunidad específico contra los microorganismos o los antígenos participantes en la vacunación. Para evitar la declinación de la inmunidad, a menudo se requiere de la aplicación de dosis de refuerzo que vuelvan a estimular la memoria inmunológica.

Varios factores juegan un papel importante en la adquisición de inmunidad, encontrándose entre ellos la quimioterapia, la raza, las infecciones, la desnutrición, el sexo y la edad.

Salvo condiciones particulares, los procedimientos de inmunización deben ser utilizados en personas sanas. Padecimientos agudos tales como infecciones respiratorias, ataques -

convulsivos, lesiones cutáneas, procesos febriles, etc., re-  
presentan, en la mayoría de los casos, contraindicaciones a la  
vacunación, por lo que esta debe posponerse hasta que dichas -  
alteraciones desaparezcan. Igualmente, los productos a base de  
gérmenes vivos atenuados, no deben administrarse a individuos  
con enfermedades malignas o tratamiento con inmunosupresores,  
en quienes están afectados los mecanismos de inmunidad celular  
y/o humoral, condición que conducirá a resultados que no con -  
cuerden con los esperados.

## I N T R O D U C C I O N

### ENFERMEDAD DE CHAGAS. IMPORTANCIA Y DISTRIBUCION.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana está limitada al Hemisferio Occidental, con amplia distribución en zonas rurales de México, América Central y del Sur. El problema epidemiológico y de salud pública que representa en América Latina este padecimiento es tal, que aproximadamente 35 - millones de personas se hallan expuestas a él y por lo menos 10 millones se hallan infectadas, siendo los países del Cono Sur los más afectados (1,2,3). Al parecer, la enfermedad tiene menor importancia en México y Centroamérica, debido quizás a diferencias en virulencias de las distintas cepas de Trypanosoma cruzi (1,3), el agente causal de la enfermedad. No obstante, en México se ha logrado el aislamiento de cepas de alta virulencia (4) para los animales de experimentación.

El número de casos humanos diagnosticados, aún cuando no es muy elevado, sí revela que la tripanosomiasis americana no es una enfermedad ocasional o rara en nuestro país.

El no haber encontrado muchos casos humanos para considerarla una infección importante en México, puede deberse a que los trabajos que hasta la fecha se han venido efectuando son realmente pocos y no han alcanzado ni la amplitud ni la profundidad que sería de desearse (5).

Por otro lado, la enfermedad clínicamente manifiesta, no se diagnostica con frecuencia por falta de experiencia, y la falta de recursos de laboratorio, sobre todo en las áreas endémicas (6,7,8). Esto impide que el médico cuente con datos que le ayuden a establecer un diagnóstico apropiado (4). Estos problemas provocan que la información que se refiere a la distribución, prevalencia y gravedad de la enfermedad de Chagas en México sea limitada.

La existencia de la enfermedad de Chagas en México se hizo evidente desde que en 1940 se registró el primer caso humano (9). Estudios posteriores han revelado la existencia de T. cruzi en sangre de humanos infectados o en fibras musculares cardíacas de casos de autopsia (4,10).

El padecimiento cobra importancia paulatinamente en nuestro medio y su distribución geográfica que hasta hace escasos años se consideraba limitada al sur del país, se ha ampliado hasta abarcar gran parte de éste (4).

Tanto el gran número de vertebrados no humanos que albergan el parásito, como de insectos transmisores de T. cruzi, y su amplia dispersión por el territorio nacional (4), indica que el problema es más grave de lo que originalmente se creía.

Se han encontrado más de diez especies de triatomos infectados con T. cruzi, principalmente de los géneros Triatoma, Rhodnius y Panstrongylus, distribuidos en aproximadamente un 70% de la República Mexicana (11,12,13).

Una vivienda muy infectada puede contener varios cientos de triatomos, alrededor del 70% de los cuales posiblemente estén infectados. En estas circunstancias, la prevalencia de la enfermedad entre sus habitantes puede aproximarse al 100% (14).

La importancia del padecimiento es apoyada por los hallazgos de una búsqueda no intencionada de la infección aguda por tripanosomas americanos, Efectuada por la Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo (5). Pese a ser el objetivo principal de las brigadas de la Comisión efectuar la pesquisa domiciliaria de febriles, se encontraron 74 enfermos con la distribución geográfica que se indica en la tabla 1.

En la tabla 2 y figura 1 se señalan los lugares de la República Mexicana donde se han encontrado casos humanos y de triatomos infectados con T. cruzi.

En la actualidad se considera como zona endémica probable, por haberse encontrado o bien casos humanos o bien triatominos infectados, toda región con una altitud inferior a los 1800 m. sobre el nivel del mar (15). Es importante señalar que la gran mayoría de los casos humanos diagnosticados se encuentran en las localidades situadas en la vertiente del Pacífico, de norte a sur, lo cual inclina a pensar que en ella existe un mayor número de especies de triatominos con hábitos altamente domésticos, capaces de transmitir al parásito. Comparativamente, los triatominos que se encuentran en la vertiente del Golfo son mucho menores en número de especies y con hábitos de domesticidad menos marcados (4).

La enfermedad afecta a un considerable sector de la población, particularmente a aquél que habita en las áreas rurales en las que casi no se cuenta con servicios médicos, y el padecimiento pasa inadvertido y/o confundido con otros cuya evolución clínica presenta datos poco característicos (5). Al parecer, la enfermedad es más frecuente en niños de 1 a 4 años de edad (4).

En conclusión, aunque no se sabe la frecuencia con que se presenta y por lo mismo no puede aún considerarse un problema de salud pública, sí se sabe que la enfermedad de Chagas se notifica con relativa frecuencia, y que las cepas de T. cruzi autóctonas pueden producir en el hombre enfermedad severa e incluso la muerte (16).

Por lo expresado, es deseable que los médicos e investigadores amplíen los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en México.



T A B L A I

CASOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS REPORTADOS EN 1976  
POR LA C.N.R.F. EN UNA BUSQUEDA NO INTENSIONADA.

<u>ENTIDAD FEDERATIVA</u>	<u>No. DE CASOS</u>
CHIAPAS	30
GUANAJUATO	2
GUERRERO	1
HIDALGO	1
JALISCO	14
MICHOACAN	1
NAYARIT	1
OAXACA	11
TABASCO	1
VERACRUZ	3
ZACATECAS	7
T O T A L	74

Tomado de (5).

T A B L A 2

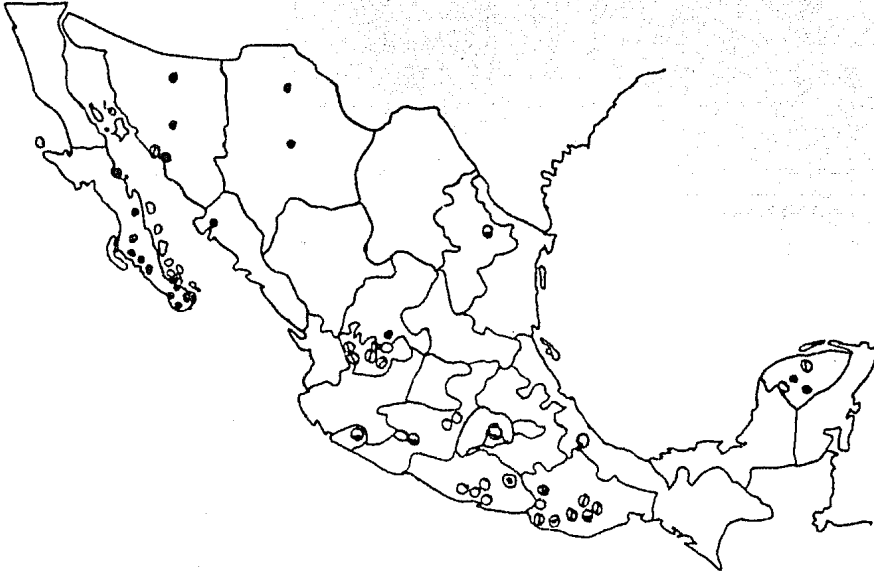
ENFERMEDAD DE CHAGAS EN  
MEXICO. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE CASOS POSITIVOS  
(HASTA 1970)

<u>ESTADO</u>	<u>No DE CASOS</u>	<u>%</u>
GUERRERO	21	38.1
JALISCO	2	3.6
MEXICO	2	1.8
MICHOACAN	16	29.0
OAXACA	5	9.0
SONORA	1	1.8
YUCATAN	2	3.6
ZACATECAS	3	5.5
NO DETERMINADOS	4	7.6
T O T A L	55	100.0

Tomado de (15).

FIGURA 1

Lugares de la República Mexicana en que se han encontrado casos de enfermedad de Chagas



- Localidades donde se han encontrado vertebrados no humanos infectados por Trypanosoma cruzi.
- Localidades donde se han encontrado triatominos infectados por Trypanosoma cruzi en nidos de diversas especies de Neotoma (rata de campo) o de otros animales.

CASOS HUMANOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS.      No. de casos.

● Demostración de <u>Trypanosoma cruzi</u> .	19
○ Fijación de complemento.	45
◎ Autopsias con miocarditis Chagásica posible.	8

Trypanosoma cruzi y tripanosomiasis americana.

El agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es el Trypanosoma cruzi, descrito por Carlos Chagas en el intestino y deyecciones de una chinche de la familia Reduviidae colectada en Brasil en el año de 1909 (11).

El parásito es un organismo pleomórfico. En sangre se le encuentra como tripomastigote sanguíneo, que posee flagelo y membrana ondulante; en cambio, en las células del sistema fagocítico mononuclear, músculo liso, estriado y cardíaco, se encuentra en forma de amastigote. Esta forma se divide por fisión binaria en las células del huésped, lo que conduce a la formación de pseudoquistes (14).

En medios de cultivo se aprecia marcado pleomorfismo de los tripanosomas a través del tiempo; sin embargo, no llegan a diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos por razones -- aún no comprendidas (12,18).

En el intestino posterior del transmisor, el parásito se encuentra en forma de epimastigote y como tripomastigote metacíclico; sólo el segundo tipo resulta infectante, ya que los epimastigotes son destruidos por eosinófilos y células K. No obstante, es posible establecer infección experimental en animales de laboratorio con las formas de cultivo, en las que -- predominan los epimastigotes (11,19,20).

El ciclo biológico de T. cruzi comprende dos fases: una en el hombre o huésped mamífero (reservorio), y otra en el -- transmisor (14).

El huésped invertebrado o vector se infecta al ingerir -- tripomastigotes sanguíneos, presentes en el huésped vertebrado (14).

Los transmisores se ocultan en grietas y orificios de pa redes y techos fabricados con paja, palma o adobe. Salen por la noche a alimentarse, ingiriendo la sangre humana o de anima

les domésticos que habitan la casa y con frecuencia la chinche infectada defeca cerca de la picadura, depositando los tripomastigotes metacíclicos (11,19,20). Como la saliva de la chinche causa una reacción dérmica, esta produce prurito. Al rascarse, el hombre o animal en cuestión se autoinocula con la forma infectante del parásito en la pequeña herida - causada por la picadura, aunque también puede penetrar por mucosas o conjuntiva al rascarse los ojos con las manos contaminadas (14).

Existen otros mecanismos de infección, como la transmisión sanguínea, transplacentaria, lactancia, accidentes por manejo y sacrificio de animales parasitados, etc. (28).

Al parecer la mayor parte de la transmisión de T. cruzi de importancia epidemiológica inmediata es de persona a persona, o de animal doméstico al hombre (14).

Los organismos al entrar al huésped mamífero invaden - células adiposas de tejido subcutáneo y fibras musculares, llegan a vasos sanguíneos y linfáticos, y a través de ellos llegan a diversos órganos, tales como corazón, pulmones, bazo, hígado, médula ósea, cerebro, etc. (11,19).

En los pseudoquistes, principalmente de músculo cardíaco, el parásito se reproduce activamente como amastigote -- (21).

Cuando las células son destruidas, los amastigotes transformados en tripomastigotes sanguíneos invaden nuevas células, transitando por las corrientes sanguíneas y linfática - - - (11,19).

Cuando un triatoma se infecta al ingerir sangre de un mamífero parasitado, T. cruzi se reproduce en forma de epimastigote y pasados 15 a 30 días, se encuentra como tripomastigote metacíclico en el recto del transmisor. Estas formas infectantes al ser expulsadas en las heces del triatoma, inician la infección en un nuevo huésped, al penetrar a través de la piel o mucosas (14).

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad de Chagas en los mamíferos parece presentar cuatro etapas distintas. La primera corresponde al período de incubación, durante el cual ocurre proliferación de amastigotes dentro de células histiocíticas, la transferencia de célula a célula en forma de tripomastigotes, y la introducción precoz de éstas en el torrente sanguíneo y vías linfáticas (11,12).

La segunda etapa de la enfermedad, llamada fase aguda, - puede llegar a durar varios meses y se caracteriza por fiebre, hepatoesplenomegalia y ocasionalmente taquicardia. La duración de esta fase se correlaciona con la virulencia de la cepa, observándose que mientras más virulenta es la cepa, menor es el tiempo de duración tanto del período de incubación como de la fase aguda. Durante este período se desarrolla una lesión en el sitio de inoculación conocida como chagoma. El sitio más común de esta lesión es la conjuntiva, manifestándose como un edema bipalpebral uni o bilateral, conocido como signo de Romana. Como el parásito se disemina hacia los diferentes órganos del cuerpo, algunas veces provoca complicaciones, a menudo mortales, como encefalitis y meningoencefalitis. A lo largo de esta fase, se demuestra fácilmente la presencia del parásito en sangre (11,12,19,20).

En la forma intermedia o latente, tercera etapa de la enfermedad, no se observan síntomas, aunque cursa con parasitemia baja, al parecer debida a la constante multiplicación intracelular de parásitos en varios órganos. La forma latente - puede ser de período corto o prolongarse durante varios años, para finalmente desarrollarse en enfermedad crónica (11).

Por lo general, a los diez años o más de la infección - inicial, aparece la etapa final o crónica de la enfermedad, - caracterizada por miocarditis progresiva y dilatación irreversible de órganos huecos, tales como los del tracto gastrointestinal y corazón. Es difícil demostrar la presencia de pará

sitos durante esta etapa (2,11,14,22).

La desaparición de tripomastigotes sanguíneos durante -- la etapa aguda para el establecimiento de la fase crónica, -- se supone que se debe a la acción de las IgG, las cuales destruyen las formas sanguíneas del parásito rápidamente por fijación de complemento (21).

Ciertas características de la enfermedad de Chagas su-- gieren que posee un elemento inmunológico. Entre ellas se encuentran: la adquisición de resistencia después de la infec-- ción con cepas poco virulentas o posterior recuperación de -- la fase aguda, y la proliferación de organismos con lesiones ausentes, seguida de inflamación repentina parecida a la hi-- persensibilidad mediada por células, y daño tisular progresivo en la fase crónica, asociado a cantidades mínimas de orga-- nismos (14). Por otro lado, la inmunosupresión con rayos X -- (23), ciclofosfamida, corticosteroides, la timentomía neonatal (24) y el tratamiento con suero antilinfocítico (25), -- producen tasas altas de parasitemia y mayor número de ni-- dos de amastigotes en tejidos, que conducen a mayor mortali-- dad.

Se han identificado anticuerpos contra el parásito me-- diante fijación de complemento y técnicas directas e indirec-- tas de hemaglutinación e inmunofluorecencia. Al comienzo de la enfermedad se detectan anticuerpos de la clase IgM y pos-- teriormente IgG en la fase crónica (26). No se conoce con -- certeza la función de dichos anticuerpos, pero se ha observa-- do que el suero inmune más complemento produce lisis de T. - cruzi in vitro. Así mismo, se ha descrito actividad profilác-- tica del suero (27).

Si bien hay pruebas que indican la existencia de inmuni-- dad celular, no se ha demostrado su intervención en la pro-- tección contra la enfermedad (14).

Para diagnosticar la enfermedad de Chagas se hace uso de métodos parasitológicos y serológicos, así como de la observación y detección de manifestaciones clínicas, electrocardiográficas y radiológicas (28).

Mediante métodos parasitológicos se puede observar la presencia de T. cruzi, usando la técnica de frotis sanguíneos, hemocultivo, el xenodiagnóstico, y post-mortem, los cortes histológicos (28).

Los métodos serológicos permiten detectar anticuerpos capaces de reaccionar con el parásito o sus componentes, usando técnicas de fijación de complemento, hemaglutinación pasiva, - inmunofluorescencia indirecta, la aglutinación de epimastigotes, así como la precipitación de extractos del parásito (28).

Como se adquiere cierta protección significativa en animales de laboratorio con cepas avirulentas y virulentas de T. cruzi, parece posible la viabilidad de una vacuna con fines -- profilácticos. Las vacunas aún permanecen en estudio, ofreciendo buenas perspectivas; pero a la fecha, ningún tipo de vacuna confiere protección absoluta cuando se desafía con gran número de parásitos.

VACUNA D.P.T. ENFERMEDADES CONTRA  
LAS QUE CONFIERE PROTECCION.

DIFTERIA. La difteria es un padecimiento toxi-infeccioso agudo causado por Corynebacterium diphtheriae, que se caracteriza por una lesión local inflamatoria, generalmente en la -- porción superior de las vías respiratorias, pudiendo existir complicaciones en otras partes del organismo, particularmente en el corazón y nervios periféricos, debido a la absorción de una exotoxina secretada por los microorganismos. Esta toxina bloquea la síntesis de proteínas (29).

La difteria es una enfermedad fácilmente prevenible por vacunación.

TETANOS. El tétanos es una enfermedad bacteriana a menudo fatal en la que las manifestaciones clínicas no se origi-- nan de una infección invasiva sino de una potente neurotoxina, la tetanospasmina elaborada cuando las esporas de Clostridium tetani germinan después de haber ganado acceso a las heridas.

La toxina llega a la médula espinal, donde bloquea la -- inhibición normal postsináptica de las neuronas motoras después de impulsos aferentes, evitando la liberación del transmisor inhibitor. La sensibilidad resultante a los impulsos ex-- citadores, no controlada por mecanismos inhibidores, produce-- los espasmos musculares generalizados característicos del té-- tanos (29).

Las esporas de C. tetani se encuentran ampliamente dis-- tribuidas a través de centros urbanos y áreas rurales de todo el país, encontrándoseles por lo común sobre la ropa y el pol-- vo casero, constituyendo un riesgo para el individuo no inmu-- ne, aún después de lesiones caseras relativamente sencillas. Se sabe de casos de tétanos después de cirugía, y de procedi-- mientos tan inocuos como una prueba cutánea o una inyección intramuscular.



El tétanos neonatal es una causa primordial de mortalidad infantil. Ocurre esporádicamente en todo el mundo. En la mayoría de los países industrializados es relativamente rara. Se presenta con más frecuencia en las regiones agrícolas y en zonas subdesarrolladas en donde las condiciones obstétricas son malas, el contacto con excremento de animales es más probable y generalmente la inmunización es inadecuada (29).

TOS FERINA. La tos ferina es una enfermedad aguda caracterizada por una reacción inflamatoria que comprende la totalidad de las vías respiratorias y que produce tosparoxística.

El agente causal es Bordetella pertussis, un pequeño bacilo gram negativo que produce numerosas sustancias con actividad biológica. Pese a la intensidad de las investigaciones conducentes a establecer tanto la naturaleza de dichas sustancias, como su participación en la patogénesis de esta infección, aún no se ha podido incriminar de manera inequívoca a ninguna de ellas en la producción de un síntoma determinado, con la consecuente ignorancia en relación a la identidad del o los antígenos protectores.

Aunque la tos ferina es un padecimiento universal, que no reconoce barreras de clima, raza o situación geográfica, los individuos más afectados pertenecen a la población infantil en su mayoría, y es en el ámbito rural donde la enfermedad golpea con mayor gravedad (29).

VACUNA DPT. El DPT es un biológico de los denominados vacunas combinadas, ya que da origen a inmunidad contra el tétanos, la tos ferina y la difteria.

Las manifestaciones importantes de la difteria y el tétanos se basa primordialmente en los efectos relacionados a sus respectivas toxinas secretadas activamente. Todas las exotoxinas son proteínas, y por lo tanto, pueden dar origen a anticuerpos que neutralizen sus efectos. No obstante, inmunizar -

con un producto altamente tóxico e incluso mortífero es inadmisibile. Por fortuna, hace ya muchos años que se sabe que el formol destoxifica estos productos sin alterar su inmunogenicidad, conociéndose los productos inmunizantes obtenidos como toxoides o -anatoxinas (29).

La respuesta inmune que provoca el DPT contra los toxoides, es mejor que la que se observa al administrarlos por separado, -debido a que las células muertas de E. pertussis que forman parte de la vacuna ejercen una función coadyuvante. Además, los compuestos solubles se adsorben sobre hidróxido de aluminio o se --precipitan en otras sales de aluminio o calcio (29).

Por otro lado, no se conoce, como ya se mencionaba, cuál o cuáles son los antígenos protectores, del componente pertussis. Por tal motivo la vacuna pertussis contiene sustancias no importantes para la protección y algunas que incluso pueden ser res-ponsables de efectos indeseables (29).

Aunque no existe un indicador absolutamente confiable de -protección contra la tos ferina, el que mejor correlaciona con -ella es el título de aglutininas. Se sabe que un título alto de estos anticuerpos (1:320 o mayor) indica protección, aunque un -título bajo o la ausencia de anticuerpos no necesariamente indi- ca susceptibilidad a la infección (30).

En épocas pasadas, la tos ferina y el tétanos causaban mu--chas muertes, especialmente entre los niños; sin embargo, en la actualidad éstas han disminuído, gracias a que los servicios sa- nitario-asistenciales del país se han preocupado en prevenirlas por medio de la vacuna DPT.

El DPT se aplica durante el primer año de vida, a partir de los dos meses de edad, en tres dosis intramusculares de 0.5 ml. a intervalos de un mes aproximadamente (29).

## T. cruzi; Enfermedad de Chagas e Inmunosupresión.

Se conoce la existencia de parásitos que son capaces de inducir inmunidad efectiva que origine la recuperación clínica del huésped enfermo, o la reducción en el número de parásitos.

Por el contrario, otros parásitos han desarrollado a través de la evolución, más de un mecanismo para evadir la respuesta inmune del huésped. Entre tales mecanismos pueden citarse: a) la variación antigénica, en ciertas ocasiones asociada con cambios morfológicos (31,32); b) la activación policlonal de linfocitos; c) la inmunosupresión (23); d) la liberación de sustancias anticomplementarias, y e) el mimetismo molecular.

Se ha observado que durante infecciones por protozoarios tales como la leishmaniasis (74), la malaria (33,34), la toxoplasmosis (35) y las tripanosomiasis (36), se producen cambios funcionales en la respuesta inmunológica normal de los huéspedes mamíferos.

Un aspecto de la interrelación huésped-parásito que ha despertado considerable interés, es la supresión antígeno inespecífica ocasionada por varios parásitos, tanto protozoarios como metazoarios.

Ciertas parasitosis están asociadas con supresión de la respuesta humoral a antígenos heterólogos, como en los casos de las tripanosomiasis (37) y la malaria (38). También se encuentra, además de supresión humoral, la supresión celular a antígenos heterólogos y la inhibición de la activación de linfocitos por sustancias mitogénicas (39,40), en enfermedades parasitarias tales como las debidas a T. gambiense (42) y T. brucei (43,44). Otras infecciones parasitarias como la esquistosomiasis y la filariasis (45), también parecen cursar con supresión de la capacidad inmune de los huéspedes.

Una consecuencia de la alteración de la respuesta inmunológica por los parásitos es que se incrementa la susceptibilidad de los huéspedes a otros agentes biológicos patógenos, con el consecuente agravamiento del enfermo y aumento de mortalidad en los individuos afectados (46).

Entre las investigaciones relativas a este tema destacan las tendientes a descubrir: a) la naturaleza de las células involucradas en procesos supresores; b) los mecanismos por los cuales se producen mediadores solubles que suprimen la actividad inmune de las células y c) los mecanismos de acción del sistema supresor sobre la célula blanco.

La respuesta inmunológica es regulada por diferentes rutas celulares, ya sea a través de la interacción directa con células efectoras inmunopotenciales, o indirectamente liberando mediadores solubles (47,48).

Se ha demostrado que los diferentes tipos de células requeridas en la respuesta inmune son capaces de funcionar, en determinadas circunstancias, como células supresoras (49). Las células T no requieren forzosamente de un contacto célula-célula, sino que también pueden realizar funciones supresoras por medio de factores solubles.

Se sabe que existen dos grupos diferentes de células T reguladoras, unas programadas para las funciones de cooperación inmune, y otras para las funciones de supresión.

La demostración de que las poblaciones de células T supresoras y cooperadoras son diferentes, lo constituye el sistema antigénico Ly en el ratón (51).

## INMUNOSUPRESION DURANTE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Diversos estudios indican que los animales experimentalmente infectados con T. cruzi muestran respuesta humoral y celular suprimida tanto a antígenos del parásito como a antígenos heterólogos (52-62). Además, se ha demostrado que las células linfoides de ratón parasitado por T. cruzi son incapaces de responder positivamente en un cultivo mixto de linfocitos (62).

Cuando Reed y col. (59) estudiaron el efecto que tiene la presencia de T. cruzi en ratones que posteriormente son inmunizados con adyuvante completo de Freud u oxazolona, encontraron depresión de la hipersensibilidad tardía cuando se probó con los antígenos correspondientes. Igualmente Ramos et. al. (58) observaron efecto inmunosupresor producido por la infección con T. cruzi, lo cual se pone de manifiesto cuando se determinan células formadoras de anticuerpos tanto directas como indirectas, en ratones inmunizados con eritrocitos de burro, entre el quinto y séptimo días posteriores a la infección. Así mismo, los ratones parasitados presentan respuesta disminuida de células formadoras de anticuerpos, cuando son inmunizados con gama globulina humana, DNP-Ficoll y LPS (58,63).

Por otra parte, se ha encontrado que las células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes con enfermedad de Chagas, tienen capacidad reducida para responder a eritrocitos de carnero cuando la respuesta se compara con la de CMP de individuos sanos (64).

Los pacientes con enfermedad de Chagas aguda aparente -- presentan respuesta positiva de tipo tardío en piel a antígenos de T. cruzi, y sus leucocitos muestran inhibición de la migración en presencia de estos antígenos. Por el contrario, durante la enfermedad de Chagas aguda inaparente, los pacien-

tas no mostraron respuesta de tipo tardío a antígenos del parásito, y no se observó inhibición significativa de la migración cuando sus células se expusieron a dichos antígenos (65).

La supresión de la respuesta inmune inducida por T. cruzi puede distinguirse fácilmente de la inmunosupresión inducida por otros tripanosomas. T. cruzi se asemeja a sus congéneres africanos en que puede encontrarse en sangre. Sin embargo, en contraste con T. rhodesiense y T. gambiense, T. cruzi se reproduce sólo intracelularmente, con una predilección especial por el músculo cardíaco y células fagocíticas mononucleares. Se ha descrito que el grado de inmunosupresión provocado por T. cruzi, se incrementa concomitantemente con el tiempo de infección, y aparentemente es irreversible en el ratón (56). Por el contrario, la inmunosupresión debida a T. musculi es transitoria, y la respuesta retorna casi a la normal -- (47).

T. brucei es capaz de ejercer dos efectos fundamentalmente diferentes en la respuesta inmune primaria del ratón (66). En la fase primaria de la infección provoca una estimulación de la respuesta de anticuerpos, dando lugar posteriormente a marcada supresión.

Durante las infecciones por T. cruzi en el ratón, se hallan suprimidas tanto la respuesta humoral (56) como la celular (62), mientras que otras especies de tripanosomas exhiben efectos variables sobre el funcionamiento de la respuesta inmune. Así, durante la infección por T. gambiense también se encuentran alteradas ambas respuestas (46). En esta tripanosomiasis la parasitemia es escasa. Por el contrario, T. brucei provoca una elevada parasitemia y además una severa alteración de la respuesta humoral (44). Murray et. al. (39) informaron que la función de las células B es normal en la fase aguda, pero que en posteriores períodos de la infección ambas poblaciones celulares, T y B, son afectadas. Es interesante -

que T. rhodesiense, bajo casi las mismas condiciones experimentales, cause niveles enormes de parasitemia, y sin embargo tenga muy poco efecto sobre la respuesta de anticuerpos - (57). Existen datos que sugieren la posibilidad de que la inducción de inmunosupresión más eficiente ocurre cuando T. cruzi alcanza números altos en circulación (58).

La respuesta inmune disminuida en ratones experimentalmente infectados con T. cruzi tanto a antígenos relacionados con el parásito (61,65), como contra antígenos no relacionados (52-61,65), puede ser originada por uno o varios de los siguientes mecanismos: a) células supresoras (53,54,67): -- b) una substancia supresora de alto peso molecular presente en el suero (54,55,56), o bien, c) un factor supresor de bajo peso molecular, elaborado por el parásito.

Se ha propuesto que durante la infección por tripanosomas africanos, la inhabilidad de los animales huésped para montar una respuesta inmune normal, está asociada con una alteración de la función de los macrófagos (39). Sin embargo, en ratones infectados con T. cruzi, la actividad de los macrófagos parece ser normal, e incluso hallarse incrementada (68).

La eliminación parcial de la sangre periférica de pacientes Chagásicos, de células adherentes al plástico, no afecta el estado de supresión de los linfocitos no adherentes (64).

Por otra parte (52,57), al evaluar el estado inmunológico de ratones infectados por T. cruzi, se encuentra que la respuesta suprimida a antígenos heterólogos tanto dependientes como independientes de T, aparentemente no es producto de la alteración de la función de los macrófagos. Además, existen datos que indican que las células peritoneales tanto de ratones normales, como de ratones infectados por T. cruzi,

no difieren entre sí en su capacidad para unir antígeno (57).

Por el contrario, existen datos que sugieren una participación importante de los macrófagos en los fenómenos de inmunosupresión debidos a T. cruzi (69).

Se ha encontrado por ejemplo, que durante el curso de la infección se inducen células supresoras que evitan la respuesta a la fitohemaglutinina (PHA) (62). Estas células no fueron T típicas, ya que se adhirieron a la lana de nylon y no mostraron sensibilidad al suero anti Thy 1,2 y complemento.

El tipo de células obtenidas de bazo de ratón infectado con T. cruzi, que son responsables en un experimento, de la actividad supresora que se manifiesta sobre células de bazo normales en cultivo, parecen ser "macrofagoides"; tal designación se basa en: a) su adherencia al plástico; b) su resistencia al calor; c) la carencia de actividad supresora en fracciones ricas en células T, y d) su sensibilidad al tratamiento con suero de conejo anti-ratón asociado a inmunoglobulinas Thy 1 y suero anti-ratón poliespecífico (53).

Además, existen evidencias que sugieren la existencia de macrófagos supresores inducidos por células T (70).

El suero procedente de ratón infectado con T. cruzi provoca supresión de la respuesta humoral, cuando es administrado a ratones singénicos no infectados, a un nivel parecido a la causa da por una infección activa (56). De manera semejante, el suero de ratón infectado con T. musculi inhibe marcadamente la habilidad de células normales de bazo, de responder in vitro a eritrocitos de carnero (47).

Se han sugerido varias funciones para la substancia supresora específica del huésped, que contiene el suero de ratón infectado con T. cruzi.

Se ha demostrado por ejemplo, que dicha substancia induce que los cultivos celulares de bazo y ganglios linfáticos, se --



vuelvan refractarios a los mitógenos concavalina A (Con A), fito hemaglutinina (PHA) y lipopolisacárido (LPS) (69). Así mismo, -- tal sustancia induce supresión de la respuesta inmune mediada -- por células.

La transferencia de suero proveniente de un ratón singénico que sufre de enfermedad de Chagas experimental, provoca un estado de inmunosupresión a eritrocitos de carnero, pero no disminuye la actividad antieritrocítica en receptores alogénicos (53,-- 56).

La supresión mediada por sustancia supresora sérica se inicia tempranamente, y se incrementa de manera paulatina hasta su máximo, alrededor del 60<sup>o</sup> día, perdiéndose después de éste gradualmente la actividad supresora (54).

Al estudiar la interacción del suero que contiene sustancia supresora con células linfoides normales en experimentos de adsorción y co-incubación, se encuentra que tal sustancia es -- funcionalmente inactivada, modificada o eliminada del suero, por incubación con células normales de bazo, o con preparaciones ricas en linfocitos B (pero no linfocitos T o macrófagos)(54). Sin embargo, tanto los linfocitos T como los macrófagos se requieren para que se manifiesten los efectos supresores sobre la inducción de respuesta de anticuerpos in vitro (54).

La sustancia supresora tiene un peso molecular de entre -- 196 000 y 200 000, es estable a 60 y -80<sup>o</sup>C, pero inestable a -- 70<sup>o</sup>C. Muestra sensibilidad a la tripsina, pero no es disociada -- por el ácido y no se ve afectada por la adsorción con esplenocitos alogénicos, formas de cultivo de T. cruzi, eritrocitos isólogos o heterólogos, o antisuero contra cadenas pesadas o ligeras de IgG murina (54).

Una prolongada exposición de las células de bazo (pero no -- de ganglios linfáticos) a la fracción de suero con actividad supresora, o al suero total, provoca la activación de células que suprimen la actividad de células normales de bazo durante las -- respuestas de anticuerpos. Además de presentarse in vitro, la --

activación de células supresoras ocurre también in vivo (54).

Se han descrito varias condiciones que se precisan para que el suero con substancia supresora manifieste su actividad. Así, las células de bazo, y en menor intensidad las células de ganglio linfático, requieren que la exposición al suero con substancia supresora preceda a los mitógenos, para que la supresión de la activación de los linfocitos ocurra (69). Estos hallazgos pueden reflejar simples diferencias en el ritmo de la expresión. Es probable que una vez que un proceso se ha iniciado, el otro proceso resulta inoperante (69). Por otra parte, la supresión de la respuesta blastogénica, provocada en las células de bazo y de ganglio linfático, es más intensa cuando las células se cultivan en presencia de suero fetal de bovino, a concentraciones de 2 y 4%, respectivamente (69).

Se ha encontrado que se generan células supresoras durante la enfermedad de Chagas experimental (54).

Las células de bazo de ratón infectado con T. cruzi, inhiben la habilidad de células normales de bazo para responder a la concavalina A (Con A) o lipopolisacárido (LPS) (63,58). Las células responsables de estos efectos pertenecen a una población no adherente, sensible al tratamiento con suero antitímico más complemento. Estos y otros estudios indican que posiblemente la inmunosupresión observada en ratón infectado con T. cruzi contra antígenos tanto T dependientes (52) como T independientes (57) es mediada, al menos en parte, por la acción de células T supresoras sobre linfocitos T y B (69,70). No obstante, al considerar la eficacia con que las células de bazo de ratón infectado por T. cruzi transfieren hipersensibilidad por contacto, se sugiere que la respuesta inmune disminuida en el ratón puede no ser fruto de una población de células T supresoras (50), sino de células B o células adherentes. En apoyo a lo anterior se ha establecido que las células responsables de la transferencia de protección contra la enfermedad de

Chagas, se encuentran en poblaciones ricas en células T, que se supone generan factores activadores de macrófagos. Las células B parecen no estar involucradas en la inmunosupresión, ya que su eliminación incrementa la efectividad de la población celular para producir los efectos protectores (71). La posibilidad de que la protección conferida por transferencia in vivo, consista en el paso de células T cooperadoras involucradas en la producción de anticuerpos es poca, ya que no se encuentran anticuerpos protectores en el suero de animales infectados (27).

La presencia de células T supresoras durante la tripanosomiasis americana bien puede explicar no sólo la supresión de la respuesta de anticuerpos (52,57), si no además el efecto supresor de la infección sobre las respuestas de naturaleza celular (59).

Para propósitos de comparación, se puede mencionar que se ha descrito la participación de células supresoras en la inmunosupresión observada durante la tripanosomiasis africana (72). No obstante, en este caso, a diferencia de la inhibición de la actividad de mitógenos en la infección por T. cruzi (57,62), las células de ratón infectado con T. brucei responsables de tal efecto son tanto adherentes como no adherentes, y además el efecto no se ve afectado por el suero Thy 1 y complemento (42, 43,66).

Se ha planteado la hipótesis de que algunos antígenos de T. cruzi, pueden estimular directamente a las células T, dando lugar a la liberación de factores supresores que a su vez interfieren con la respuesta de T a antígenos tales como el 2,4-dinitroclorobenceno (DNCE) (73).

A este respecto se ha aislado una fracción proteica llamada Fad (73), a partir de epimastigotes de T. cruzi cultivados en medio LIT. La posibilidad de que la supresión de la hipersensibilidad por contacto durante la infección aguda por T. cruzi -

se dirija hacia el brazo eferente más que hacia el aferente de la respuesta inmune (60), disminuye su viabilidad en base a -- los hallazgos que indican que la Fad interfiere con la fase -- proliferativa de la respuesta inmune en algunas fases del ciclo celular, y que particularmente favorece el bloqueo de las células T, resultando en una incapacidad de que cooperen tanto con las B para la síntesis de anticuerpos, como con las T para su activación. No obstante, no se sabe si la fracción Fad existe en tripomastigotes sanguíneos (73).

Las características anteriores de la inmunosupresión inducida por tripanosomas, indican que se requiere una comprensión minuciosa de cada tipo de inmunosupresión, antes de manifestar alguna conclusión confiable y significativa concerniente al papel de un fenómeno de supresión dado en las manifestaciones -- clínicas de la enfermedad. No obstante, conociendo que la inmunosupresión existe, inquieta pensar en el efecto que esta pueda tener sobre la adquisición de inmunidad a antígenos premeditadamente aplicados, como pueden ser las vacunas, y ello independientemente del mecanismo íntimo que explique tal inmunosupresión.

Se ha encontrado en personas que sufren de tripanosomiasis o malaria, respuesta disminuida de anticuerpos contra el toxoide tetánico (37). Además, se sabe que las personas que padecen una infección por T. gambiense presentan inmunosupresión al antígeno H de Salmonella typhi y al derivado proteínico purificado (PPD) (37).

¿ Existe inmunosupresión a los antígenos de la vacuna DPT, durante la infección experimental por T. cruzi ? El presente trabajo tiene la intención de averiguarlo.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los procedimientos de inmunización se encuentran entre las medidas más económicas y eficaces disponibles para la prevención de algunas enfermedades infecciosas, motivo por el cual han cobrado gran importancia los programas de inmunización, sobre todo para la población infantil, en la cual muchas de tales enfermedades se encuentran con mayor frecuencia y gravedad.

A veces se intenta el tratamiento con vacunas contra distintas enfermedades infecciosas, pero su valor terapéutico es impreciso. Las vacunas tienen su mayor utilidad como agentes profilácticos para la inmunización activa de personas (o animales) sanos, antes de que queden expuestos a determinadas enfermedades infecciosas o antes de que aparezcan los síntomas. Se recalca, entonces, la necesidad de realizar previo diagnóstico respecto al estado de salud del individuo que se pretende vacunar. Varias enfermedades no resultan fácilmente diagnosticables, ya sea por las dificultades que el médico tiene, principalmente en áreas rurales, para el establecimiento del diagnóstico adecuado o bien, por falta de personal disponible en áreas donde pueden ser encontrados pacientes con determinada enfermedad. Este es el caso de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana causada por Trypanosoma cruzi, enfermedad que existe desde los EE.UU., hasta Argentina, incluyendo a México.

Lo antes expuesto plantea la necesidad de determinar si la infección parasitaria causada por T. cruzi produce una respuesta inmunológica disminuida (inmunosupresión) en la adquisición de inmunidad contra los antígenos que forman la vacuna DPT (Difteria-pertussis-tétanos) en el ratón, considerando a este último como un modelo experimental.

## O B J E T I V O

DETERMINAR QUE EFECTO TIENE LA PARASITOSIS DEBIDA A Trypanosoma cruzi SOBRE LA ADQUISICION DE INMUNIDAD CONTRA LOS COMPONENTES ANTIGENICOS DE LA VACUNA D.P.T. EN EL RATON.

## H I P O T E S I S

LA PARASITOSIS DEBIDA A Trypanosoma cruzi CAUSARA UN EFECTO INMUNOSUPRESOR HUMORAL SOBRE LA ADQUISICION DE INMUNIDAD CONTRA LOS COMPONENTES DE LA VACUNA D.P.T., EN EL RATON.

## M A T E R I A L

Agujas 25 X 30 mm.  
Agujas 25 X 16 mm.  
Agujas 26 X 16 mm.  
Agujas 10 X 32 mm.  
Aplicadores de madera estériles.  
Algodón.  
Cámara de Neubauer.  
Portafiltros "Sartorius".  
Estuche de disección.  
Frascos ampula de 10 ml.  
Gradilla.  
Guantes de hule.  
Jeringas desechables de 20 ml.  
Jeringas desechables de 10 ml.  
Jeringas desechables de 3 ml.  
Jeringas desechables de 1 ml.  
Matraces aforados de 100 ml. y de 1 litro.  
Matraz kitasato de 5 litros.  
"Masking tape".  
Mechero.  
Papel filtro "Whatman" # 4  
Papel "parafilm".  
Pipetas de 10 ml. graduadas en 0.1 ml.  
Pipetas de 5 ml. graduadas en 0.1 ml.  
Pipetas de 2 ml. graduadas en 0.1 ml.  
Pipetas de 0.2 ml. graduadas en 0.001 ml.  
Pipetas de 0.1 ml. graduadas en 0.001 ml.  
Pipeta de Thoma para cuenta de glóbulos blancos.  
Pipetas Pasteur.

Piceta.

Probeta de 100 ml. graduada.

Regla.

Trampa de ratón.

Tubos de ensayo de 10 X 75 mm.

Tubos de ensayo de 15 X 100 mm.

Tubos de ensayo de 15 X 150 mm.

Tubos de ensayo de 18 X 150 mm.

Vaso de precipitados de 1 litro.

Vasos de precipitados de 80, 100 y 150 ml.

#### E Q U I P O

Agitador (Vortex Genie).

Autoclave (Amsco).

Balanza analítica (Sartorius).

Balanza granataria (Ohaus).

Centrífuga (Clínica Universal).

Estufa (Caisa-Alley).

Fotocolorímetro (Klett Summerson).

Horno (Thelco).

Lámpara.

Potenciómetro (Corning).

Propitetas

Rasuradora eléctrica (Sunbeam).

#### R E A C T I V O S

Acido bórico (Baker).

Alcohol etílico (Baker).

Almidón (comercial).

Estándar de antitoxina difterica (6 U.A/ml.).



Estándar Nacional de antitoxina tétánica  
(5 U.A./ml.).

Borato de sodio (Baker).

Cloruro de amonio (Merck).

Cloruro de sodio (Baker).

Cloroformo (Baker).

Tiomersal (comercial).

Medio de Bordet-Gengou (Polvo deshidratado  
comercial Bioxon ).

Oxido de zinc (comercial).

Proteosa-peptona (Merck).

Sulfato de bario (Baker).

Toxina diftérica valorada (2500 Lr/100/ml).

Toxina tetánica valorada (65 L+/10/50/ml.).

Citrato de sodio (Baker).

Patrón de opacidad (10 U.O.P) (Bureau of Bio  
logics F.D.A. Bethesda, Marland).

## M A T E R I A L   B I O L O G I C O

Los animales que se emplearon nos fueron proporcionados por el bioterio del LNR de la SSA, con las siguientes características:

RATONES: Hembras de la cepa HIH (SW), de 17.5 a 19.0 g. Fueron albergados en cajas de aluminio, mantenidos a 25°C y alimentados con alimento comercial para ratón y agua ad libitum.

CUYOS: Hembras de la cepa Hartley, de más de 500 g. de peso. Fueron mantenidos a 25°C en cajas de plástico, alimentados con alimento comercial para conejo, zanahorias, paja de avena y agua ad libitum complementada con vitamina C.

CONEJOS: Hembras de la cepa Nueva Zelanda Blanco, de 1.5 Kg. a 2.7 Kg. de peso, mantenidos a 25°C en jaulas para conejo y alimentados con alimento comercial para conejo y agua ad libitum.

Bordetella pertussis: Se empleo la cepa 18323 de B. pertussis proporcionada por el LNR, SSA. Fue conservada a 4°C.

Trypanosoma cruzi: Se utilizó la cepa "Miguz" de T. cruzi, originaria de México, aislada por xenodiagnóstico de un caso humano procedente del estado de Oaxaca. La cepa nos fue proporcionada por el Maestro en Salud Pública, Máximo Cortes Jimenez del Dpto. de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N.

VACUNA: Se usó vacuna D.P.T., del lote 25-312, proporcionada por el Instituto Nacional de Higiene de la SSA. La eficacia de esta vacuna fue evaluada y reportada como adecuada para uso humano.

## M E T O D O S

### PROCEDIMIENTO PARA LA CUENTA DE T. cruzi.

Se coloca el ratón en una trampa. Se le limpia la cola con alcohol al 70% y se deja que seque. Con tijeras desinfectadas -- con alcohol al 70%, se corta la punta de la cola del ratón y se obtiene sangre, que se deja que por capilaridad penetre en una -- pipeta de Thoma, para cuenta de glóbulos blancos hasta la marca 0.1. Posteriormente, se diluye la sangre con cloruro de amonio -- al 0.87%, succionando hasta que la mezcla alcance la marca 11. -- Se agita y se descartan algunas gotas de la dilución.

Se carga una cámara de Neubauer con la dilución, y se -- cuentan los tripanosomas a un aumento de 480X. El número de tripanosomas obtenidos se multiplican por el factor de dilución -- adecuado para obtener el número de tripanosomas por ml. de sangre.

Los dedos se protegen con guantes durante el manejo de la pipeta.

### PROCEDIMIENTO PARA EL SANGRADO DEL RATON.

Se coloca en el fondo de un vaso de precipitados un pedazo de algodón con cloroformo o éter. Posteriormente se introduce un ratón, se tapa el vaso de precipitados y se espera de 3 a 4 minutos a que el animal muera. Una vez muerto, el ratón se fija con el abdomen hacia arriba sobre una base de poliuretano con agujas en las cuatro extremidades. Se le desinfecta el tórax al animal con alcohol al 70%, y con tijeras y pinzas de disección previamente desinfectadas, se corta la piel que cubre la región cardíaca.

Con jeringa de 3 ml. y aguja de 22 X 25mm., se extrae la -- sangre una vez localizado el corazón. Antes de puncionar, el émbolo debe dejar un volumen de aire en la jeringa de aproximada-- mente 0.5 ml. La sangre se succiona lentamente para evitar hemo-- lisis.

### INOCULACION DE T. cruzi.

Para la inoculación de T. cruzi, se obtiene sangre de un ratón parasitado usando el método que se describe anteriormente. Se diluye la sangre con solución salina isotónica estéril, hasta obtener la concentración deseada de tripanosomas.

Se limpia el abdomen del animal con alcohol al 70% y se inoculan los tripanosomas deseados por vía intraperitoneal, - en un volumen de 0.5 ml. La suspensión de tripanosomas se homogeniza por agitación antes de tomarla cada vez con la jeringa.

Después de usado, todo el material deberá ser descontaminado con alcohol al 70%.

### PREPARACION DE SUERO HIPERINMUNE CONTRA B. pertussis.

Se cultiva B. pertussis en agar B-G (Bordet-Gengou), por un período de 48 a 72 horas a 35°C en un tubo inclinado. Al - final del período de incubación se adicionan al tubo 3 ml. de solución salina isotónica estéril en condiciones asépticas, y el crecimiento se remueve cuidadosamente con la ayuda de una asa bacteriológica y un pequeño trozo de algodón estéril. La suspensión de células se filtra a través del mismo algodón, - succionando con la punta de una pipeta estéril apoyada sobre el algodón. Esto se hace con el objeto de evitar grumos de -- bacterias o restos de agar. La suspensión se ajusta a una concentración final de 1:1000 con tiomersal, y se guarda a 4°C. Después de 48 hrs., se siembran placas de B-G para verificar si aún existen bacterias viables; si se presenta crecimiento, se continua manteniendo la suspensión a 4°C practicando re-- siembras periódicas. Cuando ya no se presente crecimiento, la suspensión se centrifuga a 2500 rpm. durante 15 minutos. EL - sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende en -- tiomersal 1:10,000. La suspensión se estandariza a 10 Unida--

des de Opacidad (U.O.P.), con la ayuda de un fotocolorímetro, empleando como diluyente solución de tiomersal 1:10,000.

Antes de inocular la suspensión de B. pertussis, se realiza sangría preliminar del conejo que se pretende inmunizar con el fin de determinar si su suero no contiene aglutininas contra B. pertussis, empleando una prueba de aglutinación en placa. Si no existen aglutininas, se inocular al conejo por vía intravenosa con cuatro dosis de la suspensión, a intervalos de 4 a 5 días. Las dosis son: 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 ml./Kg. de peso. Una semana después de la última inyección, se efectúa una titulación de prueba de aglutininas en el suero del conejo. Si el título es mayor de 4,000 se sangran los conejos en blanco, se obtiene el suero y se mantiene en refrigeración. Si el suero no satisface el título, un estímulo posterior con 0.8 ml./Kg. de peso, lo incrementará.

#### AJUSTE DE LA SUSPENSION DE B. pertussis.

La suspensión de B. pertussis se ajustó a 10 Unidades de Opacidad (U.O.P.), empleando la lectura en Unidades Klett -- (U.K.) equivalente a lo que dió el estandar de opacidad de -- los Estados Unidos leído con filtro verde, en un fotocolorímetro de Klett Summerson. Tal lectura es, en las condiciones de nuestro laboratorio, equivalente a 245-255 U.K.

#### PREPARACION DE MATERIAL Y SOLUCIONES.

Las pipetas, tubos, frascos ampula y aplicadores de madera, se esterilizaron en horno a 180°C durante 30 minutos.

a) Peptona al 1%.

Proteosa-peptona	10 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

b) Solución salina isotónica (0.85% p/v).

Cloruro de sodio	8.5 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

c) Regulador de Glenny.

Borato de sodio	1.58 g.
Acido bórico	2.33 g.
Cloruro de sodio	2.75 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Estas soluciones se filtran, se envasan y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

d) Solución de cloruro de amonio (0.85% p/v).

Cloruro de amonio	8.5 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

#### TECNICA DE DEPILACION DEL COBAYO.

Se rasura el pelo del lomo del cobayo en rectángulo y se humedece con agua tibia. Se prepara una pasta depiladora que contiene:

Almidón	3.00 g.
Oxido de zinc	1.75 g.
Sulfuro de bario	1.50 g.

Estos ingredientes se humedecen con agua hasta formar -- una mezcla cremosa homogénea, suficiente para depilar un coba yo de 250 a 300 g. de peso.

Se cubre la región rasurada con la pasta y se deja actuar de 3 a 4 minutos. Se talla muy suavemente para eliminar el pe lo, y se lava con agua tibia hasta que no quede ningún resto de la pasta. Se deja secar al animal.

Toda la operación se realiza con guantes, ya que la mez- cla depilatoria irrita la piel.

## TITULACION DE ANTICUERPOS CONTRA LA TOXINA DIFTERICA.

Para la valoración de anticuerpos contra la toxina diftérica se sigue el procedimiento de trabajo 1, que se detalla - adjunto.

El método consiste en efectuar una serie de diluciones - tanto de un suero problema como de un suero estándar, mismos que se mezclan con 10 Lr/100 de toxina diftérica, y se agrega regulador de Glenny para ajustar a un volumen determinado.

Una vez efectuadas las mezclas, estas se incuban a 37°C durante 3 a 4 horas. Transcurrido este tiempo, se inoculan -- 0.1 ml. de las respectivas mezclas por vía intradérmica en un cuyo previamente depilado. A las 48 horas se lee el diámetro de reacción en mm. El suero problema y la antitoxina estándar se diluyen con solución salina isotónica estéril; por otra -- parte la toxina diftérica se diluye con regulador de Glenny.

Inoculando 0.1 ml. de la mezcla del tubo número 3 de la serie estándar, obtenemos una reacción eritematosa de 10 mm. Esto indica que el sistema toxina-antitoxina esta funcionando bien, ya que por definición el Lr/100 es la mínima cantidad - de toxina diftérica, que al combinarse con 0.01 U.I. de anti-toxina, produce en la piel del cuyo, una reacción eritematosa característica, de aproximadamente 10 mm. de diámetro.

Por otro lado tenemos que, 0.1 ml. de la mezcla del tubo 15 nos dió una lectura de aproximadamente 10 mm. de reacción eritematosa en la piel del cuyo. De acuerdo con la definición de Lr/100, en esta mezcla debe haber 0.01 U.I.A. Esta canti-- dad esta contenida en los 0.2 ml., de suero diluido que se mezclaron con 1 Lr/100 de toxina. En consecuencia hay 0.05 -- U.I.A./ml. de dilución de suero. Como la dilución del suero fue de 1;1500, el contenido de U.I.A., del suero sin diluir - es de 75 U.I.A./ml.

PROTOCOLO DE TRABAJO 1

DETERMINACION DE ANTITOXINA DIFTERICA

Toxina usada: 2500 Lr/100/ml.

Antitoxina estándar: 6 UIA/ml.

S E R I E P R O B L E M A

Tubo	Toxina (ml.) 10Lr/100/ml.	Suero de prueba (ml)	Regulador Glenny (ml)	U.I.A.* esperadas	Lectura de la reacción (mm.)
1	0.1	0.1 (1:5)	0.1	0.5	
2	0.1	0.1 (1:10)	0.1	1.0	
3	0.1	0.1 (1:15)	0.1	1.5	
4	0.1	0.2 (1:50)	---	2.5	
5	0.1	0.2 (1:100)	---	5.0	
6	0.1	0.2 (1:150)	---	7.5	
7	0.1	0.1 (1:50)	0.1	5.0	
8	0.1	0.1 (1:100)	0.1	10.0	
9	0.1	0.1 (1:150)	0.1	15.0	
10	0.1	0.1 (1:100)	0.1	10.0	
11	0.1	0.1 (1:200)	0.1	20.0	
12	0.1	0.1 (1:300)	0.1	30.0	
13	0.1	0.2 (1:500)	---	25.0	
14	0.1	0.2 (1:1000)	---	50.0	
15	0.1	0.2 (1:1500)	---	75.0	12
16	0.1	0.1 (1:500)	0.1	50.0	
17	0.1	0.1 (1:1000)	0.1	100.0	13
18	0.1	0.1 (1:1500)	0.1	150.0	16

S E R I E E S T A N D A R

Tubo	Toxina (ml.) 10Lr/100/ml.	Antitoxina estándar 0.1 UIA/ml.	Regulador Glenny (ml)	Lectura (mm.)
1	0.4	0.56	0.24	
2	0.4	0.48	0.32	
3	0.4	0.40	0.40	11
4	0.4	0.32	0.48	
5	0.4	0.24	0.56	

\* Unidades Internacionales de Antitoxina.



## TITULACION DE ANTICUERPOS CONTRA LA TOXINA TETANICA.

Para la cuantificación de anticuerpos contra la toxina tetánica se sigue el protocolo de trabajo 2 que se anexa.

El método de valoración de anticuerpos contra toxina tetánica consiste en añadir a cada tubo la cantidad de antitoxina estándar o de suero problema, que se indica en el protocolo 2, agregar la toxina tetánica en la dilución que se indica, y llevar todas las diluciones a un volumen igual agregando regulador de peptona.

La dilución del suero problema que es necesario efectuar para obtener aproximadamente 1 U.I.A./ml. se establece mediante una prueba preliminar siguiendo el protocolo 3. Las mezclas se dejan reposar en la obscuridad durante 1 hr., y se inoculan por vía subcutánea a 3 ó 5 ratones, por dilución para las pruebas preliminares y definitiva respectivamente. El suero problema y la antitoxina tetánica se diluyen en solución salina isotónica y la toxina tetánica se diluye con regulador de peptona.

Un L+/10/50 es la mínima cantidad de toxina tetánica que mezclada con 0.1 U.I. de antitoxina tetánica mata al 50% de los animales inoculados entre el 40. y 50. día después de la inoculación. Aplicando esta definición a los datos del protocolo, se observa que la mezcla correspondiente al tubo 3 mata exactamente el 50% de los animales inoculados con ella. Esto indica que la dosis efectiva al 50% de la preparación estándar es de 0.8 ml. Un volumen de 0.5 ml. de esta mezcla contiene 0.1 U.I. de antitoxina tetánica, combinados con 1 L+/10/50.

Por otra parte en la serie de prueba, podemos observar que la dosis efectiva al 50% del suero problema debe ser una cantidad intermedia entre las dos diluciones adyacentes anteriores.

PROTOCOLO DE TRABAJO 2.

DETERMINACION DE ANTITOXINA TETANICA.

Estandar Nacional de antitoxina tetánica: 5 U.I./ml.  
 Toxina: TT-166 350 L+/10/ml. Método: L+/10/50.  
 Animales usados: 30 Núm. por dilución: 6  
 Peso: 15-17 g. Dosis por animal: 0.5 ml.  
 Vía de administración: subcutánea.

Toxina (ml.) 4L+/10/ml.	<u>S E R I E E S T A N D A R .</u>		Días de observación.				
	Estándar de antitoxina. 1 U.I./ml. (ml)	Regulador de peptona 1%. (ml.)	1	2	3	4	5
2.0	0.96	1.04	---	---	---	---	---
2.0	0.88	1.12	---	---	---	---	---
2.0	0.80	1.20	---	---	---	+++	0.80
2.0	0.72	1.28	---	---	+++		
2.0	0.64	1.36	---	+++			

S E R I E D E P R U E B A .

Toxina (ml.) 4L+/10/ml.	<u>S u e r o p r o b l e</u>		Regulador de peptona 1% (ml.)	Días de observación.				
	1 U.I. 1 ml.	1 ml.		1	2	3	4	5
2.0	0.96	1.04	---	---	---	---	---	
2.0	0.88	1.12	---	---	---	---	---	
2.0	0.80	1.20	---	---	---	+++	0.841	
2.0	0.72	1.28	---	---	+++			
2.0	0.64	1.36	---	+++				

Nota: El signo (-) indica que el ratón sobrevive.  
 El signo (+) indica que el ratón ha muerto.  
 Dilución efectuada del suero 1:280

Resultado:  $0.8/0.841 = 0.9523$   
 $(0.9523)(280) = 266.644 \text{ U.I.A./ml.}$

PROTOCOLO DE TRABAJO 3.

Prueba preliminar para establecer la dilución a la cual es necesario llevar el suero para obtener aproximadamente -- 1 U.I.A./ml.

Toxina: TT-166 350L+/10/ml.

Método: L+/10/50.

Animales usados: 30

Núm. por dilución: 6

Peso: 15-17 g.

Dosis por animal: 0.5 ml.

Vía de administración: subcutánea.

Toxina. 4L+/10/ml. (ml.)	Dilución del suero.	Volumen de la dilución de suero (ml.)	Regulador de peptona (ml.)
2.0	1:240	0.8	1.2
2.0	1:260	0.8	1.2
2.0	1:280	0.8	1.2
2.0	1:300	0.8	1.2
2.0	1:320	0.8	1.2

RESULTADOS DE LA PRUEBA PRELIMINAR:

Dilución	Días de observación.				
	1	2	3	4	5
1:240	---	---	---	---	---
1:260	---	---	---	---	---
1:280	---	---	---	+++	→
1:300	---	---	+++		
1:320	---	+++			

↑  
Aproximada-  
mente 1:280

Suponiendo que en la serie de prueba hubiésemos muerto 4 ratones entre el 40. y 50. día después de haberseles inoculado - la mezcla del tubo 3, se aplica el siguiente método empírico - para calcular la dosis efectiva al 50%. Cuatro ratones muertos son uno más que el 50% del total inoculado. Entre cada dilu- - ción de antitoxina existen  $0.88-0.80=0.08$  ml. Consideramos -- que cada ratón contribuye a esta cantidad con  $0.08/6=0.0133$  ml. Así pues, por ejemplo en el caso que nos ocupa, deberíamos -- agregar 0.0133 ml. más a la mezcla para evitar la muerte de un ratón, obteniendo así exactamente el 50% de mortalidad de los ratones inoculados. En consecuencia, la dosis efectiva al 50% para este ejemplo hipotético sería  $0.8 + 0.0133 = 0.8133$ .

El último paso para calcular el contenido de antitoxina tetánica del suero problema, es evaluar la potencia relativa que representa cuantas veces más o menos potente es el suero problema, en relación con el estándar. Dividiendo en nuestro ejemplo  $0.8/0.84$  obtenemos una potencia relativa de 0.95. Al multiplicar este valor por la dilución que se hizo del suero problema para obtener aproximadamente 1 U.I.A./ml, obtenemos que el suero problema contiene 266.66 U.I.A./ml.

#### ENSAYO DE AGLUTINACION PARA B. pertussis.

Para la determinación del título de aglutininas contra - B. pertussis se sigue el protocolo de trabajo 4 que se indica a continuación.

Como se observa, se realiza una serie de diluciones do- - bles del suero por analizar en una placa de aglutinación de - vidrio. En los pozos del 2 al 17 se depositaron 0.03 ml. de - solución salina fisiológica. Posteriormente se agregaron 0.03 ml. del suero problema previamente diluido 1:5, únicamente a los pozos 1 y 2. El suero se mezcla perfectamente con la solu- - ción salina, y se toman 0.03 ml. del pozo dos que se tranfieren al pozo 3 donde se realiza la misma operación, y así suce- - sivamente hasta el pozo 17.

PROCOLO DE TRABAJO 4.

ENSAO DE AGLUTINACION PARA B. pertussis.

		P	O	Z	O		
	1	2	3	4	5	...	17
Solución fisiológica (ml.).		0.03	0.03	0.03	0.03	...	0.03
Suero a ser ensayado (1:5).	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	...	0.03
<u>Antígeno B. pertussis.</u>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	...	0.03
Dilución final del suero.	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	...	

POZOS CONTROL.

	18	19	20
Solución fisiológica (ml.).	0.03	0.03	
Suero a ser ensayado.		0.03	
<u>Antígeno B. pertussis.</u>	0.03		0.03
Suero hiperinmune de conejo.			0.03

A todos los pozos, excepto el 19, se le agregan 0.03 ml. de - la suspensión de B. pertussis ajustada a 10 Unidades de Opacidad (U.O.P). Las mezclas se agitan manualmente durante 4 a 5 minutos y se observa la reacción con la ayuda de una lámpara.

Tres pozos se destinan a controles, el pozo 18 contiene sola mente suspensión de B. pertussis más solución salina. El pozo 19 contiene suero problema más solución salina. Estos controles no - deben dar reacción de aglutinación; en cambio en el pozo 20 que - contiene suero hiperinmune de conejo más suspensión de B. pertu-- ssis, la reacción de aglutinación debiera ser positiva.

El título de aglutininas contra B. pertussis de un suero pro blema, se tomo como la máxima dilución en que se observó aglutina ción a simple vista.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

CONSIDERACIONES PREVIAS.

Para el desarrollo del trabajo experimental definitivo, fue necesario definir ciertas condiciones que fueran apropiadas para nuestros propósitos:

Esquema de inmunización. Se debió establecer un esquema adecuado de inmunización por medio del cual se pudieran obtener títulos de aglutininas contra B. pertussis detectables por el método descrito, ya que los aglutinógenos de esta bacteria son los antígenos más pobres de los tres probados,

Para ensayar los esquemas de inmunización, se utilizaron 0.5 ml. de la vacuna D.P.T.; entre cada dosis se fijó un tiempo de 15 días. Los esquemas ensayados se resumen en el siguiente cuadro.

		DOSIS (0.5 ml.)		
		PRIMERA	SEGUNDA	
ESQUEMA	1	S.C.	I.P.	V
	2	I.P.	S.C.	I
	3	S.C.	S.C.	
	4	I.P.	I.P.	A

S.C.= Vía subcutánea.

I.P.= Vía intraperitoneal

Los resultados nos condujeron a seleccionar el esquema de inmunización en que la primera dosis se aplicó por vía subcutánea y la segunda por vía intraperitoneal; utilizando este esquema, los ratones no mueren ni muestran anomalías, tales como el erizamiento del pelo o el abultamiento del abdomen, obteniéndose además, un título adecuado de aglu

tininas en su suero.

Los esquemas de inmunización fueron ensayados tanto en ratones parasitados con T. cruzi, como en ratones no parasitados.

b) Inoculo de T. cruzi.

Se buscó un inoculo adecuado de tripomastigotes de T. cruzi, tal que se pudiera demostrar la parasitemia alrededor de 15 días después de la inoculación y la vez no causara la muerte de los ratones durante el período de la inmunización que requirió de 30 días posteriores a la parasitación de los animales. El inoculo elegido fue de 5000 tripomastigotes sanguíneos.

c) Titulación de anticuerpos contra toxina tetánica.

Originalmente se había pensado emplear el método descrito por J. Ipsen en 1942, que permite determinar la cantidad de antitoxina tetánica en suero con menos de 50 U.I.A./ml. Sin embargo, durante las pruebas preliminares se encontró que el suero de los ratones, contenía más de 50 U.I.A./ml., por lo que se optó por el método del L+/10/50.

d) Volumen de suero.

Durante los ensayos se determinó que 5 ratones de 18 a 20 g. proporcionaron una cantidad suficiente de suero para efectuar las determinaciones necesarias. Basándonos en esta observación, decidimos emplear 10 ratones; de esta manera aseguramos que aunque alguno de los ratones muriera o no se parasitara, obtuvieramos suficiente suero para nuestros propósitos.



## D I S E Ñ O   E X P E R I M E N T A L .

En la figura 2, se representa la secuencia de trabajo que se empleó en el presente proyecto para lograr el objetivo propuesto.

A cada uno de 100 ratones se le inocularon aproximadamente 5000 tripomastigotes de T. cruzi por vía intraperitoneal.

Después de 5 días se vacunaron con D.P.T. por vía subcutánea, tanto los 100 ratones supuestamente parasitados, como 100 ratones control. Transcurridos 15 días de la inoculación con tripomastigotes, se efectuó un examen microscópico de la sangre de los ratones inoculados. Se aceptó que un ratón se hallaba parasitado, cuando en una preparación en fresco se encontraba cuando menos un tripomastigote sanguíneo en 10 campos. La preparación en fresco consistió en una gota de sangre y cuatro gotas de cloruro de amonio al 0.85%. A los 15 días de la primera inmunización, se procedió a aplicar una dosis de refuerzo con la misma dosis de vacuna D.P.T., por vía intraperitoneal, tanto a los ratones parasitados como a los ratones control. Quince días después se sangraron todos los ratones, utilizando la técnica descrita, la sangre se dejó coagular, y el coágulo se desprendió de las paredes del tubo con aplicadores de madera. Se efectuaron mezclas a partes iguales de la sangre de nueve ratones, en tubos de ensayo estériles. Los tubos se taparon con "parafilm" y se centrifugaron a 2500 rpm., durante 15 minutos. El suero se separó con pipetas-Pasteur estériles y se conservó en refrigeración a 4°C en frascos ampola estériles.

Se obtuvo un valor de U.I.A./ml de antitoxina tetáni

ca, un intervalo de U.I.A./ml de antitoxina diftérica, y un título de aglutininas contra B. pertussis por cada grupo de nueve ratones tanto parasitados como control, obteniéndose así 10 valores para cada determinación tanto para los ratones parasitados como los ratones control.

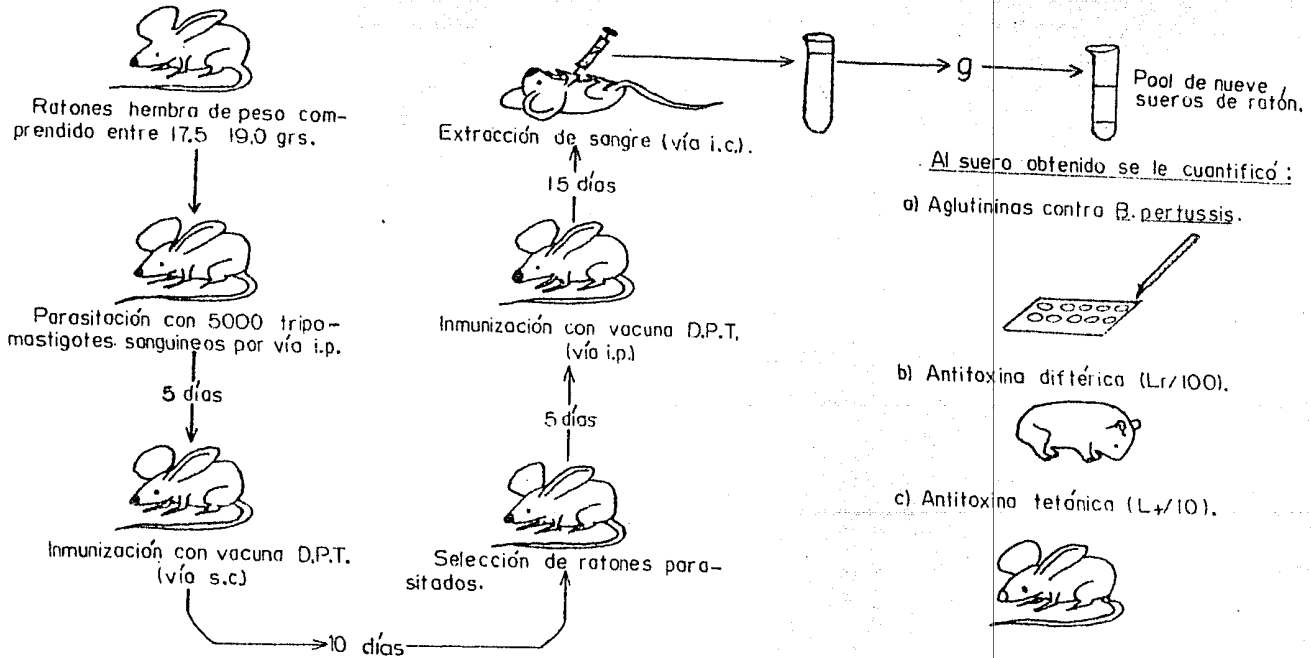
### R E S U L T A D O S .

Los resultados obtenidos se resumen en el siguiente cuadro. Se aplicó a estos datos un análisis discriminante. Los valores sugieren que los ratones parasitados con T. cruzi presentan en su suero concentraciones altas de la antitoxina tétanica y concentraciones bajas de antitoxina diftérica, así como títulos bajos de aglutininas contra B. pertussis, cuando se comparan con los obtenidos en los ratones control.

FIGURA 2

Influencia de la parasitosis causada por *Trypanosoma cruzi* sobre la respuesta inmunológica humoral a la vacuna D.P.T.

Desarrollo experimental



Respuesta humoral de ratones parasitados con Trypanosoma cruzi a los antígenos de la vacuna D.P.T.

Antitoxina tetánica (UI/ml)		Aglutininas contra <u>B. pertussis</u> (Título)		Antitoxina diftérica (UI/ml)	
Control	Parasitados	Control	Parasitados	Control	Parasitados
167.23	239.54	5120	2560	50-75	50-75
152.03	235.18	5120	5120	100	50-75
116.11	253.36	5120	1280	100-150	20-25
196.75	235.30	10240	10240	100	75
264.88	145.45	20480	640	100-150	50-75
141.18	281.42	5120	2560	150	30-50
206.64	126.83	10240	1280	75-100	50-75
161.50	196.04	5120	2560	50-75	50
180.88	182.17	10240	5120	75-100	75
171.50	158.54	5120	2560	100	50-75

Cada valor representa el resultado de la determinación efectuada a una mezcla de volúmenes iguales del suero de nueve ratones.

En el proceso de validación del análisis discriminante se encontró significancia de la función discriminante con un  $P=0.002$ . Esto sugiere que los ratones parasitados con Trypanosoma cruzi presentan valores altos de antitoxina tetánica y cantidades bajas de antitoxina diftérica como de aglutininas contra Bordetella pertussis, en relación con los ratones control.

## D I S C U S I O N .

Los datos presentados en este trabajo indican que la infección aguda por T. cruzi, en el ratón da como resultado una alteración en la respuesta inmunológica secundaria humoral -- normal contra antígenos heterólogos. No obstante, es manifiesta una desviación en los valores esperados de antitoxina tetánica, ya que originalmente suponíamos que se presentaría inmunosupresión para los tres antígenos probados (ver tabla).

Se han sugerido varias explicaciones para la inmunosupresión debida a T. cruzi (53). Las que parecen más viables, son la posibilidad de una activación policlonal, la supresión mediada por substancias producidas por el parásito, o bien la existencia de factores supresores solubles en el suero del huésped y producidos por las células de éste o la participación de células que suprimen la respuesta normal de anticuerpos, ya sea por efectos del factor supresor o por otro mecanismo no bien determinado.

Es difícil de explicar como cualquiera de los mecanismos citados puede hacer una distinción entre los diversos antígenos. Tendríamos que sugerir que o bien el mediador soluble o la célula supresora "selecciona" las poblaciones que afecta. En otras palabras, los factores o células supresoras actuarían selectivamente sobre células cooperadoras en los casos de toxoide diftérico y las aglutininas contra B.pertussis, dejando inafectadas a las células cooperadoras para el toxoide tetánico. O si pensamos en términos de activación policlonal (66), el activador policlonal actuaría preferentemente sobre las células cooperadoras para el toxoide tetánico y las células supresoras en los otros dos casos. Esto último podría explicar incluso la inmunopotenciación en el caso de la producción de antitoxina tetánica que refleja nuestros resultados.

Otra posible explicación de la selectividad mencionada - en la inmunosupresión debida a T. cruzi, quizás radique en diferencias en el manejo del antígeno durante la fase inductora de la respuesta. Se podría dar el caso de que dos antígenos de naturaleza química aparentemente semejante - es decir los toxoides-- sean manejados por el sistema inmunológico de manera diferente, involucrando por ejemplo subpoblaciones de células con diferente sensibilidad a los mecanismos supresores.

Por otra parte, sabemos que la tripanosomiasis americana se encuentra prácticamente limitada al ámbito rural. Así mismo, al menos dos de las enfermedades contra las que se pretende inmunizar al aplicar vacuna DPT, es decir la tos ferina y el tétanos, muestran tendencia a manifestarse con mayor frecuencia entre poblaciones rurales (ver tablas 3,4 y 5). Es -- así como por ejemplo la tos ferina y la enfermedad de Chagas parecen coexistir en el espacio geográfico y en la edad que con mayor frecuencia se adquieren, y que en consecuencia es -- la misma en que es más necesaria la inmunización con DPT.

Muchas veces se inculpa a la vacuna de los fracasos de una campaña de inmunización, bien sea por ser su potencia inferior a la adecuada, o por haber ésta disminuído a causa de una mala conservación. Sin embargo, generalmente no se evalúa con profundidad el estado de salud en que se encuentran las -- personas a que se pretende vacunar. Este es el caso de una enfermedad con mucha frecuencia subdiagnosticada como lo es la tripanosomiasis americana. Por tanto, conociendo los datos obtenidos en la presente investigación, y suponiendo que el ratón es un modelo experimental adecuado para reproducir aproximadamente los efectos de la enfermedad de Chagas aguda causa sobre el sistema inmunológico de los niños, sugerimos que podría ser de utilidad incluir entre las preguntas que se -- plantean a la madre de un niño por inmunizar, relativas a la

salud del mismo, la posible presencia del signo de Romaña en áreas endémicas y que incluso se considere la posibilidad de diferir el inicio del esquema de vacunación hasta una etapa más avanzada de la enfermedad, ya que por fortuna se sabe que la inmunosupresión debida a T. cruzi es transitoria y parece correlacionar con el número de parásitos en circulación.

## CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican, si son reproducibles, que la infección aguda por T. cruzi, al menos en el ratón, evita que se obtengan los títulos de anticuerpos esperados, cuando se aplica una vacuna tan importante como el D.P.T. No obstante, surge la interrogante de si el efecto inmunosupresor provocado por el parásito se extiende a los tres antígenos, y en caso de que investigaciones posteriores confirmen los resultados inesperados obtenidos para el toxoide tetánico, es decir una inmunopotenciación en la producción de antitoxina tetánica, sería de sumo interés averiguar los mecanismos íntimos que dan origen a esta falta de homogeneidad en la supresión, las que con seguridad yacen en los complejos sistemas de regulación de la respuesta inmunológica.



T A B L A 3

DIRECCION GRAL. DE BIOESTADISTICA, INFORMATICA Y SISTEMAS.  
CASOS NUEVOS DE ENFERMEDADES NOTIFICADAS SEGUN ENTIDAD  
FEDERATIVA Y CAUSA POR UNIDADES DE SALUD DE LA S.S.A.  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

1 9 8 0

	<u>TETANOS</u>	<u>TOS</u>	<u>FERINA</u>	<u>DIFTERIA</u>
E.U. MEXICANOS	363 (0.5 )	3,048 ( 4.5 )		3 (0.0 0 )
AGUASCALIENTES	5 (1.0 )	5 ( 4.5 )		—
BAJA CAL. NTE.	1 (0.08 )	3 ( 0.2 )		—
BAJA CAL. SUR	—	16 ( 7.2 )		—
CAMPECHE	13 (3.5 )	26 ( 7.0 )		—
COAHUILA	5 (0.3 )	19 ( 1.2 )		2 (0.10)
COLIMA	8 (2.4 )	20 ( 5.9 )		—
CHIAPAS	33 (1.6 )	272 (13.0)		—
CHIHUAHUA	1 (0.05 )	37 ( 1.4 )		—
D.F.	1 (0.01 )	164 ( 1.8 )		—
DURANGO	—	24 ( 2.1 )		—
GUANAJUATO	9 (0.3 )	285 ( 9.3 )		—
GUERRERO	39 (1.8 )	240 (11.0)		—
HIDALGO	14 (0.9 )	216 (14.2)		—
JALISCO	11 (0.3 )	31 ( 0.7 )		1 (0.002)
MEXICO	7 (0.11)	43 ( 0.6 )		—
MICHOACAN	24 (0.8 )	223 ( 7.3 )		—
MORELOS	3 (0.3 )	106 (11.4)		—
NAYARIT	14 (1.9 )	19 ( 2.6 )		—
NUEVO LEON	2 (0.08 )	48 ( 1.9 )		—
OAXACA	22 (0.9 )	413 (16.4)		—
PUEBLA	5 (0.1 )	226 ( 6.9 )		—
QUERETARO	1 (0.1 )	30 ( 4.1 )		—
QUINTANA ROO	7 (3.3 )	41 (19.5)		—
S.L.P.	18 (1.1 )	38 ( 2.3 )		—
SINALCA	7 (0.4 )	22 ( 1.2 )		—
SONORA	11 (0.7 )	108 ( 7.2 )		—
TABASCO	17 (1.5 )	16 ( 1.4 )		—
TAMAULIPAS	12 (0.6 )	48 ( 2.5 )		—
TLAXCALA	—	26 ( 4.7 )		—
VERACRUZ	36 (0.7 )	148 ( 2.8 )		—
YUCATAN	34 (3.2 )	43 ( 4.8 )		—
ZACATECAS	3 (0.3 )	87 ( 7.6 )		—

T A B L A 4

DIRECCION GRAL. DE BIOESTADISTICA, INFORMATICA Y SISTEMAS.  
CASOS NUEVOS DE ENFERMEDADES NOTIFICADAS SEGUN ENTIDAD  
FEDERATIVA Y CAUSA POR UNIDADES DE SALUD DE LA S.S.A.  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
1 9 8 1

	<u>TETANOS</u>	<u>TCS</u>	<u>FERINA</u>	<u>DIFTERIA</u>
E.U. MEXICANOS	359 (0.52)	3,977 ( 5.73)		—
AGUASCALIENTES	6 (1.15)	22 ( 4.27)		—
BAJA CAL. NTE.	1 (0.08)	15 ( 1.19)		—
BAJA CAL. SUR	3 (1.30)	64 (27.75)		—
CAMPECHE	9 (2.34)	32 ( 8.33)		—
COAHUILA	2 (0.12)	233 (14.50)		—
COLIMA	3 (0.86)	23 ( 0.58)		—
CHIAPAS	18 (0.84)	224 (10.41)		—
CHIHUAHUA	2 (0.10)	167 ( 8.48)		—
D.F.	4 (0.04)	113 ( 1.17)		—
DURANGO	—	311 (26.28)		—
GUANAJUATO	10 (0.32)	162 ( 5.18)		1 (0.03)
GUERRERO	32 (1.43)	247 (11.06)		—
HIDALGO	13 (0.84)	204 (13.15)		—
JALISCO	18 (0.41)	46 ( 1.05)		—
MEXICO	4 (0.05)	45 ( 0.57)		—
MICHOACAN	26 (0.83)	260 ( 8.32)		—
MORELOS	7 (0.73)	124 (12.87)		—
NAYARIT	14 (1.87)	15 ( 2.00)		—
NUEVO LEON	12 (0.47)	127 ( 4.99)		—
CAXACA	23 (0.90)	432 (16.81)		—
PUEBLA	6 (0.18)	257 ( 7.64)		—
QUERETARO	5 (0.66)	96 (12.69)		—
QUINTANA ROO	3 (1.35)	31 (13.93)		—
S.L.P.	19 (1.11)	79 ( 4.62)		—
SINALOA	20 (1.03)	42 ( 2.16)		—
SONORA	12 (0.78)	77 ( 5.00)		—
TABASCO	4 (0.34)	50 ( 4.20)		—
TAMAULIPAS	7 (0.35)	75 ( 3.80)		—
TLAXCALA	1 (0.18)	9 ( 1.60)		—
VERACRUZ	43 (0.79)	124 ( 2.29)		—
YUCATAN	31 (2.92)	75 ( 7.06)		—
ZACATECAS	1 (0.09)	196 (16.83)		—

T A B L A 5

DIRECCION GRAL. DE BIOESTADISTICA, INFORMATICA Y SISTEMAS.  
CASOS NUEVOS DE ENFERMEDADES NOTIFICADAS SEGUN ENTIDAD  
FEDERATIVA Y CAUSA POR UNIDADES DE SALUD DE LA S.S.A.  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

1 9 8 2

	<u>TETANOS</u>	<u>TOS</u>	<u>FERINA</u>	<u>DIFTERIA</u>
E.U. MEXICANOS	307 (0.4)	2,000	(2.8)	—
AGUASCALIENTES	1 (0.2)	1	0.2	—
BAJA CAL. NTE.	—	9	0.7	—
BAJA CAL. SUR	3 (1.3)	28	11.7	—
CAJEME	12 (3.0)	15	3.8	—
COAHUILA	10 (0.6)	31	1.9	—
COLIMA	6 (1.7)	22	6.1	—
CHIAPAS	11 (0.5)	108	4.9	—
CHIHUAHUA	1 (0.1)	29	1.5	—
D.F.	7 (0.1)	27	0.3	—
DURANGO	—	32	2.7	—
GUANAJUATO	4 (0.1)	39	1.2	—
GUERRERO	14 (0.2)	125	5.5	—
HIDALGO	13 (0.8)	207	13.1	—
JALISCO	13 (0.3)	21	0.5	—
MEXICO	10 (0.1)	25	0.3	—
MICHOACAN	27 (0.8)	147	4.6	—
MORELOS	5 (0.5)	51	5.1	—
NAYARIT	15 (2.0)	12	1.6	—
NUEVO LEON	7 (0.3)	13	0.5	—
OAXACA	18 (0.6)	107	15.5	—
PUEBLA	3 (0.1)	157	4.6	—
QUERETARO	4 (0.5)	25	3.2	—
QUINTANA ROO	6 (2.6)	44	18.8	—
S.L.P.	14 (0.8)	15	0.9	—
SINALOA	15 (0.7)	34	1.7	—
SONORA	13 (0.8)	130	8.2	—
TABASCO	5 (0.4)	12	1.0	—
TAMAULIPAS	11 (0.5)	5	0.2	—
TLAXCALA	—	2	0.3	—
VERACRUZ	50 (0.9)	186	3.3	—
YUCATAN	9 (0.8)	36	3.3	—
ZACATECAS	—	5	0.4	—

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Marcuschamet, M.J. y Reyes, L.P.: Enfermedad de Chagas - en México. Reporte de cinco casos comprobados. Arch. Inst. Cardiol. Méx., 48: 952-967 (1978).
- 2.- Mazzott, L.: Variation in virulence for mice and guinea-pigs in strain of Trypanosoma cruzi Chagas, from different localities in México. Am J. Hyg., 31: 67-85 (1940).
- 3.- Reyes, L.P.: Inmunología de la enfermedad de Chagas. -- Arch. Inst. Cardiol. Méx., 48: 947-951 (1978).
- 4.- Tay, J.D., Ontiveros, D., Ortega, M., y Torres, J.: Estado actual de los conocimientos sobre infección en vertebrados por la enfermedad de Chagas, en México. Bol. Of. Sanit. Panam., 67: 310-314 (1969).
- 5.- Tellaeché, A.M., et.al. : Hallazgo de tripanosomas (Chitotrypanum) en muestras de sangre tomadas a febriles del área palúdica de México. Direc. Gral. Inves. Salud Púb., 5: 30-38 (1976).
- 6.- Goldsmith, R.S., Kagan, I.G., Zárate, R., Reyes-González, M.A., y Cedeño-Ferreira, J.: Estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México. Bol. Of. Sanit. Panam., 87: 1-19 (1979).
- 7.- Tay, J., Navarrete, E.C., Corominas, E.R., y Biagi, F.F.: La enfermedad de Chagas en el municipio de Tuxpan, Estado de Michoacán, México. Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Méx., -- 8: 263-270 (1966).
- 8.- Biagi, F.F.J., Tay, C., Guzmán, G., y Fong, F.F.: Tititlan, Guerrero, Foco endémico de la enfermedad de Chagas en México. Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Méx., 6: 625-631 (1964).
- 9.- Muzzotti, L.: Dos casos de Chagas en el estado de Oaxaca. Gaceta Med. Méx., 74: 417-420 (1940).

- 10.- Tay, J., Goycoolea, O., y Biagi, F.F.: Observación sobre la enfermedad de Chagas en la Mixteca Baja, nuevo caso humano en la República Mexicana. Bol. Of. Sanit. Panam., 51: 322-327 (1961).
- 11.- Faust, E.C., Russell, P.F., y Juny, R.C.: PARASITOLOGIA -- CLINICA. Salvat Editores. Barcelona, España, 1974.
- 12.- Hunter, G.W., Frye, W.W., y Swartzwelder, J.C.: MANUAL DE MEDICINA TROPICAL. Tercera edición. La Prensa Médica Mexicana, México D.F., 1973.
- 13.- Pereira, M.E., Andrade, A.F., y Ribeira, J.M.: Lectins of distinct specificity in *Rodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. Science, 211: 597-599 (1981).
- 14.- Lumsden, J.H.R. 1985. Biological aspects of trypanosomiasis research. In Dawes, B., editor. Advances in parasitology, vol. 3. Academic Press, Inc., New York. pp 1-57.
- 15.- Velasco, C.O., Romero, R.L., Mendiola, J.G., y Brambila, A.C.: Contribución al conocimiento de la enfermedad de Chagas en México I. Observaciones epidemiológicas en Tepetitlan, Zacatecas. Rev. Invest. Salud Pùb., 30: 204 (1970).
- 16 - Tay, J., Biagi, F.F. y A.M. de Biagi.: Estado actual de conocimientos sobre triatomas y enfermedad de Chagas en el Estado de Zacatecas. Med. Rev. Mexicana, 48: 121 (1968).
- 17.- Schimdt, G.D. y Roberts, L.S.: Fundation of Parasitology The C.U. Mosby C. U.S.A., 1977.
- 18.- Kilgour, U.: *Trypanosoma*: Intrincacies of biochemistry, morphology environment. Int. J. Biochem., 12: 325-332 - (1980).
- 19.- Brown, H.W.: PARASITOLOGIA CLINICA. Cuarta edición. Edit. Interamericana, México, 1977.
- 20.- Koberle, F.: Chagas disease and Chagas syndromes. The pathology of American trypanosomiasis. Adv. Parasitol., 6: 53 (1968).

- 21.- Anselmi, A., y Moleiro, F.: La enfermedad de Chagas y la -  
miocardiopatía Chagásica. Arch. Inst. Cardiol. Méx., 42: -  
622-628 (1972).
- 22.- Rotberg, J.T., Bassoti, G.R., Caffroni, V.J., Gorodezky, M.  
and Estandia, C.A.: Miocardiopatía Chagásica. Arch. Inst.-  
Cardiol. Méx., 46: 336-341 (1976).
- 23.- Behbehani, M.K.: Typanosoma (Schizotrypanum) cruzi infec-  
tion in X-irradiated and thymectomized mice. Trans. Roy. -  
Soc. Trop. Med. Hyg., 65: 265 (1971).
- 24.- Schmuñis, G.A., González-Cappa, S.M., Traversa, O.C. and -  
Yanovsky, J.F.: The effect of immunodepression due to neo-  
natal thymectomy on infectio with Trypanosoma cruzi in mice.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 65: 89-94 (1971).
- 25.- Roberson, E.L., and Hason, W.L.: Trypanosoma cruzi. Effects  
of anti-thymocytr serum in mice and neonatal thymoctomy in  
rats. Exp. Parasitol., 34: 168 (1973).
- 26.- Barajas, G.M.P. (1980). Aparición de anticuerpos anti T. --  
cruzi en ratón con dos cepas de marcada diferencia en viru-  
lencia. Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Bio  
lógicas. I.P.N. México.
- 27.- Krettli, A.V., and Brener, Z.: Protective effects of speci-  
fic antibodies in Trypanosoma cruzi. J. Immunol., 116: 755-  
(1976).
- 28.- García, R.V.M. (1979) Estudio serológico de la enfermedad de  
Chagas utilizando muestras de sangre en papel filtro. Tesis  
profesional de la U.N.A.M. Fac. de Química, México.
- 29.- Kumate, J.: Inmunidad, Inmunización. Vacunas. 2a. Edición.  
Ediciones Médicas del Hospital Infantil, México, 1979.
- 30.- Sako, W.M.D.: Studies on Pertussis Immunization. J. Pediatr.  
30: 29-40 (1947).
- 31.- Viens, P., Targett, G.A.T., Wilson, V.C.L.C. and Edwards, C.:  
Persistence of Trypanosoma musculi in the kidney of recovered  
CBA mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 66: 669 (1972).

- 32.- Butcher, G.A. and Cohen, S.: Antigen variation and protective immunity in Plasmodium Knowlesi Malaria. Immunol. 23: 503 (1972).
- 33.- Barker, L.R.: Experimental Malaria: effects upon the immune response to different antigens. J. Infect. Dis., 123: -- 99 (1971).
- 34.- Greenwood, B.M., Brown, J.C., de Jesús, D.G., and Holboro, E.J.: Immunosuppression in murine malaria. II. The effect on reticuloendothelial and germinal centre function. Clin. Exp. Immunol., 9: 345 (1971)
- 35.- Strickland, G.T. Ahmed, A., and Sell, K.W.: Blastogenic -- response to toxoplasma-infected mouse spleen cell to T and B cell mitogens. Clin. Exp. Immunol., 22: 1667 (1975).
- 36.- Murray, P.K., Jennings, F.W., Murray, M., and Urquhart, -- G.M.: The nature of immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in mice. Immunol., 27: 825 (1974).
- 37.- Greenwood, B.M. Immunosuppression in malaria and trypanosomiasis. In Parasites in the Immunized Host: Mechanisms of Survival. (Ciba Foundation Symposium). (R. Porter and J. - Knight, ads.). p. 137. Associated Scientific Publishers, - Amsterdam. 1974
- 38.- Greenwood, B.M., Bradley-Moore, A.M., Palit, A., and Bryce son, D.M.: Immunosuppression in children whit malaria. Lancet, 1: 169 (1973).
- 39.- Hundson, K.M., Byner, C., Freeman, J., and Terry, R.J.: -- Immunodepression, high IgM levels and evasion of the immuneresponse in murine trypanosomiasis. Nature, 264: 256 -- (1976).
- 40.- Houba, V., and Allison, A.C.: M-antiglobulins (rheumatoid-factor-like globulins) and other gamma-globulins in relation to tropical parasitic infections. Lancet, 1: 848 -- (1966)

- 41.- Rodney, H.: A Method for Counting and Concentrating Living Trypanosoma cruzi in Blood Lysed with Ammonium Chloride. - J. Parasitol., 60: 527 (1974).
- 42.- Mansfield, J.M., and Bogasra, O., Lymphocyte function in -- experimental African Tripanosomiasis I. B-cell responses - to helper T cell-independent and-dependent antigen. J. - - Immunol. 120: 759-765 (1978).
- 43.- Corsini, A.C., Clayton, C., Askonas, B.A. and Ogilvie, B.- M. Suppressor and loss of B-cell potential in mice infec - ted with Trypanosoma brucei. Clin. Exp. Immunol., 29: - -- 122-131 (1977).
- 44.- Diane, D.E., and Jayawardena, A.N.: Suppressor cells in -- mice infected with Trypanosoma brucei. J. Immunol., 119: - 1029-1033 (1977).
- 45.- Piessens, W.F., Ratiwayanto, S., Testi, S. Palmieri, J.H. Piessens, P.W., Koiman, I., and Dennis, D.T.: Antigen- --- specific supressor cells and supressor factors in human fi - liariasis with Brugia Malayi. N. Engl. Med., 302: - - -- 833-837 (1980).
- 46.- Greenwood, B.M., Whitte, H.C., and Malyneux, D.H.: Immuno- supression in Gambian Trypanosomiasis. Trans. Roy. Soc. -- Trop. Med. Hyg., 67: 840-850 (1973).
- 47.- Gershon, R.K.: Adquisition on suppressor T-cells. Trans. - plant. Rev., 26: 170 (1975):
- 48.- Rich, S.S., Rich, R.R., and kastner, D.L.: Supressor factor activity in cell-mediated immune responses. J. Reticuloen- dotel Soc., 24: 417 (1978).
- 49.- Wakman, T.A., Broder, S.: Suppressor Cells in the regula - tion of the immuneresponse. Proc. Clin Immunol., 3: 155 -- (1977).
- 50.- Feldman, M., Beverley, P.C.L., and Dunkey, M.: Different - by antigen phenotypes of in vitro induced helper and su - ppressor cell. Nature (London), 258: 614 (1975).



- 51.- Cantor, H., Shen, F.W., and Boyse, E.A.: Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components II. Activation by antigen after immunization - antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J. Exp. Med.*, 143 : 1391 (1976).
- 52.- Clinton, B.A., Ortiz-Ortiz, L., Garcia, W., Martínez, T., and Capin, R.: Trypanosoma cruzi: Early immune responses-infected mice. *Exp. Parasitol.*, 37: 417-425 (1975).
- 53.- Cunningham, D.S., and Kuhn, R.E.: Trypanosoma cruzi-induced suppression of the primary immune response in murine cell cultures to T cell-dependent and-independent antigens. -- *J. Parasitol.*, 66: 16-27 (1980).
- 54.- Cunningham, D.A., and Kuhn, R.E.: Trypanosoma cruzi-induced substance I. Cellular involvement and partial characterization. *J. Immunol.*, 124: 2122-2129 (1980).
- 55.- Cunningham, D.S., and Kuhn, R.E.: Trypanosoma cruzi-induced suppressor substance II. Regulator activity. *Immunogenetics*, 10: 557-571 (1980).
- 56.- Cunningham, D.S., Kuhn, R.E., and Rowland, E.C.: Suppression of humoral responses during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Infect. Immun.*, 22: 155-160 (1978).
- 57.- Ramos, C., Lamoyi, E., Feal, M., Rodríguez, M., Pérez, M., and Ortiz-Ortiz, L.: Trypanosoma cruzi: Immunosuppressed - response to different antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.*, 45: 190-199 (1978).
- 58.- Ramos, C., Schadtler-Siwon, I., and Ortiz-Ortiz, L.: Suppressor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi infected mice. *J. Immunol.*, 122: 1243-1247 (1979).
- 59.- Reed, S.G., Larson, C.L., and Speer, C.A.: Suppressor of cell mediated immunity in experimental Chagas disease. *Z. Parasitenkd.*, 52: 11-17 (1977).

- 60.- Reed, S.G., Larson, C.L., and Speer, C.A.: Contact sensitivity responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. -- Inf. Immunol., 22: 548-554 (1978).
- 61.- Rowland, E.C. and Kuhn, R.E.: Suppression of anamnestic cellular during experimental American Trypanosomiasis. J. Parasitol., 64: 741-742 (1978).
- 62.- Rowland, E.C., and Kuhn, R.E.: Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infection. Infec. Immunol., 20: 393-397 (1978).
- 63.- Anderson, J., Sjöber, O., and Moller, G.: Selective induction of DNA synthesis in T and B lymphocytes. Cell. Immunol., 4: 381 (1980).
- 64.- Cunningham, D.S., Grogl, M., and Kuhn, R.E.: Suppression of antibody responses in humoral infected with Trypanosoma cruzi. Inf. Immunty., 30: 496-499 (1980).
- 65.- Teixeira, A.R., Teixeira, A.L., Macedo, V., and Prata, A.: Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas-disease. J. Clin. Invest., 62: 1132-1141 (1978).
- 66.- Jayawardena, A.N., Waksman, B.H. and Eardley, D.D.: Activation of distinct helper and suppressor T cell in experimental trypanosomiasis. J. Immunol., 121: 622-628 (1978).
- 67.- Cunningham, D.S., and Kuhn, R.E.: Lymphoblast transformation as a measure of immune competence during experimental Chagas disease. J. Parasitol., 66: 390-398 (1980).
- 68.- Ortiz-Ortiz, L., Ortega, T., Capin, R., and Martínez, T.: Enhanced mononuclear phagocytic during Trypanosoma cruzi-infection in mice. Int. Arch. Allergy. Immunol., 50: 232 (1976).
- 69.- Cunningham, D.S., Benavides, G.R., and Kuhn, R.E.: Suppression of mitoge-induced blastogenesis by the Trypanosoma-cruzi induced suppressor substance. J. Parasitol., 66: -- 722-729 (1980).

- 70.- Eardley, D.D., and Jayawardena, A.N.: Suppressor cells - in mice with Trypanosoma brucei. J. Immunol., 119: 1029-1033 (1977).
- 71.- Noguera, N.J., Chaplan, S., and Cohn, Z.: Trypanosoma cruzi: in vivo and in vitro correlation between T-cell - activation and susceptibility in inbred strain of mice.- Exp. Parasitol., 51: 325-334 (1981).
- 72.- Jayawardena, A.N., and Waksman, B.H.: Suppressor cells - in experimental tripanosomiasis. Nature (London), 265: - 539-541 (1977).
- 73.- Corsini, A.C., Costa, M.C., Olivera, O.L.P., Camargo, -- I.J.B., and Rangel, H.A.: A fraction (Fad) from Trypano- nosoma cruzi epimastigotes. Immunol., 40: 505-511 (1980).
- 74.- Clinton, B.A., Stauber, L.A. and Falczuk, N.C.: Leishma- nia donovani : antibody response to chicken ovalbumin by infected golden hamster. Exp. Parasitol., 25: 171 (1969).

A N E X O

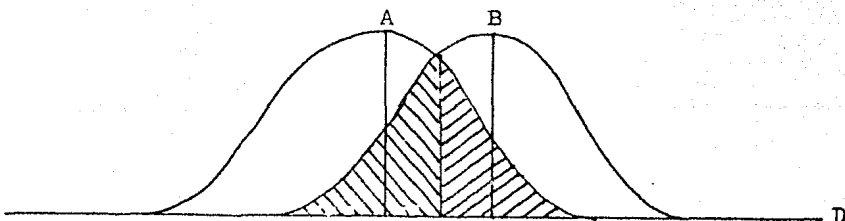
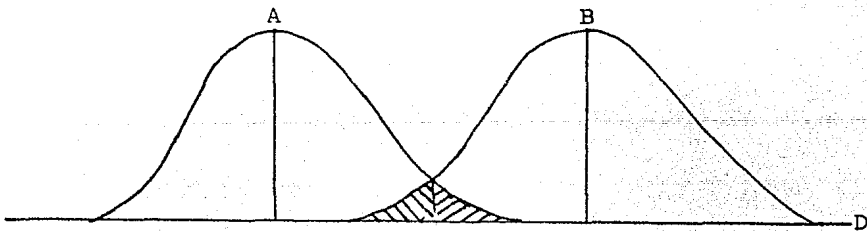
## ANALISIS DESCRIMINANTE

### Objetivos:

- 1) Determinar si existen diferencias significativas -- entre los promedios de los valores de "p" variables de 2 o más grupos.
- 2) Establecer promedios para clacificar un elemento -- nuevo a un grupo determinado, en base a sus valores sobre las "p" variables.
- 3) Determinar cual o cuales de las "p" variables establecen el mayor poder discriminatorio de los 2 o -- más grupos.

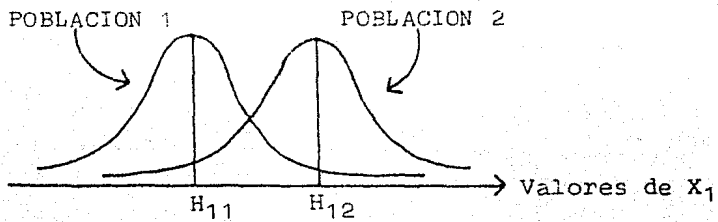
### LOGICA DEL ANALISIS DESCRIMINANTE.

- 1) Obtención de la(s) función(es) discriminante(s) (D).
- 2) Validación de la(s) función(es) discriminante(s).
- 3) Interpretación de la(s) función(es) discriminante(s).



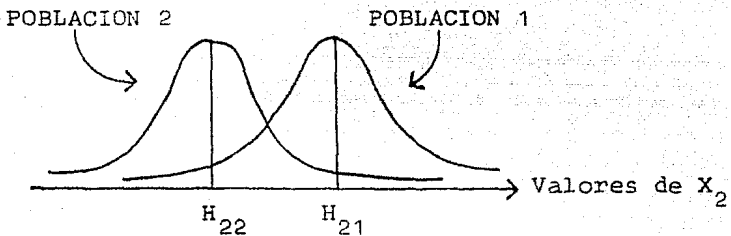
Representación univariada de la función discriminante D.

"Traslape" entre poblaciones 1 y 2 para los valores de  $X_1$

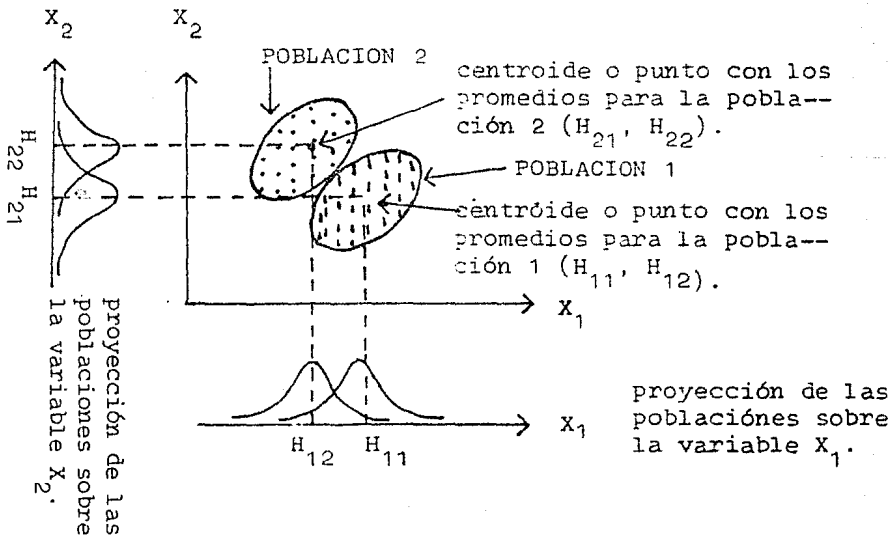


Por separado para  $X_2$  la situación puede ser como sigue:

"Traslape" entre poblaciones para los valores de  $X_2$ .



Situación al considerar conjuntamente las variables  $X_1$  y  $X_2$ .



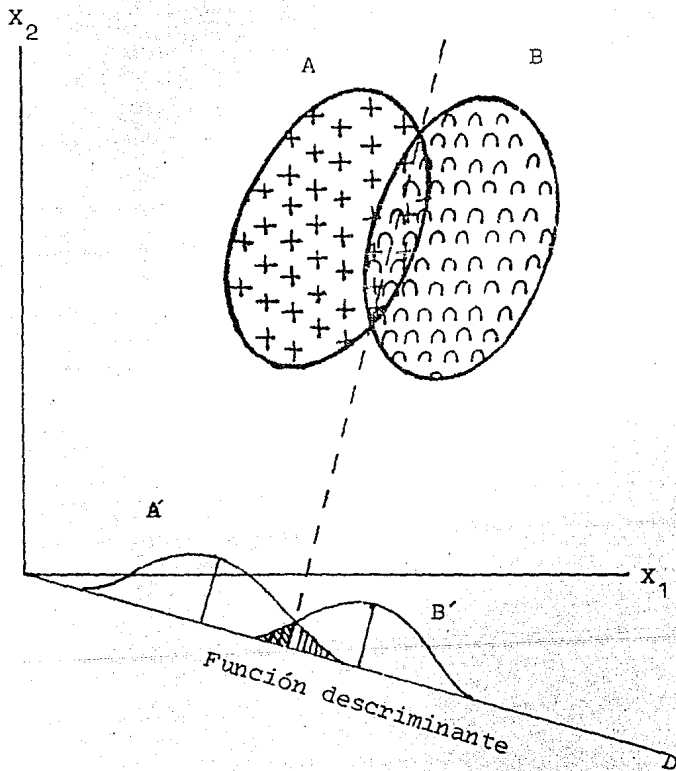
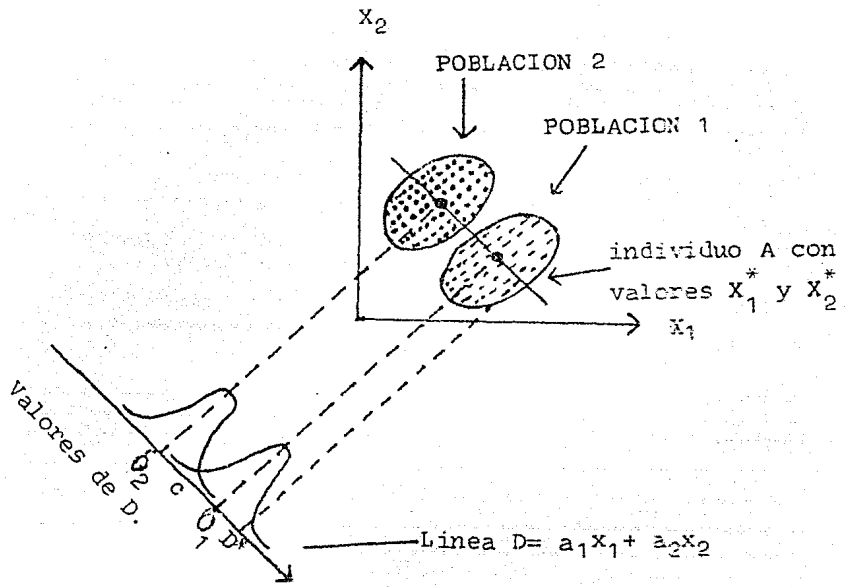
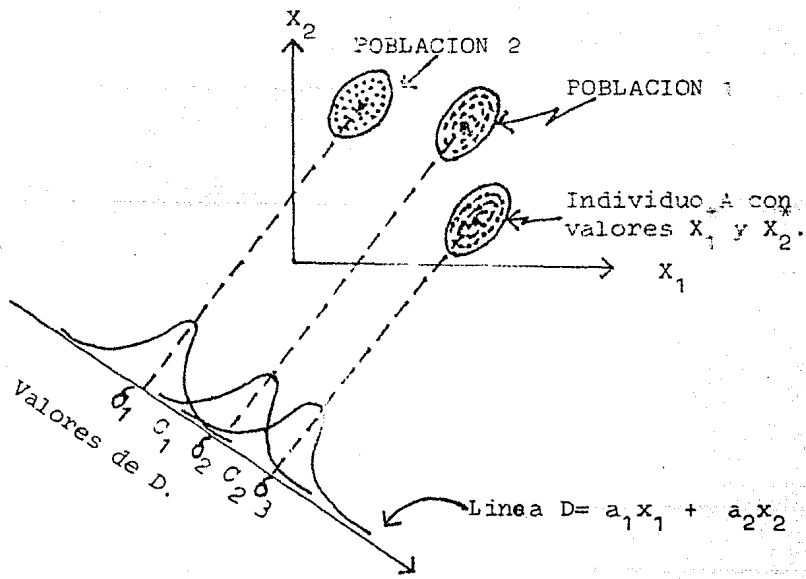


Ilustración gráfica de un análisis discriminante de 2 grupos

Función discriminante para dos poblaciones y dos variables.



Función discriminante para tres poblaciones y dos variables.





	No parasitados (Grupos 0)	Parasitados (Grupos 1)	Total
Total	10.0000	10.0000	20.0000

Obtención de la función discriminante.

Designación de variables.

$V_2$  = Tétanos.

$V_3$  = Pertussis.

$V_4$  = Difteria.

Medias aritmeticas.

	Grupo 0	Grupo 1	Total
$V_2$ =	175.8700	205.3840	190.6270
$V_3$ =	8192.0000	3392.0000	5792.0000
$V_4$ =	6.6000	3.6000	5.1000

Desviación estándar.

	Grupo 0	Grupo 1	Total
$V_2$ =	40.7893	51.2256	47.5427
$V_3$ =	4946.3899	2830.9904	4631.3095
$V_4$ =	1.6465	1.2649	2.1001

Matriz de correlaciones dentro de los grupos.

	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>
V <sub>2</sub>	1.0000		
V <sub>3</sub>	0.6128	1.0000	
V <sub>4</sub>	-0.2344	0.3269	1.0000

Lambda de Wilks (Estadístico U) y razón F univariada con 1 y 18 grados de libertad.

Variable	Lambda de Wilks	F
V <sub>2</sub>	0.8986	2.0315
V <sub>3</sub>	0.7173	7.0933
V <sub>4</sub>	0.4630	20.87663

ANALISIS DESCRIMINANTE.

Función discriminante	Eigenvalor	% Relativo
1	1.45756	100.00

Correlación canónica	Funciones derivadas	Lambda de Wilks	Grados de libertad
0.7700	0	0.4069	3

Significancia

0.002

Los restantes calculos se basan en una só la función discriminante.

Coefficientes de la función discriminante.

	No estandarizados	Estandarizados
V <sub>2</sub>	0.00841	0.40002
V <sub>3</sub>	-0.00012	-0.53816
V <sub>4</sub>	-0.23172	-0.48664
Constante	0.25089	

Centroides de los grupos en espacio reducido.

<u>Grupo</u>	<u>Función 1</u>
0 (No parasitados)	-0.75062
1 (parasitados)	0.75062

(ver gráfica)

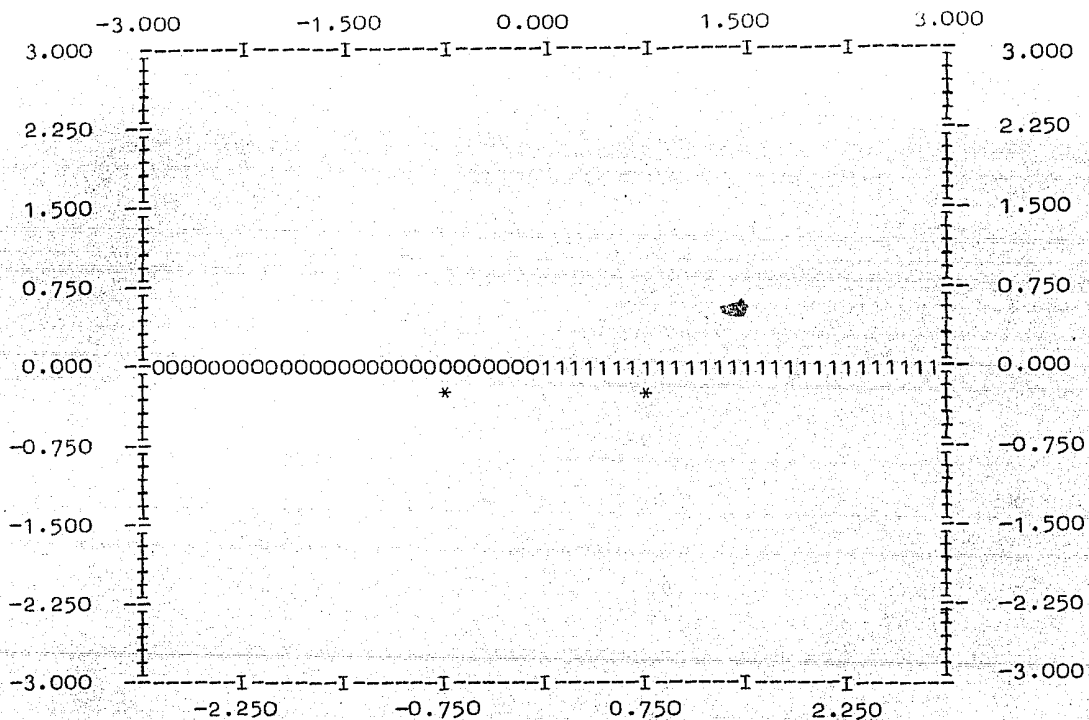
Predicción de resultados.

Grupo actual	No. de casos	Número de grupos predichos en el:	
		<u>Grupo 0</u>	<u>Grupo 1</u>
Grupo 0 (No parasitados)	10	8 (80.0%)	2 (20.0%)
Grupo 1 (Parasitados)	10	1 (10.0%)	9 (90.0%)

Porcentaje de casos correctamente clasificados:

85.00%

MAPA TERRITORIAL DE LA FUNCION DESCRIPTIVA.



El signo \* indica el centroide del grupo.

B I B L I O G R A F I A

Hair, J.S. et. al. : Multivariate data analysis. Edit.  
Petroleum, Publishing Company, pp. 81-113, 1979.