

11  
201

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

PERFIL DE CITOCINAS EN LA FASE TEMPRANA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN UN MODELO MURINO.

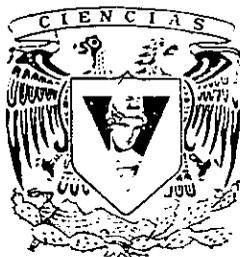
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

JUDITH ARAGON SULIK



ASESOR: DR. VICTOR MANUEL MONTEON PADILLA

CIUDAD UNIVERSITARIA.



1998

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

62879



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"PERFIL DE CITOCINAS EN LA FASE TEMPRANA DE LA ENFERMEDAD DE  
CHAGAS EN UN MODELO MURINO"  
realizado por

JUDITH ARAGÓN SULIK  
con número de cuenta 9354865-8 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis DR. VICTOR MANUEL MONTEÓN PADILLA *Victor Monteon*  
Propietario

Propietario DRA. ENEDINA JIMENEZ CARDOSO *Enedina Jimenez*

Propietario QFB. FERNANDO RAMOS REYES *Fernando Ramos*

Suplente M. EN CROSA ELENA SARMIENTO SILVA *Crosa Elena*

Suplente DR. ALEJANDRO CRUZ REYES *Alejandro Cruz*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*Alejandro Martinez Mena*  
M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

**"PERFIL DE CITOCINAS EN LA FASE TEMPRANA DE LA ENFERMEDAD  
DE CHAGAS EN UN MODELO MURINO"**

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA  
"IGNACIO CHÁVEZ" BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. VÍCTOR MANUEL MONTEÓN  
PADILLA.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
1.- INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades	3
1.2 Distribución geográfica	3
1.3 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.4 Fases de la enfermedad de Chagas	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Participación de las citocinas en la enfermedad de Chagas	12
2.2 Inmunosupresión ocasionada por <i>T. cruzi</i>	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Inoculación de animales	21
5.2 Curva de parasitemia	21
5.3 Extracción de RNA total	22
5.4 Procesamiento de músculo esquelético para la extracción de RNA	24
5.5 Procesamiento de piel para la extracción de RNA	25
5.6 Separación de células adherentes y no adherentes	26

5.7 Cuantificación de RNA	27
5.8 Síntesis de cDNA	27
5.9 Reacciones de RT-PCR	28
5.9.1. Electroforesis	30
6. RESULTADOS	31
6.1 Curva de parasitemia	31
6.2 Análisis del patrón de citocinas en ratones infectados con <i>T. cruzi</i> .	31
7. DISCUSIÓN	41
8. CONCLUSIONES	51
9. PERSPECTIVAS	52
10. BIBLIOGRAFÍA	53

## RESUMEN

Debido a la importancia de la infección ocasionada por el parásito *Trypanosoma cruzi* en humanos y considerándose un problema de salud (Velasco, 1991) es de gran interés el conocimiento de los mecanismos inmunológicos tempranos que se llevan a cabo en el hospedero mamífero.

La dificultad para realizar estudios en humanos durante las primeras etapas de la infección, nos conduce a realizarlos en modelos animales como el murino, es por esto que en este trabajo se utilizó este modelo de la cepa BALB/c.

La determinación de un perfil de citocinas; moléculas importantes en el desarrollo de las respuestas inmunes humoral y celular, nos proporciona de cierta manera información sobre los mecanismos inmunológicos que se puedan estar llevando a cabo durante la infección. Por lo que se determinó la expresión de 5 citocinas que se consideran importantes en las respuestas inflamatoria e inmune como son: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , mediante ensayos de RT-PCR, en 3 tejidos diferentes: piel o sitio de inoculación, músculo esquelético gastrocnemio y ganglio linfático popíleo, a diferentes tiempos post-infección (1, 2, 5, 10, 15, 20 y 27 días). Este estudio se realizó inoculando tripomastigotes metacíclicos (1000 parásitos/20 $\mu$ l) en el cojinete plantar de los animales, de esta forma se trató de aproximar a lo que sucede en una infección natural.

Se encontró que no hubo una expresión de citocinas los primeros días post-infección en piel (1, <20) por lo que se propone exista una inmunosupresión inducida por el parásito, y posteriormente hay una expresión de 3 citocinas anti-inflamatorias como son IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4.

En el músculo esquelético también se expresan IL-10 y TGF- $\beta$  , por lo que se sugiere que están favoreciendo la persistencia del parásito, inhibiendo la función de IFN- $\gamma$  para activar células efectoras como macrófagos.

En el ganglio linfático regional se observó una mezcla de citocinas Th1/Th2, detectándose IL-2, IFN-  $\gamma$ , IL-2, IL-4 y TGF- $\beta$  con una expresión diferencial a lo largo del estudio. Descartando la posibilidad de la relación entre la polarización de un tipo de respuesta (Th1 ó Th2) con la protección del hospedero en contra del parásito.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere que debe existir un fenómeno de inmunosupresión inducido por el parásito, presentado en piel y músculo esquelético.

El acervo genético del hospedero, la dosis antigénica y el estado de desarrollo del parásito que es inoculado influyen en los mecanismos inmunológicos que se llevan a cabo durante la infección.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 GENERALIDADES

La infección humana con el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas o Tripanosomosis americana, la cual afecta aproximadamente a 18 millones de personas en todo el mundo, por lo tanto se ha considerado un problema importante de salud humana en Latinoamérica (Velasco, 1991).

### 1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Inicialmente se pensó que la enfermedad de Chagas estaba limitada a Brasil, pero se han encontrado casos en Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Guatemala, El Salvador, México y Texas (EUA).

Por lo que respecta a México, se han registrado casos en casi todo el país, siendo los estados del sur de mayor endemismo, como son: Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Es importante hacer notar que la poca difusión y conocimiento de la enfermedad hace que se detecte con poca frecuencia (Cruz, 1987).

En México fue Mazzotti, quien en 1940 descubrió los primeros casos de la enfermedad, procedentes del estado de Oaxaca (Mazzotti, 1940).

### 1.3 CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi*, el cual posee un ciclo de vida complejo, ya que necesita de un hospedero definitivo [generalmente animales homeotermos o de sangre caliente, principalmente mamíferos como: gatos, perros, tlacuaches, ratas, ratones y el hombre entre otros] y de un hospedero intermediario o vector (artrópodos hemípteros comúnmente llamados chinches, pertenecientes a la familia Reduviidae).

Dependiendo del microambiente en el cual *T. cruzi* es encontrado, se presenta en cuatro formas diferentes: amastigotes, epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos.

El vector reduído llega a ser infectado por ingerir tripomastigotes presentes en la sangre periférica de un mamífero infectado. Los microorganismos se multiplican como epimastigotes en el intestino del vector y durante las siguientes 2 a 4 semanas se transforman en tripomastigotes metacíclicos en la ámpula rectal del vector; éste al alimentarse de un organismo de sangre caliente (mamíferos entre ellos el humano), las formas infecciosas de *T. cruzi* son excretadas en las heces e infectan a este individuo, al entrar a través de una abrasión en la piel o a través de las membranas mucosas como la conjuntiva. Después de 1 o 2 semanas a la infección establecida, los tripomastigotes comienzan a migrar del sitio de entrada al torrente sanguíneo y producen un estado septicémico con una dispersión extensiva del parásito. Los tripanosomas permanecen en el torrente sanguíneo por un período y dejan éste para invadir células de tejidos preferentemente

musculares y células de la glia del hospedero (Melhorn, 1988). Una vez dentro de las células, el tripomastigote se transforma en amastigote y se multiplica por fisión binaria a tal grado de escapar por lisis celular; estos amastigotes se transforman en tripomastigotes y entran a la circulación para infectar otras células y así perpetuar la infección dentro del hospedero (Figura 1).

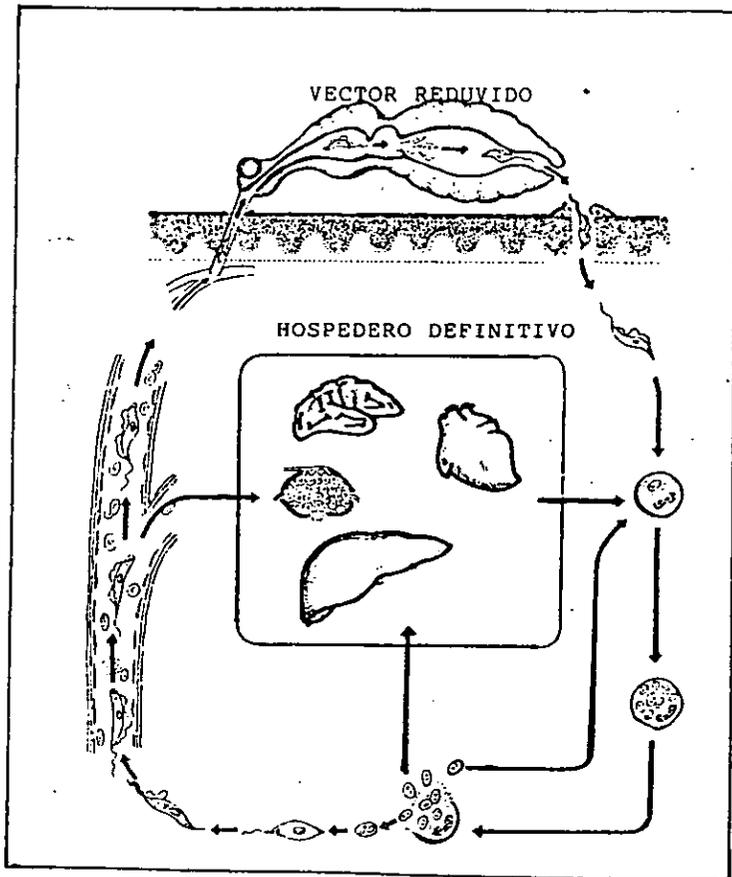


FIG. 1. CICLO DE VIDA DE Trypanosoma cruzi

#### 1.4 FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Esta infección se caracteriza por tres fases: la aguda, de corta duración que va de días a 5 semanas aproximadamente, en la cual se detectan numerosos parásitos circulantes, en los casos parasitológica y serológicamente comprobados y que llegan a ser sintomáticos, se presenta fiebre elevada (hasta 40°C), y a veces miocarditis, vómito, diarrea, con frecuencia se puede reconocer la puerta de entrada del parásito: el signo de Romana cuando sucede en conjuntiva o chagoma de inoculación cuando sucede en cualquier otro sitio, también puede presentarse una hepatoesplenomegalia moderada y crecimiento de los ganglios linfáticos; la mayoría de los síntomas ceden después de 4-8 semanas (Kreier, 1977).

La segunda fase es la indeterminada, cuya duración va de 10 a 20 años, en ésta la tripanosomosis aparenta haber desaparecido espontáneamente, sin embargo, un bajo nivel de parasitemia persiste y puede perdurar así toda la vida del individuo o progresar a la fase crónica; esta última etapa se caracteriza principalmente por miocarditis, insuficiencia cardíaca progresiva que es irreversible, pudiendo llegar a la muerte súbita .

## 2. ANTECEDENTES

Durante la infección con *T. cruzi* el sistema inmune del hospedero tiene una participación variada para contrarrestarla. Las respuestas inmune celular y humoral juegan un papel esencial en el desarrollo de la patogenia en la enfermedad de Chagas humana y experimental, sin embargo, los mecanismos exactos a través de los cuales la respuesta media la patogenia no están completamente entendidos.

La inmunidad celular desempeña un papel muy importante en la fase temprana de la infección, ya que los macrófagos activados destruyen rápidamente a los parásitos limitando su reproducción, así mismo hay una participación de los eosinófilos con la expulsión activa de sus gránulos, jugando un papel importante en la destrucción extracelular de *T. cruzi* en ausencia de anticuerpos (Villalta y Pankrats, 1987).

Sin embargo, la inmunidad del hospedero es evadida de diferentes formas por *T. cruzi*. Por ejemplo, el parásito al ser fagocitado por los macrófagos escapa del fagolisosoma y se reproduce infectando a la célula, esto se debe a que los tripomastigotes metacíclicos secretan sustancias, las cuales inhiben la fusión lisosomal, evitando su muerte (Melhorn, 1988).

El éxito del parásito en mantener su ciclo de vida está relacionado con su capacidad para causar una infección persistente en hospederos vertebrados, favoreciendo así su encuentro con el vector, lo cual refleja adaptaciones evolutivas que les permiten evadir o resistir los mecanismos efectores de la respuesta inmune. Así mismo, para mantener la infección latente, es claramente

importante la existencia de una interacción balanceada entre el parásito y el sistema inmune del hospedero (Camargo *et al.*, 1997).

El control de la carga parasitaria y sobrevivencia del hospedero dependen de la "inmunidad efectiva" mediada por la producción de anticuerpos protectores (inmunidad humoral) que depende de la participación de células Th o células cooperadoras CD4+, así mismo, la activación de macrófagos para la eliminación intracelular del protozooario (respuesta inmune celular) y los mecanismos efectores dependientes de moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) asociadas a la actividad de células T CD8+ (Abrahamsohn y Coffman, 1996).

Las células T CD4+ juegan un papel central en controlar las funciones efectoras específicas en esta infección.

Existen dos subgrupos de células T CD4+, el primero cuyo fenotipo es el Th1, el cual sintetiza citocinas proinflamatorias como: IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2 entre otras. Este tipo de respuesta de forma general promueve la inmunidad celular por lo que se genera contra parásitos intracelulares como *T. cruzi*, además de estimular la expresión de ciertas inmunoglobulinas como son: IgG2a e IgG3. El subgrupo Th2 se caracteriza por la producción de citocinas como: IL-4, IL-10, IL-5 y TGF- $\beta$  entre otras, en esta respuesta se induce generalmente la inmunidad humoral, por lo que se genera contra parásitos extracelulares, además de regular la respuesta inflamatoria, ya que las citocinas producidas por el subgrupo Th2 son antagónicas a las proinflamatorias (Scott y Kauffmann, 1991).

Debido a que las respuestas Th1 y Th2 promueven el desarrollo de actividades efectoras que favorecen determinadas condiciones, las células T CD4+ pueden en algunos casos influir en la susceptibilidad o resistencia al parásito. El desarrollo de una respuesta inapropiada puede dirigir a una inmunidad defectuosa y potenciar la patogenicidad.

Existen algunos factores que se ha demostrado juegan un papel importante en polarizar la respuesta inmune Th1 o Th2 en contra del parásito, como son: 1) el acervo genético del hospedero, 2) la ruta de inmunización, 3) el tipo de Células Presentadoras de Antígenos (CPA's) que participan de forma inmediata, 4) el receptor de la célula T (TCR) y otras moléculas accesorias y 5) la dosis del antígeno. Sin embargo, el inductor más efectivo en la diferenciación de las células T CD4+ parece ser el ambiente local de citocinas, ya que ciertos estudios han demostrado que en dicho ambiente durante la activación de células T, determina la última vía de diferenciación que se sigue (Scott y Kauffmann, 1991)

Es de gran importancia mencionar algunas de las características de las moléculas que participan en la polarización de la respuesta de las células T CD4+ y en la regulación de las respuestas inflamatoria e inmune: las citocinas, éstas son proteínas glucosiladas que actúan como mensajeros químicos, es decir, son mediadores de la inmunidad natural y adquirida. Estas moléculas son producidas por una variedad de tipos celulares (figura 2), así mismo, su actividad es pleitrópica, es decir, actúan sobre diferentes tipos celulares (Abbas *et al.*, 1994).

La secreción de las citocinas es un evento breve y limitado, puesto que se producen en el momento y lugar que se les requiere, además de que no se

almacenan en forma de moléculas precursoras, sino que su síntesis es debida a una transcripción inducida. Esta activación de la transcripción es transitoria y los RNA<sub>m</sub> sintetizados son muy inestables. Algunas citocinas son reguladas de forma adicional por mecanismos post-transcripcionales (Abbas *et al.*, 1994).

Las citocinas forman parte de un sistema en el que ellas pueden dirigir diferentes mensajes específicos a una sola célula o traer el mismo mensaje a diferentes células. La forma en la que este mensaje es interpretado depende de la citocina y de su receptor, la célula en la cual actúa y los otros mensajes que la célula en particular está recibiendo al mismo tiempo (Abbas *et al.*, 1994)

La expresión de muchos receptores para citocinas es regulada por señales específicas, siendo la citocina específica para ese receptor u otra con características conformacionales similares que al unirse al receptor generen una regulación positiva, o bien al unirse otro tipo de citocinas generen una regulación negativa.

Frecuentemente las citocinas influyen en la síntesis y en la acción de otras, dirigiendo cascadas en las cuales una segunda o tercer citocina pueden mediar los efectos biológicos de la primera (Abbas *et al.*, 1994)

Existen citocinas encargadas de polarizar la respuesta hacia Th1 o Th2, por ejemplo la IL-12 dirige la respuesta hacia Th1 y la IL-4 hacia Th2, de esta última sólo son necesarias pequeñas concentraciones para inducir la sobre-regulación de los genes de IL-4 e IL-4R de forma autócrina y polarizar la respuesta (Rincón *et al.*, 1997).



En la inmunidad natural las citocinas actúan como mediadores, ya que su síntesis es inducida por agentes infecciosos en fagocitos mononucleares, también son reguladores de la activación de linfocitos, crecimiento y diferenciación cuando son inducidas en respuesta al reconocimiento específico de un antígeno por linfocitos T. Así mismo, son importantes en la transformación neoplásica, destrucción, reparación, remodelación de tejidos y mecanismos de defensa (Hoefakker *et al.*, 1995).

Algunos mecanismos celulares y moleculares deben operar para asegurar que la especificidad de la respuesta inmune sea mantenida como por ejemplo, la expresión y regulación de las citocinas y sus receptores en las células, así como la interacción célula-célula para la producción de concentraciones efectivas de una o varias citocinas en particular en la unión de las células interactuantes (Figura 2). También es muy importante considerar la vida media de las citocinas en el torrente sanguíneo y otros fluidos extracelulares dentro de los cuales ellas son secretadas y que es generalmente muy corta, teniendo que asegurarse que actúen por un período de tiempo limitado. Sin embargo, los factores y los mecanismos que determinan el comienzo de una respuesta inmune en la cual un grupo de citocinas será producido aún se desconoce.

## 2.1 PARTICIPACIÓN DE LAS CITOCINAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

El control de la parasitemia de *T. cruzi* durante las primeras semanas de la infección es considerado críticamente dependiente de citocinas, las cuales median *in vitro* la activación de macrófagos para la muerte intracelular del parásito (Silva *et al.*, 1992).

Ciertos estudios muestran la participación de las citocinas en diferentes aspectos de la enfermedad de Chagas experimental y han sugerido que IL-2 e IFN- $\gamma$  ofrecen una protección durante la fase aguda para reducir la parasitemia, mientras que IL-10 se ha asociado con la disminución de la protección (Silva *et al.*, 1992).

Hunter *et al.*, (1997) sugieren una correlación entre la producción de IL-10 en ratones infectados ya sea con la susceptibilidad o resistencia a *T. cruzi*. La capacidad de IL-10 para inhibir la muerte o fagocitosis de *T. cruzi* por macrófagos, así como la producción de anti-citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ ) importantes en la resistencia a *T. cruzi* es una probable explicación para la asociación de la producción de IL-10 con la susceptibilidad a estos parásitos.

La importancia de IFN- $\gamma$  para el control de la parasitemia por *T. cruzi* está bien establecida, ya que el tratamiento con anti-IFN $\gamma$  *in vivo* no solamente neutraliza su acción como principal citocina activadora de macrófagos sino que también se potencia la síntesis de IL-10. Así mismo, la protección mediada por IFN- $\gamma$  al comienzo de la infección (entre 13 y 21 días post-infección) es evidente, ya que los niveles de anticuerpos son todavía muy bajos. Torrico *et al.* (1991) propusieron que en el modelo murino el IFN- $\gamma$  controla el primer paso de la multiplicación del

parásito al activar células efectoras permitiéndole al hospedero sobrevivir y montar una respuesta inmune humoral y celular mejor establecidas, las cuales en una segunda fase tratan de eliminar la población parasitaria restante.

La IL-10 originalmente denominada como Factor Inhibidor de la Secreción de Citocinas (FISC), antagoniza la acción de ciertas citocinas activadoras de macrófagos, también puede inhibir la síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-12 por parte de macrófagos y de IFN- $\gamma$  e IL-12 por linfocitos (Mosmann, 1994).

La importancia de la síntesis de IL-10 endógena es prevenir la inmunopatogenia mediada por citocinas en infecciones causadas por parásitos intracelulares como *T. cruzi*.

Hunter *et al.* (1997) demostraron que en ausencia de IL-10 la replicación de *T. cruzi* es menos eficiente, indicada por las bajas parasitemias sanguíneas y por la disminución de parásitos encontrados en ratones deficientes en IL-10 (knock out) infectados con *T. cruzi*.

Se ha encontrado que IL-10 ejerce un papel regulador importante en la resistencia a la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, IL-10 también es un regulador esencial de las respuestas inmune adquirida e inflamatoria que resultan perjudiciales para el hospedero. Este papel regulador puede ser muy importante para controlar la patogenia en situaciones de intensa activación de la respuesta con citocinas proinflamatorias o de tipo Th1, como ocurre en la infección con *T. cruzi* (Abrahamsohn y Coffman, 1996).

Cuando hay baja producción de IL-10 se ha encontrado una mayor producción de TNF- $\alpha$ , el cual sinergiza la acción de IFN- $\gamma$  para activar a los macrófagos, los

cuales se encargan de eliminar a *T. cruzi*. También se ha demostrado que IL-10 inhibe la acción tripanocida *in vitro* de macrófagos activados con IFN- $\gamma$ . Sin embargo, las elevadas concentraciones de TNF- $\alpha$  durante la infección con *T. cruzi* puede acelerar la muerte del organismo hospedero, con respecto a esto, Zhang y Tarleton (1996b) observaron que en ratones susceptibles la producción de TNF- $\alpha$  fue más temprana y vigorosa, causando la muerte del animal en etapas tempranas probablemente por estar relacionado con el síndrome de desgaste.

El TNF- $\alpha$  disminuye la producción de IL-10 e incrementa la producción de óxido nítrico (NO), indicando dos de los mecanismos por los que esta citocina controla al parasitismo intracelular (Abrahamsohn y Coffman, 1996).

A pesar de que a IL-10 la han relacionado con la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* por ser un potente inhibidor de los mecanismos involucrados en resistencia, su ausencia provoca una respuesta inmune patológica, por lo tanto Hunter *et al.* (1997) han sugerido un papel crítico de IL-10 en el mantenimiento de un balance entre la respuesta inmune patológica y una protectora durante la enfermedad de Chagas.

La participación de IL-12 en la enfermedad de Chagas es también importante, ya que estimula la producción de IFN- $\gamma$  por células T y Natural Killer o asesinas naturales (NK), así mismo potencia la actividad citotóxica de células T CD8+. Los productos microbianos y los parásitos intracelulares son poderosos estimulantes de la síntesis de IL-12 por los macrófagos. Esta citocina tiene un papel clave en la inmunidad innata, así como en el desarrollo de la respuesta inmune en contra de los microorganismos (Biron y Gazinelli, 1995). Alberti *et al.* (1996) han sugerido que

en experimentos *in vivo* los tripomastigotes inducen la síntesis de IL-12 por macrófagos normales y que esta citocina es responsable para la producción temprana de IFN- $\gamma$  observada durante la infección y es necesaria para el control subsecuente de la proliferación del parásito. Con respecto a esto, Alberti *et al.* (1996) trabajaron con ratones de la cepa C57B/8, considerándolos resistentes a la infección por *T. cruzi* (cepa Y), por la producción temprana de IL-12; a estos animales los trataron con anti-IL-12 y observaron un incremento significativo de la parasitemia al cabo de 7-12 días post-infección.

Un mecanismo de regulación de la expresión de IL-12 es la participación de IL-10, la cual reduce la respuesta Th1 por un efecto inhibitorio de la expresión de IL-12 por parte de CPA's tales como macrófagos (Rincón *et al.*, 1997).

Camargo *et al.* (1997) observaron que los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* son incapaces de desencadenar la síntesis de citocinas por macrófagos activados y no activados con IFN- $\gamma$ , por lo tanto los estados de desarrollo capaces de activar e inducir la síntesis de citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF e IL-10) son los tripomastigotes y los amastigotes, Alberti *et al.* (1996) demostraron que los epimastigotes y los extractos parasitarios no fueron capaces de inducir la secreción de citocinas por macrófagos murinos *in vitro*, no así los tripomastigotes, por lo que han sugerido que probablemente sea necesaria la penetración activa del parásito o los productos secretados o excretados por éste liberados intracelularmente.

Durante la infección experimental se ha visto la expresión de forma más o menos constante de TGF- $\beta$ , la cual participa como una citocina reguladora en procesos

inmunes, además ha sido implicada en mediar la inmunosupresión en la enfermedad de Chagas, inhibiendo la inducción del receptor de IL-2, la proliferación y diferenciación de células B, la expresión de moléculas de clase II del MHC inducidas por IFN- $\gamma$ , la generación de células T CD8+ y NK. Así mismo, tiene la capacidad de inhibir la activación de macrófagos inducida por citocinas del tipo Th1, suprimiendo la producción de oxígeno reactivo y de intermediarios nitrogenados (radicales libres importantes en la destrucción del parásito), esto implica que su participación genera cierta susceptibilidad del hospedero a la infección (Silva *et al.*, 1991).

Sin embargo, Zhang y Tarleton, (1996a) sugieren que la infección por *T. cruzi* no está necesariamente unida a un patrón exclusivo Th1 o Th2 y que existe una participación de las respuestas celular y humoral en el control del parásito, siendo necesaria una mezcla del patrón de citocinas Th1/Th2 para protección. Existen múltiples componentes del compartimento celular de la inmunidad innata y adaptativa que son simultáneamente requeridos para la resistencia a la infección en la fase aguda.

## 2.2 INMUNOSUPRESIÓN OCASIONADA POR *T. cruzi*

La infección con *T. cruzi* induce cambios en la respuesta inmune del hospedero, como son: la inmunosupresión hacia antígenos específicos y no específicos además de manifestaciones autoinmunes. Algunos de estos cambios podrían estar relacionados con alteraciones en el comportamiento de la célula T.

La esplenomegalia y la reducción del número de células en el timo, así como alteraciones en el porcentaje de marcadores de superficie (CD4+, CD8+) de células T, fué observado por Cardoni *et al.* (1996) en infecciones agudas de tripanosomosis, restaurándose estas alteraciones en la fase crónica de la infección.

Los hospederos mamíferos infectados con *T. cruzi* en la fase aguda desarrollan manifestaciones de inmunosupresión, incluyendo alteraciones funcionales de los linfocitos y de otras células relevantes en montar una respuesta inmune (Kierszenbaum y Sztejn, 1994), por lo tanto se ha demostrado que esta inmunosupresión en la enfermedad de Chagas experimental en ratón, afecta las respuestas inmunes celular y humoral.

Existe gran evidencia que apoya la participación de mecanismos funcionales de inmunosupresión durante la enfermedad de Chagas experimental, y se sugiere que ésta es en parte inducida y mantenida por macrófagos con actividad supresora, también por la actividad deficiente de células T cooperadoras y por una disminución en la producción de IL-2 (Choromanski y Kuhn, 1990) y la supresión de la expresión de su receptor IL-12R, sobre todo en el modelo murino (Kierszenbaum y Sztejn, 1994).

Existen trabajos en los que se propone la supresión de factores de transcripción para el gene de IL-2 y que esta inhibición más que la del receptor puede ser un factor crítico de inmunosupresión en la fase aguda de la enfermedad de Chagas experimental (Soong y Tarleton, 1994).

*T. cruzi* es capaz de abolir la producción de algunas citocinas importantes por algunos linfocitos T activados y está documentado por las proporciones disminuídas de células productoras de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ . Por lo tanto el parásito puede concomitantemente disminuir la expresión de más de una citocina en la misma subpoblación de células T (Kierszenbaum *et al.*, 1996).

Es de gran interés mencionar que las proporciones parásito-célula hospedera mayores de 2:1 no inducen la producción de IFN- $\gamma$  ni de IL-12 en estudios *in vitro*, posiblemente como una consecuencia de los altos niveles de la interacción celular o alternativamente debido a una inhibición activa (Alberti *et al.*, 1996).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es considerada un problema de salud humana en México. Sin embargo, debido a la poca importancia que se le ha dado, existe escasa información y más aún de los eventos tempranos que suceden en la infección por *T. cruzi*. A este respecto se han realizado pocos estudios *in vitro* e *in vivo*, ocupando los primeros la mayoría; aunque éstos aportan conocimiento, se acercan poco a lo que sucede de forma natural durante la infección, ya que ignoran intrínsecamente la organización compleja de células, tejidos y aún de órganos, así mismo reflejan el potencial de las células y factores bajo circunstancias definidas y algunas veces artificiales, mientras que estudios *in vivo* reflejan qué células y factores están actuando en un momento preciso y a un nivel más localizado.

Por este motivo se realizó el análisis de la producción de citocinas en la fase temprana y qué es lo que ocurre en el sitio de inoculación o la barrera primaria que es la piel (para poder proponer alguna inmunoterapia) y dos tejidos regionales importantes durante la respuesta inmune e inflamatoria, para obtener un mejor entendimiento de la relación entre la producción de citocinas y la evolución de la infección.

#### 4. OBJETIVOS

-Determinar el perfil de citocinas en la fase temprana a diferentes tiempos post-infección en la enfermedad de Chagas en un modelo murino.

-Correlacionar el patrón de citocinas obtenido con los eventos inmunológicos tempranos que suceden en el sitio de inoculación (piel), así como en músculo esquelético y ganglio linfático regionales.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 INOCULACIÓN DE ANIMALES. 21 ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa BALB/c adultos jóvenes (2 a 3 meses de edad), cada uno se inoculó por vía intradérmica con 1,000 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* de la cepa Ninoa en el cojinete plantar; los parásitos estaban contenidos en 20  $\mu$ l de orina del redúvido-PBS<sup>†</sup> (dilución 1:26). Se utilizaron 6 ratones como testigos, los cuales fueron inoculados con PBS solamente.

Asi mismo, se utilizaron 21 ratones, inoculados con *Crithidia luciliae* como un control negativo, en este caso el microorganismo pertenece a la misma familia de *T. cruzi* (Trypanosomatidae ) pero no se considera parásito de mamíferos.

5.2 CURVA DE PARASITEMIA. Se determinó la parasitemia en un lote de 5 ratones machos de la cepa BALB/c cada tercer día. Se tomaron 5  $\mu$ l de sangre de la cola del animal, colocándose en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. Se observaron al microscopio óptico a 250 aumentos, revisando únicamente 50 campos del área ocupada por la muestra. La concentración de parásitos se refirió a 1 ml (Brenner, 1962).

### 5.3 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Los ratones infectados con *T. cruzi* y *Crithidia luciliae*, así como los inoculados con PBS (controles) fueron sacrificados por dislocación cervical, a diferentes tiempos post-infección (1, 2, 5, 10, 15, 20 y 27 días). Se disectó la piel del sitio de inoculación, se tomaron los ganglios linfáticos regionales al sitio de inoculación y el músculo esquelético de la pata (gastrocnemio).

Los ganglios regionales recién obtenidos fueron pesados y depositados en un pozo de placa de cultivo de células, agregándoles TRIzol \* (Gibco-BRL) y homogeneizando perfectamente con un pistilo.

Posteriormente se depositó el homogenado en tubos eppendorf de 2.5 ml estériles y se agregó cloroformo (200  $\mu$ l por ml de TRIzol utilizado) tratado con Dietilpirocarbonato (DEPC) como inhibidor de RNAasas; se agitaron los tubos vigorosamente (aproximadamente 15 segundos en el vórtex), los tubos se centrifugaron a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C.

Se separó la fase acuosa con mucho cuidado, transfiriéndose a un tubo eppendorf nuevo y estéril, a ésta se le agregó isopropanol- DEPC para precipitar el RNA (500  $\mu$ l por cada ml de TRIzol utilizado inicialmente), mezclando por inversión y dejando reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto, se centrifugaron los tubos a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C, quedando una pastilla de blanquecina a transparente en el fondo del tubo, se desechó el sobrenadante y se agregó etanol- DEPC al 70% para lavar la pastilla y precipitar (por lo menos 1 ml por ml de TRIzol utilizado inicialmente), centrifugando a no

más de 7,500 x g durante 5 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se repitió esta operación dos veces más.

Más tarde se eliminó el etanol, tratando de que la pastilla quedara completamente seca, ésta se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua-DEPC.

\* Se utilizaron 500  $\mu$ l de TRIzol por cada 100 mg de tejido.

#### 5.4 PROCESAMIENTO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO PARA LA EXTRACCIÓN DE RNA.

El músculo esquelético recién obtenido de los ratones fue pesado y depositado en tubos eppendorf de 2.5 ml, agregándoles amortiguador Tris-EDTA (10mM, 1mM a pH 8.0) 500  $\mu$ l por cada 100 mg de tejido; además de 25 mg de colagenasa (Sigma) por cada 100 mg de tejido, tratando de homogeneizar lo mejor posible con la ayuda de un pistilo, para la disgregación de las células. Se incubó la muestra a 37 °C durante una hora.

Posteriormente se trató de homogeneizar completamente el tejido y se transfirió a un tubo Falcon estéril, agregando 5 ml de Ficoll-Hypaque para la separación de células mononucleares, centrifugándose a 2,500 x g durante 30 minutos a 10 °C. La capa celular intermedia se separó y transfirió a un tubo eppendorf estéril, centrifugándose a 12,000 x g durante 5 minutos a 4 °C, eliminando el sobrenadante. Al precipitado se le agregó TRIzol (500  $\mu$ l por 100 mg de tejido ) y se procedió la extracción de RNA de acuerdo a lo descrito previamente.

## 5.5 PROCESAMIENTO DE PIEL PARA EXTRACCIÓN DE RNA.

El tejido de la piel retirado del cojín plantar de los animales se depositó en tubos eppendorf de 2.5 ml, agregando amortiguador TE (Tris-EDTA; 10mM, 1mM ;pH 8.0) 500 µl por cada 100 mg de tejido más 25 mg de colagenasa (Sigma) por cada 100 mg de tejido, tratando de homogeneizar lo mejor posible, para la disgregación de las células e incubando las muestras a 37°C durante 1 hora, posteriormente se agregó amortiguador de lisis [NaCl 100 mM , Tris-Cl 10 mM, EDTA 25mM, SDS\*\* 0.5% pH 8.0, proteinasa K\*\* 0.1 mg/ml] 1.2 ml por cada 100 mg de tejido, incubándose 1 hora a 42 °C. Más tarde se procedió a la extracción de RNA con TRIzol .

\*\* Se agregaron en el momento de la utilización

## 5.6 SEPARACIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES Y NO- ADHERENTES

Para los tres tejidos: piel, músculo esquelético y ganglio linfático regional en los tiempos 15, 20 y 27 días post-infección se separaron las células no adherentes (Linfocitos T y B, células NK) de las adherentes (básicamente macrófagos), para saber a grandes rasgos qué poblaciones estaban expresando las citocinas.

Ganglio Linfático. Se extrajeron los ganglios linfáticos regionales de los ratones infectados y se depositaron en una placa de cultivo de células, agregando 5 ml de medio RPMI\*\* homogeneizando lo mejor posible, posteriormente se transfirió a una botella para cultivo de células y se dejó reposando por 2 horas a 37 °C . Al cabo de este tiempo se observó al microscopio invertido para comprobar que una población celular se encontraba adherida a las paredes de la botella y la otra permanecía en el medio. Después se tomó el medio de cultivo con las células no-adherentes y se depositó en un tubo estéril, centrifugando para eliminar el medio, de este paquete celular se extrajo el RNA con TRIzol.

Se lavaron las células adherentes con PBS-frío esterilizado por filtración y se separaron de la botella, transfiriéndose a un tubo estéril y centrifugando para eliminar el PBS, de igual forma que las no-adherentes se extrajo el RNA.

Músculo Esquelético y Piel. Después de retirados los tejidos se procedió de la misma forma que ya se mencionó para extraer el RNA de Músculo esquelético, hasta la separación de células mononucleares. esta capa celular se depositó en una botella para cultivo de células y se dejó reposando por 2 horas a 37°C y se procedió de acuerdo a lo descrito anteriormente.

#PBS: 3.56 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$   
0.52 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
8.5g NaCl

Aforar a 1 l con agua.

##RPMI: Preparación de 100 ml de medio RPMI-1640. Pesar 1.04 g de medio en polvo y disolverlos en 92.5 ml de agua, filtrar con papel filtro.

Esterilizar por filtración. Posteriormente añadir 1 ml de penicilina-estreptomicina 100X (10000 U/ g/ml). Añadir 15 ml de suero fetal de ternera.

⊖TBE: EDTA 0.744 g pH8.0 ; Tris base 10.8 g; ácido bórico 5.5 g.  
Aforar a 1 l con agua y ajustar el pH a 8.3.

## 5.7 CUANTIFICACIÓN DE RNA

Se cuantificó el RNA total extraído de los tres diferentes tejidos, midiendo la densidad óptica (en un espectrofotómetro Beckman) de una dilución 1:1000 de la muestra en agua-DEPC a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm para conocer la pureza y que no hubiese gran cantidad de proteína que pudiera interferir en las reacciones de síntesis de cDNA. Para conocer la cantidad de RNA se realizó una relación, tomando en cuenta que en 1 D.O hay 40 µg de RNA/ml.

## 5.8 SÍNTESIS DE cDNA.

Del total de RNA solamente se requirió de los mensajeros, por lo tanto se sintetizó su copia a cDNA, para su posterior amplificación.

Se empleó una cantidad de RNA total que fue de 1- 5 µg en 1 µl.

En tubos eppendorf de 500 µl se depositó 1 µl de la muestra más 1 µl de Oligo-dT (1 µg/µl) (Promega; C1101). Se incubó a 70 °C durante 10 minutos, posteriormente se agregó 1µl de deoxinucleótidos (10mM), 2 µl de amortiguador de reacción 5X, 2 µl de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 3 mM y 2 µl de DTT, mezclando suavemente y por último se agregó 1 µl de enzima transcriptasa reversa (M-MLV Reverse Transcriptasa; GibcoBRL 28025-013) 200 U/µl, se incubó durante 1 hora a 37 °C. Al cabo de este tiempo se detuvo la reacción incubando las muestras a 70 °C durante 15 minutos.

## 5.9 REACCIONES DE RT-PCR.

Se realizaron reacciones de PCR (Protein Chain Reaction; Reacción en cadena de la Polimerasa) para 5 citocinas, utilizando oligonucleótidos cuyas secuencias se presentan en la cuadro 1. Las reacciones se realizaron bajo las siguientes condiciones:

Amortiguador de reacción (Promega) 10 X	5 $\mu$ l
Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ ), (Promega) 3 mM	3 $\mu$ l
dNTP's 1.25 mM	1 $\mu$ l
Agua estéril	Se completó a un volumen final de 50 $\mu$ l
Oligonucleótido Sentido 5 $\mu$ M	3 $\mu$ l
Oligonucleótido Antisentido 5 $\mu$ M	3 $\mu$ l
Muestra de cDNA	1 $\mu$ l
Taq polimerasa dilución 1:3 (1.6 unidades) (Promega M1861)	1 $\mu$ l

Las reacciones se iniciaron a 94°C durante 2 minutos.

Desnaturalización	94 °C	45 segundos
Alineación	60 °C	45 segundos
Extensión	72 °C	45 segundos

por 35 ciclos y por último la reacción se detuvo bajando la temperatura a 4 °C.

Para cada muestra se corrió un control negativo (sin muestra) y un control positivo de cDNA (utilizando citocinas comerciales; Clontech)

Así mismo, se realizaron reacciones de RT-PCR utilizando un control interno: la Hipoxantín guanín fosforibosil transferasa (HPRT) (enzima constitutiva de las

células) para todas las muestras con el fin de asegurar que la síntesis de cDNA a partir del RNA mensajero había sido eficiente, ya que no fue una PCR semi-cuantitativa, ni cuantitativa, no se tomaron unidades. Las reacciones se corrieron en un termociclador Minicycler (MJ-Research, INC). Las condiciones para la amplificación de HPRT son las siguientes: se inició a 94°C, 2 min.

94°C	1 min.
56°C	1 min
72°C	1 min

30 ciclos, finalizando a 72°C por 2 min y se detuvo la reacción a 4°C.

Cuadro 1 . Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada citocina.

CITOCIN	POSICIÓN	SECUENCIA
IFN- $\gamma$	Sentido	5'TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG GC 3'
	Antisentido	5'TGG ACC TGT GGG TTG ACC TCA AAC TTG GC 3'
IL-2	Sentido	5'TTC AAG CTC CAC TTC AAG CTC TAC AGC GGA AG3'
	Antisentido	5'GAC AGA AGG CTA TCC ATC TCC TCA GAA AGT CC3
IL-4	Sentido	5'CCA GCT AGT TGT CAT CCT GCT CTT CTT CTC CG 3'
	Antisentido	5'CAG TGA TGTGGA CTT GGA CTC ATT CAT GGT GC 3'
IL-10	Sentido	5'ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T 3'
	Antisentido	5'ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTT T 3'
TGF- $\beta$	Sentido	5'TGG ACC GCA ACA ACG CCA TGT ATG AGA AAA CC 3'
	Antisentido	5'TGG AGC TGA AGC AAT AGT TGG TAT CCA GGG CT 3'
HPRT	Sentido	5'TAT GGA CAG GAC TGA ACG TCT TGC 3'
	Antisentido	5'GAC ACA AAC ATG ATT CAA ATC AAT CCC TGA 3'

El número de pares de bases del amplificado para cada citocina fue:

IFN- $\gamma$	365 pb
IL-2	413 pb
IL-4	367 pb
IL-10	455 pb
TGF- $\beta$	573 pb
HPRT (control interno)	163 pb

Es importante mencionar que no se corrió un control de RNA sin haber realizado la síntesis de cDNA, ya que la posición de los oligonucleótidos se encontraba flanqueando exones que presentaban un intron intermedio, y por lo tanto si existiera contaminación con DNA celular el tamaño del amplificado sería mucho mayor.

#### 5.9.1 ELECTROFORESIS

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% para observar los productos amplificados. Se utilizaron 10  $\mu$ l de cada muestra más 2  $\mu$ l de Amortiguador de carga (0.25% de azul de Bromofenol, 0.25% de Xilencianol y 30 % de Glicerol), esta mezcla se depositó en los pozos del gel y se agregó amortiguador TBE para la corrida. Para comprobar que los amplificados efectivamente correspondían al peso en pares de bases de las citocinas de interés, se corrió 1  $\mu$ l de marcadores de Peso molecular de DNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Sigma; D5042).

Los geles se corrieron a 70 Volts durante 1.30 horas aproximadamente. Posteriormente se tiñieron con Bromuro de Etidio (10 mg/ ml) y se observaron en un transiluminador de luz UV.

## 6.RESULTADOS

6.1 CURVA DE PARASITEMIA. Se detectaron parásitos el día 14 posinfección, en una concentración de 3844 parásitos por ml, resultando el 100 % de tripomastigotes o formas gruesas. El pico de parasitemia se alcanzó entre los días 28 y 30 con una concentración de 469,736 parásitos por ml para el día 30, como se observa en la figura 3. Encontrándose 91.74% de tripomastigotes o formas gruesas y un 8.25% de tripomastigotes sanguíneos de forma delgada.

6.2 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE CITOCINAS EN RATONES INFECTADOS CON *T. cruzi*. En la figura 4(a-g) se muestran las electroforesis de los amplificadores encontrados para determinar el patrón de citocinas en piel, se observa que en el control negativo no hubo amplificación por lo que se descarta la posibilidad de contaminación, así mismo el control positivo de cDNA de citocinas comerciales (Clontech) amplificaron bandas correspondientes al peso esperado de cada citocina, así mismo, se observa en el cuarto carril de cada gel la banda correspondiente al control interno HPRT. El perfil de citocinas para este tejido se muestra de forma general en el cuadro 2.

La expresión de citocinas usando RT-PCR en piel nos muestra que no hay detección de ésta en una fase muy temprana de la infección (1 a < 20 días) y no es hasta el día 20 post-infección donde se expresa IL-10 y TGF- $\beta$ , siendo su fuente principal células adherentes muy probablemente macrófagos, para el día 27 se siguió detectando TGF- $\beta$ , pero no IL-10 pensando en una expresión transitoria, y detectándose la expresión de IL-4 otra citocina del tipo Th2, para estas citocinas

su fuente principal fueron células no adherentes probablemente células T (cuadro 9). Comparando el patrón obtenido en este tejido con los individuos controles inoculados con *C. luciliae* y con PBS, se observa una expresión diferencial, es decir, para los individuos infectados con *T. cruzi* no hay expresión de citocinas en los primeros días post-infección, de forma contraria para *C. luciliae* en el primer día se detecta IL-10 que se expresa de forma transitoria y no hay expresión posterior de ninguna citocina analizada (cuadro 5) y para los controles con PBS no hay expresión de ninguna citocina (cuadro 8)

En el cuadro 3 se muestra el perfil de citocinas de forma general para ganglio linfático regional, el cual se observa en la figura 5 (a-g); donde se presentan los geles de las electroforesis con las bandas que amplificaron por la presencia de cDNA de las citocinas de interés. En este tejido se observa que para el día 1 post-infección hay una mezcla de citocinas Th1/Th2 con la participación de 3 de éstas IL-2, IL-10 y TGF- $\beta$ . La expresión de esta última se mantiene de manera más o menos constante a lo largo de la fase temprana concordando estos resultados con los obtenidos por Zhang y Tarleton (1996b). Se puede observar que la expresión de IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-4 es transitoria y que existe una regulación estrecha entre éstas. En el cuadro 10 se observa la fuente de estas citocinas para los tiempos 15, 20 y 27 días post-infección. Al comparar estos resultados con los controles de *C. luciliae* (cuadro 6) observamos que para éstos solamente se detectó TGF- $\beta$  (citocina de tipo anti-inflamatorio) en los primeros tiempos post-infección (1 y 5 días). Así mismo para los controles con PBS se detectó IL-10 y TGF- $\beta$ (cuadro 8).

En el cuadro 4 se presenta el perfil de citocinas del músculo esquelético, mostrado en la figura 6 (a-g), observándose las bandas de los amplificadores correspondientes a las citocinas detectadas.

De acuerdo a lo propuesto por Hunter *et al.* (1996) existe una expresión constante de TGF- $\beta$ , la cual se pudo constatar con los resultados obtenidos en músculo esquelético, detectándose el RNA<sub>m</sub> de esta citocina el día 2, 10 y 15 post-infección, cuya fuente fue para el día 15 post-infección; células adherentes probablemente macrófagos (cuadro 11). También se detectó IL-10, otra citocina del tipo anti-inflamatorio para los días 15 y 20 post-infección cuya fuente fue para el día 15, células no adherentes y para el día 20 fueron células adherentes y no adherentes (cuadro 11). En los controles con *C. luciliae* solamente se expresó TGF- $\beta$  para el día 2 post-infección, no detectándose ninguna citocina en días posteriores (cuadro 7), de forma similar no hubo detección de citocinas en los controles con PBS (cuadro 8).

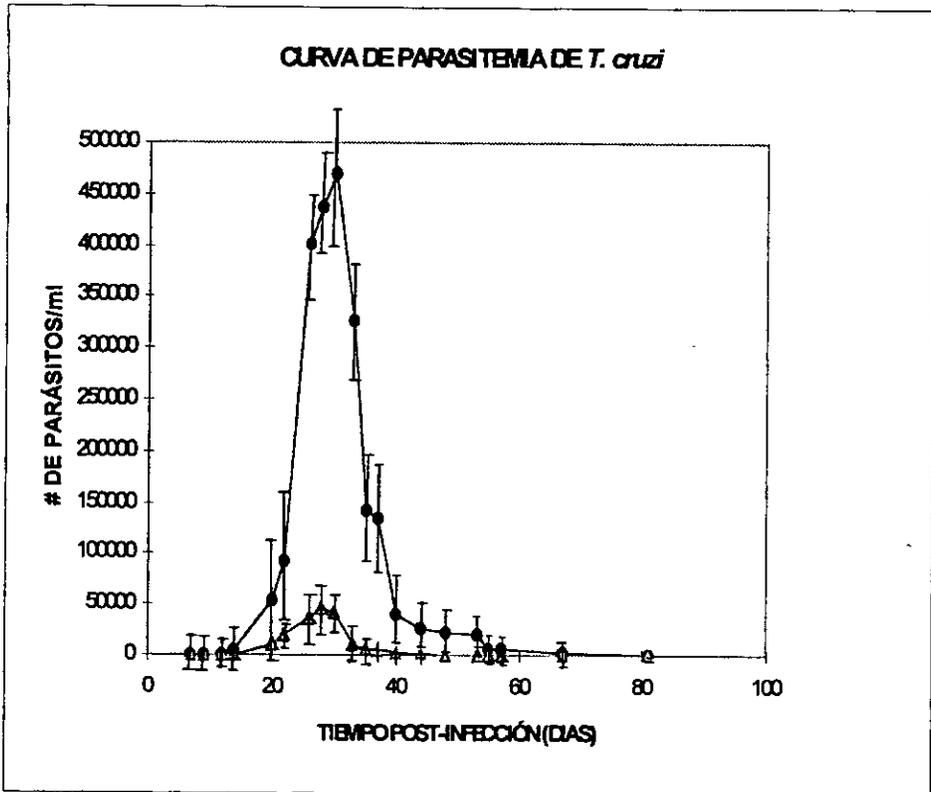


Figura 3. Curva de Parasitemia de 5 ratones infectados con *T. cruzi*. -●- Tripomastigotes de forma gruesa. -▲- Tripomastigotes de forma delgada.

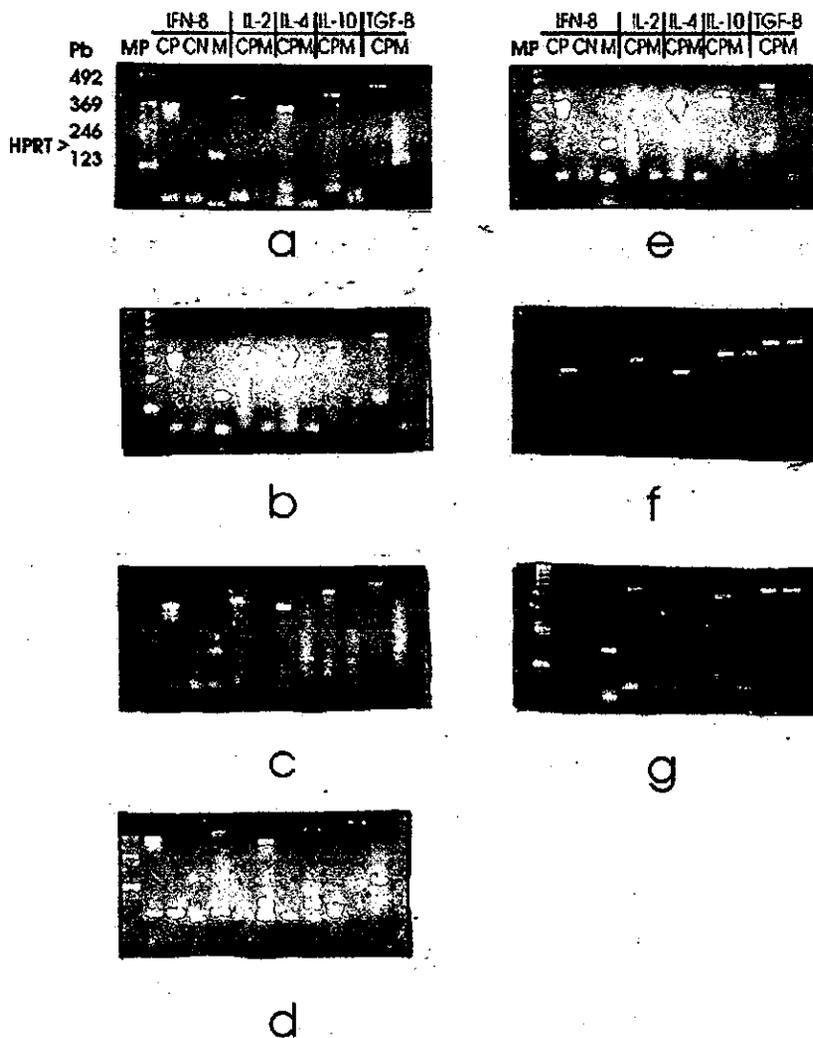


FIG.4 Patrón de las citocinas (IFN-8, IL-2, IL-4, IL-10 y TGF-B) detectadas en los ensayos de RT-PCR en piel de ratones infectados con *T. cruzi* a diferentes tiempos post-infección. a (1 día), b (2 días), c (5 días), d (10 días), e (15 días), f (20 días), g (27 días).

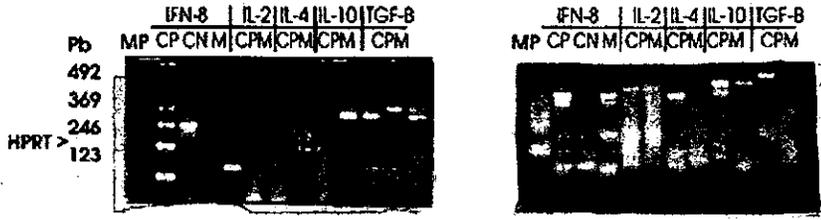
MP- Marcadores de peso.

HPRT- Control interno (Hipoxantin-guanin-fosforribosil-transferasa)

CP- Control Positivo (Citocina comercial cDNA, Clontech)

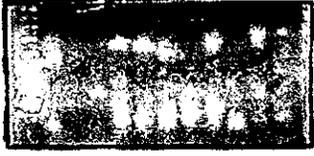
CN- Control negativo

M- Muestra



a

e



b



f



c



g



d

**FIG.5** Patrón de las citocinas (IFN-8, IL-2, IL-4, IL-10 y TGF-8) detectadas en los ensayos de RT-PCR en ganglio linfático de ratones infectados con I. cruzi a diferentes tiempos post-infección. a (1 día), b (2 días), c (5 días), d (10 días), e (15 días), f (20 días), g (27 días).

MP- Marcadores de peso.

HPRT- Control Interno (Hipoxantin-guaniln-fosforribosil-transferasa)

CP- Control Positivo (Citocina comercial cDNA, Clontech)

CN-Control negativo

M-Muestra

Cuadro 2. Patrón de citocinas obtenido por RT-PCR, en piel del sitio de inoculación de ratones infectados con *T. cruzi* a diferentes tiempos post-infección.

		PIEL						
CITOCINA/TE MPO (DÍAS)		1	2	5	10	15	20	27
IFN- $\gamma$		-	-	-	-	-	-	-
IL-2		-	-	-	-	-	-	-
IL-4		-	-	-	-	-	-	+
IL-10		-	-	-	-	-	+	-
TGF- $\beta$		-	-	-	-	-	+	+

Cuadro 3. Patrón de citocinas obtenido por RT-PCR, en ganglio linfático regional de ratones infectados con *T. cruzi* a diferentes tiempos post-infección.

		GANGLIO LINFÁTICO						
CITOCINA/TE MPO		1	2	5	10	15	20	27
IFN- $\gamma$		-	-	-	-	+	+	-
IL-2		+	+	-	-	+	+	-
IL-4		-	-	-	-	-	-	+
IL-10		+	-	-	+	+	-	+
TGF- $\beta$		+	+	+	+	-	-	+

Cuadro 4. Patrón de citocinas obtenido por RT-PCR, en músculo esquelético (gastrocnemio) de ratones infectados con *T. cruzi* a diferentes tiempos post-infección.

MÚSCULO ESQUELÉTICO							
CITOCINAS/TE MPO (DÍAS)	1	2	5	10	15	20	27
IFN- $\gamma$	-	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	+	+	-
TGF- $\beta$	-	+	-	+	+	-	-

Cuadro 5. Patrón de citocinas obtenido por RT-PCR, en piel del sitio de inoculación de ratones inoculados con *C. luciliae* (individuos control).

PIEL							
CITOCINAS/TE MPO	1	2	5	10	15	20	27
IFN- $\gamma$	-	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	+	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 6. Patrón de citocinas obtenido por RT-PCR, en ganglio linfático regional de ratones inoculados con *C. luciliae* (Individuos control)

GANGLIO LINFÁTICO							
CITOCINAS/IE MPO (DÍAS)	1	2	5	10	15	20	27
IFN- $\gamma$	-	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$	+	-	+	-	-	-	-

Cuadro 7. Patrón de citocinas obtenido por RT-PCR, en Músculo esquelético (gastrocnemio) de ratones inoculados con *C. luciliae* (Individuos control).

MÚSCULO ESQUELÉTICO							
CITOCINAS/IE MPO (DÍAS)	1	2	5	10	15	20	27
IFN- $\gamma$	-	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$	-	+	-	-	-	-	-

Cuadro 8. Patrón de citocinas obtenido por RT-PCR de ratones inoculados con PBS en los tres diferentes tejidos: Piel, Músculo esquelético y Ganglio linfático regional (individuos control).

TEJIDO-TIEMPO (DÍAS)/CITOCINA	CONTROLES (PBS)				
	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-4	IL-10	TGF- $\beta$
GANGLIO e1					
GANGLIO e2	-	-	-	-	-
GANGLIO e5	-	-	-	+	+
PIEL e1	-	-	-	-	-
PIEL e2	-	-	-	-	-
MÚSCULO e1	-	-	-	-	-

e TIEMPO POST-INFECCIÓN.

Cuadro 9. Expresión de citocinas detectado por RT-PCR en células adherentes y no adherentes del infiltrado celular en piel de ratones infectados con *T. cruzi*.

PIEL						
CITOCINA/TEMPO (DIAS)	CÉLULAS ADHERENTES			CÉLULAS NO ADHERENTES		
	15	20	27	15	20	27
IFN- $\gamma$	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	+
IL-10	-	+	-	-	-	-
TGF- $\beta$	-	+	+	-	-	+

Cuadro 10. Expresión de citocinas detectado por RT-PCR en células adherentes y no adherentes en ganglio linfático de ratones infectados con *T. cruzi*.

GANGLIO LINFÁTICO						
CITOCINA/TEMPO (DIAS)	CÉLULAS ADHERENTES			CÉLULAS NO ADHERENTES		
	15	20	27	15	20	27
IFN- $\gamma$	+	+	-	-	+	-
IL-2	-	-	-	+	+	-
IL-4	-	-	+	-	-	-
IL-10	+	+	+	+	-	-
TGF- $\beta$	-	-	+	-	-	-

Cuadro 11. Expresión de citocinas detectado por RT-PCR en células adherentes y no adherentes del infiltrado celular en músculo esquelético de ratones infectados con *T. cruzi*.

MÚSCULO ESQUELÉTICO						
CITOCINA/TIEMPO	CÉLULAS ADHERENTES			CÉLULAS NO ADHERENTES		
	15	20	27	15	20	27
IFN- $\gamma$	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-10	-	+	-	+	+	-
TGF- $\beta$	+	-	-	-	-	-

## 7. DISCUSIÓN.

Se han realizado diversos estudios en infecciones parasitarias con respecto a la expresión de citocinas y su relación con la polarización de la respuesta inmune Th1 y Th2, como por ejemplo con *Leishmania major*, donde investigadores como Nabors J. (1997) y Van Der Heyde *et al.* (1997) entre otros, han utilizado el modelo murino para explicar determinados mecanismos inmunológicos de la infección, además de asociar la expresión de citocinas proinflamatorias que conllevan una respuesta Th1 con la resistencia a la enfermedad (Mocci, 1997) y por lo tanto una relación entre la respuesta defectuosa o que aumenta la patogenicidad con la susceptibilidad (presencia de citocinas anti-inflamatorias o patrón Th2).

Algunos de los trabajos (Güler *et al.*, 1997) también han relacionado este comportamiento con el acervo genético del hospedero, es decir, dependiendo de la cepa del modelo murino, el individuo puede generar susceptibilidad o resistencia a la enfermedad.

Con respecto a los trabajos que se han realizado en la enfermedad de Chagas se ha adoptado esta misma relación. Sin embargo, estudios como los de Zhang y Tarteton (1996a) han descartado tal asociación, ya que observaron que cepas de ratones resistentes y susceptibles a la infección presentaron una mezcla de citocinas Th1/Th2 en células de bazo durante las fases aguda y crónica, utilizando técnicas inmunohistoquímicas.

En los resultados aquí obtenidos, la expresión de citocinas en el sitio de inoculación no pudo ponerse de manifiesto durante los primeros días post-infección (1- 20) (Cuadro 1). En trabajos previos se observó que durante estos días, se lleva a cabo un proceso inflamatorio, primero debido al estímulo mecánico de la inoculación y principalmente por la entrada del antígeno parasitario. Monteón *et al.* (1996) observaron que en ratones infectados con *T. cruzi* se llevaba a cabo en el sitio de inoculación (piel) un proceso inflamatorio con la presencia de un infiltrado de células polimorfonucleares (PMN) al cabo de 1 hr post-infección, alcanzando un máximo a las 24 hr post-infección, posteriormente estas células fueron reemplazadas por mononucleares, detectando al parásito desde los 15 minutos post-infección por técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

Sin embargo, el hecho de no detectar la expresión de citocinas en piel durante las dos primeras semanas hace suponer que se presenta una inmunosupresión causada por el parásito, como lo sugieren Kierszenbaum *et al.* (1996) al observar que células polimorfonucleares de sangre periférica de humanos cultivadas con tripomastigotes de *T. cruzi*, disminuían su producción de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-5 y Choromanski y Kuhn (1990) al observar que células T CD4+ de ratones infectados con *T. cruzi* presentan cierto estado de anergia al no tener una función óptima como células cooperadoras para activar a las células productoras de anticuerpos o células B. *T. cruzi* provoca que se suprima la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias, así como del receptor para IL-2, desconociéndose los mecanismos exactos por los que se lleva a cabo este proceso, aunque Soong y

Tarleton (1994) han propuesto que existe una supresión de factores transcripcionales para el gen de IL-2, al observar la disminución de RNA<sub>m</sub> de este gen, se pensaba en una rápida degradación, sin embargo, al medir el nivel de factores nucleares que se unen a sitios específicos de un promotor potenciador del gen, encontraron una disminución, en células T y esplenocitos de ratones infectados con *T. cruzi* al compararlos con animales normales. En este sentido los resultados obtenidos en este trabajo, los controles pueden apoyar la idea de inmunosupresión, ya que donde sólo se estimuló de forma mecánica (inoculación con PBS) no se detectó la expresión de citocinas, sirviendo éste como un control del estímulo mecánico, aunque quizás no es suficiente este estímulo como para generar concentraciones detectables por RT-PCR de la expresión de citocinas, puesto que para poder actuar son suficientes concentraciones tan bajas como de 10<sup>-9</sup> M (Kuby, 1994). Por otro lado también se utilizó como control un microorganismo no parásito: *Crithidia luciliae*, el cual por pertenecer a la misma familia que *T. cruzi*, comparten antígenos de superficie. Para este control sí se detectó la expresión de una citocina del tipo anti-inflamatorio: IL-10. Probablemente la expresión de esta citocina se deba a su participación en la regulación de los mecanismos inflamatorios, ocasionados por el estímulo antigénico, aunque se esperaría detectar la presencia de RNA<sub>m</sub>'s de citocinas proinflamatorias como IFN-γ o IL-2, pero posiblemente la IL-10 está inhibiendo la síntesis de éstas.

Creemos que la fuente de IL-10 son macrófagos activados por el antígeno (*C. luciliae*) o de células Th0, puesto que si proviniera de células T diferenciadas,

tendría que existir una polarización hacia Th2 (las células T que producen tal citocina), sin embargo por la ausencia de IL-4 en estos controles y por la brevedad del tiempo en que la IL-10 es producida (1 día post-infección), es poco probable que ya exista una respuesta de este tipo; considerando que la IL-4 determina el desplazamiento hacia este tipo de respuesta (Brown y Hural,1997), además la eliminación de este microorganismo es por el sistema de complemento (datos no mostrados) y, siendo posiblemente la causa de que ya no se detectaran citocinas en días posteriores debido a la eliminación del mismo.

En hallazgos de Torrico *et al.* (1991) donde observaron que en ratones infectados con *T. cruzi* más anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  tuvieron una tasa de mortalidad y parasitemia más altas, que los animales testigos sin el anticuerpo, a pesar de que el inóculo fue diferente (100 parásitos para los animales con anti-IFN- $\gamma$  y 25,000 parásitos para los controles), por lo que proponen que en infecciones con *T. cruzi*, se debe generar primeramente IFN- $\gamma$ , el cual es necesario para la activación de células efectoras (principalmente macrófagos) y posteriormente el desplazamiento de la respuesta hacia Th1, dependiendo del modelo, y de otros factores como la dosis antigénica.

La expresión de citocinas en piel de los ratones infectados con *T. cruzi* no se detectó sino hasta el día 20 post-infección, en este caso fueron IL-10 y TGF- $\beta$ , moléculas consideradas reguladoras de la inflamación y que generan o desplazan la respuesta hacia Th2, sin embargo, al averiguar la fuente de estas citocinas encontramos que para ambas fueron células adherentes, muy probablemente macrófagos (cuadro 9). Por lo tanto todavía no hay un

desplazamiento de la respuesta hacia un perfil Th2, considerando esta posibilidad también por la ausencia de IL-4. Creemos que la respuesta inespecífica generada en este tejido por *T. cruzi* se debe a la supresión del parásito en células T cooperadoras y/o NK, como lo sugiere Choromanski y Kuhn (1990).

Sería importante conocer las concentraciones de estas poblaciones celulares, que como lo señala Alberti *et al.* (1996) son la fuente principal de IFN- $\gamma$ , para saber si es la supresión de la expresión, disminución de las células productoras de éstas o ambas (Kierszenbaum *et al.*, 1996) o mecanismos reguladores. Tenemos que IL-10 y TGF- $\beta$  son moléculas que suprimen la expresión de IFN- $\gamma$ , así como su actividad (Silva *et al.*, 1992), siendo ésta una de las causas más probables de que no se detecten otras citocinas. Sin embargo, en el día 27 post-infección se detectó IL-4 y TGF- $\beta$ , provenientes de células T (considerando que la fuente principal para IL-4 son células CD4+; Th2) , como se puede corroborar en el cuadro 9 . En este caso se considera que la respuesta es de tipo Th2, asociada como se mencionaba anteriormente con la susceptibilidad del hospedero (Silva *et al.*, 1992) ya que además han considerado la cepa BALB/c como susceptible (Allen y Maizels, 1997).

Es importante señalar que se ha informado que los tripomastigotes metacíclicos, no activan a los macrófagos en experimentos realizados por Camargo *et al.*(1997), donde utilizaron macrófagos murinos cultivados con extractos parasitarios, o los diferentes estados de desarrollo de *T. cruzi*, determinando los niveles de citocinas expresadas, encontraron que los tripomastigotes metacíclicos no fueron capaces de activar a los macrófagos e inducir la síntesis de citocinas.

Por lo tanto es posible que la no producción de citocinas en los primeros días post-infección en piel pueda deberse a ello, pero sí observamos una producción de citocinas en días posteriores, probablemente por la activación de células efectoras inducida por los tripomastigotes sanguíneos o los amastigotes, por lo que si relacionamos este aspecto con la curva de parasitemia vemos que es alrededor del día 30 donde se detecta un mayor número de parásitos sanguíneos, siendo en su mayor porcentaje tripomastigotes de formas gruesas. Como lo sugieren Camargo *et al.* (1997), éstos y los amastigotes son los únicos estados de desarrollo de *T. cruzi* capaces de desencadenar la síntesis de citocinas y la activación de macrófagos, en estudios *in vitro*.

Se ha comprobado en trabajos *in vitro* (Silva *et al.* 1992), que la activación de macrófagos desde los primeros días de la infección se debe a que son las principales células efectoras encargadas de eliminar al parásito y limitar su replicación hasta en un 90% en la fase temprana, con la utilización de tripomastigotes como antígenos.

El inóculo puede influir en los resultados de otros trabajos, sin embargo, en éste se trató de aproximarse a lo que sucede en una infección natural, utilizando un inóculo o dosis baja de antígeno (1000 parásitos en 20  $\mu$ l) ya que proporciones de parásito-célula hospedera mayores o iguales a 2:1 pueden suprimir la respuesta, como lo observó Alberti *et al.* (1996) en un estudio realizado con esplenocitos de ratón y cultivados con tripomastigotes de *T. cruzi* en diferentes proporciones (parásito-célula), donde midieron la producción de IFN- $\gamma$  y de IL-12 como

citocinas importantes en el control de la parasitemia en la fase temprana de la infección.

El perfil encontrado en el músculo esquelético en ratones infectados con *T. cruzi* resultó muy similar al de piel, sin embargo, es importante mencionar que la regulación de la respuesta inmune por citocinas es un proceso local y fuertemente compartimentalizado (Hoefakker *et al.*, 1995), es decir, que difiere en gran medida en cada órgano o tejido y depende de las células que lo forman y que a la vez participan en la defensa del organismo como lo comprueban Zhang y Tarleton (1996a) analizando el patrón de citocinas en órganos como bazo y corazón, en dos estudios utilizaron ratones chagásicos de cepas resistentes y susceptibles, determinando la producción de citocinas a diferentes tiempos post-infección, encontrando que en corazón la mayoría de las células inflamatorias fueron CD8+ y en bazo CD4-CD8-TCR- $\alpha\beta$ +, por lo que el comportamiento fue diferente en cada órgano.

Se sabe que los tripomastigotes tienen cierto tropismo hacia las células musculares ( Von Kreuter, 1989 ) y por lo tanto, en los primeros días post-infección donde el parásito generalmente se encuentra en una fase de tripomastigote metacíclico y comienza a infectar células hospederas como son macrófagos o células del Sistema Reticulo Endotelial (SRE) no provocan una inducción en la síntesis de citocinas de acuerdo a lo dicho anteriormente; se considera que es hasta la liberación de tripomastigotes de células infectadas y su migración hacia este tejido cuando se lleva a cabo la inducción en la síntesis de citocinas.

Las citocinas expresadas en músculo fueron IL-10 y TGF- $\beta$  (moléculas del tipo anti-inflamatorio)(cuadro 4), cuya fuente fue: para la primera, células no adherentes o células T (para el tiempo 20 post-infección también células adherentes) y para la segunda células adherentes o presumiblemente macrófagos, estos resultados concuerdan con lo propuesto por Hunter *et al.*(1996) donde sugieren que la expresión de TGF- $\beta$  es constante y puede actuar como un factor de virulencia por inhibir la respuesta inmune en contra del parásito y favorecer su persistencia. Probablemente también se presenta un fenómeno de inmunosupresión generado por el parásito al no expresarse ninguna citocina en los primeros días post-infección.

El patrón de citocinas encontrado en el ganglio linfático corresponde a una mezcla de respuesta Th1/Th2. Como se observa en el cuadro 3, las primeras citocinas en expresarse son IL-2, la cual es una citocina activadora de células T, generalmente sintetizada por células Th1 y en menor cantidad por T CD8+, siendo una evidencia para suponer que es un sitio de reciente activación al comparar estos resultados con los obtenidos en los controles (cuadro 6 y 8). Además se detectaron dos citocinas anti-inflamatorias como son: IL-10 y TGF- $\beta$ , las cuales de alguna forma pueden suprimir la expresión de la primera o viceversa, para el segundo día la expresión de IL-10 no fue detectable, por lo que se piensa que la regulación por IL-2 generó esta condición, cabe señalar que la expresión de las citocinas es inducible, por su participación en la modulación de la respuesta inmune, además de que sus RNA's mensajeros sintetizados son muy inestables

(Abbas *et al.*,1994), por lo tanto su detección puede variar de un día a otro, incluso de horas, explicándose la expresión transitoria de tal citocina.

Por otro lado TGF- $\beta$  se expresa más o menos de forma constante a lo largo del análisis, concordando estos resultados con los obtenidos por Zhang y Tarleton (1996b). Como se ha visto en diferentes trabajos durante la infección por *T. cruzi* hay una intensa activación de la respuesta inflamatoria, por lo tanto se propone que esta citocina moduladora de esta respuesta tiene que mantenerse a lo largo de la infección para limitar el daño tisular. A lo largo del análisis en ganglio linfático se observa que las citocinas expresadas como son: IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-4 (las cuales pertenecen a los grupos más importantes dentro de las pro y anti-inflamatorias) son reguladas entre ellas mismas, es decir, cuando existe una expresión de citocinas proinflamatorias como son: IFN- $\gamma$  e IL-2, no se expresan IL-4 e IL-10 (anti-inflamatorias) y viceversa, en una forma transitoria, esto quiere decir que el patrón Th1 o Th2 no es exclusivo y por lo tanto se descarta la relación entre susceptibilidad y resistencia con un único patrón de citocinas, sería interesante realizar ensayos de RT-PCR cuantitativa para saber si se está generando preferencialmente un tipo de respuesta (Th1/Th2) y de qué otros factores pueda depender. En el cuadro 10 encontramos que la fuente de IL-4 fueron células adherentes, sin embargo, sabemos que la fuente principal de IL-4 son células CD4+ y en menor proporción CD8+(Brown y Hural,1997), por lo tanto se piensa en una contaminación de células no adherentes.

El ganglio por considerarse un órgano linfático donde hay una recirculación de sangre y linfa, además de llevarse a cabo en este sitio la generación de una

respuesta específica por la cooperación que existe entre células T y B para la producción de anticuerpos (Bellanti, 1986), presenta un panorama más complejo de las respuestas y mecanismos inmunológicos que están sucediendo en el momento de la infección. Como se propuso anteriormente, debe existir alguna inmunosupresión inducida por el parásito para la expresión de citocinas, sin embargo, en este tejido no se puede corroborar tal hipótesis, probablemente debido a que en la fase muy temprana de la infección donde los macrófagos se encargan de eliminar a los parásitos y por su función lítica, exista una liberación de fragmentos parasitarios que entren a la circulación, y sean éstos los activadores de células en ganglio, induciendo la síntesis de citocinas, por esta razón se sugiere que sean los productos excretados o secretados por el parásito o la penetración activa los que causen la inmunosupresión, como lo proponen Kierszenbaum *et al.* (1996).

## 8.CONCLUSIONES

1.- en tejidos como piel y músculo esquelético no hubo detección de la expresión de las citocinas analizadas en los primeros días post-infección por lo tanto debe existir una inducción de inmunosupresión por parte del parásito.

2.-En el ganglio linfático regional, se propone que no hay un patrón exclusivo de citocinas, es decir, una polarización hacia una respuesta Th1 o Th2.

3.-La expresión de las citocinas, considerándose moduladores importantes en la respuesta inmune en la fase temprana es local y compartamentalizada.

4.-El acervo genético del hospedero es importante para el desarrollo de la patogenia en la enfermedad de Chagas.

5.-El estado de desarrollo del parásito, así como la dosis antigénica se consideran de gran importancia para definir adecuadamente el perfil de la expresión de citocinas, aproximándose lo mejor posible a lo que sucede en una infección llevada a cabo de forma natural.

## 9. PERSPECTIVAS

En la fase temprana los macrófagos tienen una función fundamental en el control de la parasitemia y su estado de activación (por lo tanto su capacidad lífica) pueden ser modulados por el microorganismo o sus productos, así como por las citocinas producidas por el sistema inmune; existe la posibilidad de que estos inmunomoduladores puedan ser usados como terapias para activar a los macrófagos *in situ*, principalmente en el sitio de inoculación o la barrera primaria que atraviesa el parásito que es la piel.

Es importante el conocimiento del patrón de citocinas en el transcurso de la enfermedad (sobre todo en una fase temprana) y la detección de éste mediante métodos sensibles como RT-PCR, sin embargo, sería de gran ayuda tener un panorama de la expresión de estas moléculas *in situ* y cuáles son las poblaciones celulares que las están produciendo en ese momento, por lo tanto se podrían hacer estudios simultáneos como hibridación *in situ* o inmunohistoquímica.

Es necesario tomar en cuenta los mecanismos de regulación postranscripcionales, traduccionales y postraduccionales en la producción de citocinas, por esta razón, se sugiere que en posteriores trabajos haya una detección de la proteína como tal, por métodos como ELISA o Western-blot.

Así mismo, a pesar de que la citocina se esté expresando es necesaria también la expresión de su receptor para que el mensaje pueda llevarse a cabo, por lo tanto sería conveniente el análisis de la expresión y producción de los receptores con la ayuda de anticuerpos monoclonales o con RT-PCR *in situ*.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1.-Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S., 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2th Ed, Saunders Company, USA. 240-260 pp.

2.-Abrahamsohn, A. I. y Coffman, L. R., 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-12 Regulate Innate and Acquired Immunity to Infection. *Experimental Parasitology*. 84:231-244.

3.-Alberti S.J., Cardoso G.M. y Martins A.G., 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and Immunity*.64(6):1961-1967.

4.-Allen, E. J. y Maizels, M. R., 1997. Th1-Th2: Reliable paradigm or dangerous dogma?. *Immunology Today*. 18(8): 387-392.

5.-Bellanti, A.J., 1986. Inmunología. Interamericana, México. 37-42 pp.

6.- Biron, C.A. y Gazinelli, R.T., 1995. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Current opinion Immunology*. 7: 485-496.

7.-Brener, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto do Medicina Tropical do Sau Paulo*. 4: 389-396.

- 8.- Brown, M. y Hural, J., 1997. Functions of IL-4 and control of its expression. *Critical Reviews in Immunology*. 17: 1-32.
- 9.-Camargo, M. M., Almeida, I. C., Pereira, S. C., Ferguson, J., 1997. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *Journal of Immunology*. 158:5890-5901.
- 10.-Cardoni, L. R., Antunez, M. Y., Öm A. y Grönvik, K.,1996. T Cell receptor V $\beta$  repertoire in the Thymus and Spleen of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Immunology*. 169: 235-245.
- 11.-Choromanski, L. y Kuhn, R., 1990. Augmentation of suppressed antibody responses in mice during experimental Chagas' Disease by T helper Cells activated in a time-dependent mode of immunization. *Journal of Protozoology*. 37(5): 388-392.
- 12.-Comoy, E., Capron, A. y Thyphonitis, G., 1997. *In vivo* induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *International Immunology*. 9(4):523-531.
- 13.-Cruz, L. O., 1987. Parasitología. Méndez Oteo, México. 159-172 pp.

14.-Dutra, W. , Gollob, K. J., Pinto, D. C., Gazzinelli, G., 1997. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scandinavian Journal of Immunology*. 45: 74-80.

15.-Güler, L., Jacobson, G., Gubler, U. y Murphy, M., 1997. T Cell genetic background determinates maintenance of IL-12 signaling. *Journal of Immunology*. 159:1767-1774.

16.-Hoefakker, S., Boersma, A.J.,y Claassen, E., 1995. Detection of human cytokines *in situ* using antibody and probe based methods. *Journal of Immunological methods*. 185:149-175.

17.-Hunter, C. A., Sliter, T. y Araujo, F., 1996. Interleukin-12 mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon. *Infection and Immunity*. 64(7): 2381-2386.

18.-Hunter, C. A., Ellis-Neyes A. L., Slifer T., Kanaly, S., Grünig, G., Fort, M., Rennick, D. y Araujo, F., 1997. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*. 158: 3311-3316.

19.- Kreier, P.J., 1977. Parasitic Protozoa. Academic Press, New York, USA. 146-155 p.

20.-Kierszenbaum, F., Cuna, R. W., Beltz, A. y Szein, B., 1989. *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high- affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by supressing the expression of the p55 and p70 receptor components. *Journal of Immunology*. 143: 275-279.

21.-Kierszenbaum, F., Mejía L. H. y Szein, B. M., 1996. *Trypanosoma cruzi* downregulates the production of Interleukin-2, Interferon- $\gamma$ , Interleukin-4 and Interleukin-5 by activated human lymphocytes. *Journal of Parasitology*. 82(4): 652-656.

22.-Kierszenbaum, F. y Stiles, B., 1985. Evidence supporting the existence of a host cell surface receptor for *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Protozoology*. 32(2): 364-366.

23.-Kierszenbaum, F. y Szein, M.B., 1994. Inhibition of *Trypanosoma cruzi*- specific immune responses by a protein produced by *T. cruzi* in the course of Chagas' disease. *Immunology*. 144:4000-4004.

24.-Kuby, J., 1994. *Immunology*. W.H. Freeman and Company, New York. 297-322 pp.

25.-Masagué, J., Cheitetz, S., Endo, T. y Nadai, G., 1986. Type  $\beta$  Transforming Growth Factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*. 83: 8206-8210.

26.-Melhorn, H., 1988. *Parasitology in Focus*. Springer-Verlag, Alemania. 633-635 p.

27.-Mocci, S. y Coffman, L., 1997. The mechanism of *in vitro* T helper cell type 1 to T helper cell type 2 switching in highly polarized *Leishmania major*-specific T cell populations. *Journal of Immunology*. 158: 1559-1564.

28.- Monteón, M. V., Furuzawa-C., J., Alejandre, A.R., Aranda, F. A., Rosales, E.J., Reyes, A.P., 1996. American Trypanosomiasis: *In situ* and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Experimental Parasitology*. 83: 267-274.

29.-Mosmann, T.R., 1994. Properties and functions of interleukin-10. *Advances in Immunology*. 56:1-26.

30.- Mosmann, T.R., Cherwinski, M. W., Bond, M.A., 1986. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*. 136: 2348-23

31.-Nabors, S.G., 1997. Modulating ongoing Th2-Cell responses in experimental Leishmaniasis. *Parasitology Today*. 13{2}: 76-78.

32.-Nakamura, T., Kamogawa, Y., Bottomly, K., y Flavell A., 1997. Polarization of IL-4 and IFN- $\gamma$  producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells. *Journal of Immunology*. 158: 1085-1094.

33.-Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., y Flavell A., 1997. Interleukin (IL)-6 Directs the Diferentiation of IL-4 producing CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 185{3}: 461-469.

34.-Scott, P. y Kauffmann H. E., 1991. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunology Today*. 12{10}: 346-348.

35.-Silva S.J., Twardzik, R.D. y Reed. G. S., 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *In vitro* and *In vivo* by Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *Journal of Experimental Medicine*. 174: 539-545.

36.-Silva, S. J., Morrisey, J. P.y Grabstein, H. K., 1992. Interleukin-10 and Interferon  $\gamma$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Journal of Experimental Medicine*. 175: 169-174.

- 37.-Sitkovsky, M. y Henkart R. A., 1994. Cytotoxic Cells. Recognition, Effects, Function, Generation and Methods. EUA. 370-375 p.
- 38.-Soong, L., y Tarteton, L., 1994. *Trypanosoma cruzi* infection suppresses nuclear factors that bind to specific sites on the interleukin-2 enhancer. *European Journal of Immunology*. 24:16-23.
- 39.-Torrico, T., Heremans, H., y Rivera, M. T., 1991. Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Immunology*. 146(10):3626-3632.
- 40.-Van Der Heyde, H., Pepper, B., Batchelder, J., Cigel, F., y Weidanz, W., 1997. The time of selected malarial infections in cytokine- deficient mice. *Experimental Parasitology*. 85: 206-213.
- 41.-Velasco, C. O., 1991. La Enfermedad de Chagas: Una revisión suscita y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo. INDRE, México.
- 42.-Villalta, F. y Pankrats, S. H., 1987. Extracellular killing of *Trypanosoma cruzi* amastigotes by human Eosinophils. *Journal of Protozoology*. 34(3):285-290.

43.-Von Kreuter, F. y Santos, B.A., 1989. Modulation of *Trypanosoma cruzi* adhesion to host muscle cell membranes by ligands of muscarinic cholinergic and beta adrenergic receptors. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 36:541-550.

44.-Zhang L. y Tarleton L.R., 1996a. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by insitu immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *European Journal Immunology*. 26:102-109.

45.-Zhang, L. y Tarleton, L. R., 1996b. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Experimental Parasitology*. 84:203-213.