



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

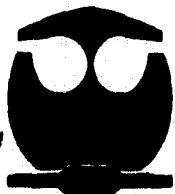
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

INDUCCION DE PROTECCION EN RATONES  
INFECTADOS CON *Trypanosoma cruzi* MEDIANTE  
TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CELULAS DE  
BAZO DE RATONES INMUNES

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICA FARMACEUTICA-BIOLOGA**  
**P R E S E N T A**  
**MARIBEL CERVANTES FLORES**



MEXICO, D.F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**JURADO ASIGNADO :**

**PRESIDENTE : PROF. LEON CHAPA SATURNINO DE**

**VOCAL : PROF. ASTIGARRAGA ZAVALA MAITE**

**SECRETARIO : PROF. BECERRIL FLORES MARCO ANTONIO**

**1er. SUPLENTE: PROF. GARCIA TAMAYO FERNANDO**

**2do. SUPLENTE: PROF. PELAYO CAMACHO ROSANA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:  
FACULTAD DE QUIMICA**

  
**ASESOR DEL TEMA**

**M. en C. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES.**

  
**SUSTENTANTE**

**MARIBEL CERVANTES FLORES.**

**A ti señor por haberme dado la vida y  
oportunidad de haber realizado uno de mis  
sueños.**

**A mis padres el más sincero agradecimiento  
por el inmenso apoyo y confianza que en mí  
depositaron para que sus esfuerzos y  
sacrificios culminaran con el éxito, logrando  
darme la mejor de las herencias.**

**A mi hermana y a mis hermanos por su gran amor  
y apoyo que me han brindado durante toda mi  
vida.**

**A mi asesor Marco Antonio Becerril Flores  
agradezco sus enseñanzas, paciencia y  
experiencia que vertió en mí para poder  
completar mi formación profesional.**

**A Paty y Maricel por su ayuda y apoyo brindados  
en la realización de este trabajo.**

## INDICE

	PAG.
<b>INTRODUCCION</b> .....	6
<b>1. IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS</b> .....	6
<b>2. BIOLOGIA DEL PARASITO</b> .....	8
2.1. Fases de <u>T. cruzi</u> .....	8
a) Tripomastigote .....	8
b) Epimastigote .....	9
c) Amastigote .....	10
2.2. Ciclo biológico .....	11
<b>3. RELACION HUESPED -PARASITO</b> .....	13
3.1. Fisiopatología de la Enfermedad de Chagas .....	13
3.2. Mecanismos de <u>T. cruzi</u> que evaden al sistema inmune del huésped .....	15
<b>4. MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL HUESPED A LA INFECCION POR</b> <b><u>T. cruzi</u></b> .....	16
4.1. Inmunidad inespecifica de tipo celular .....	17
4.2. Inmunidad especifica de tipo celular .....	22
<b>5. AVANCES EN LA ELABORACION DE VACUNAS CONTRA <u>T. cruzi</u></b> .....	26
<b>OBJETIVO</b> .....	28
<b>ESTRATEGIA DE TRABAJO</b> .....	29

<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	31
1. Parásitos .....	31
2. Animales de laboratorio .....	31
3. Mantenimiento de <u>T. cruzi</u> en ratón.....	31
4. Obtención de ratones inmunes .....	31
5. Obtención de células de bazo inmunes y no-inmunes .....	32
6. Transferencia de células de bazo inmunes y no-inmunes .....	32
7. Reto con <u>T. cruzi</u> .....	32
8. Obtención de sueros de ratones .....	33
9. Detección de anticuerpos anti- <u>T. cruzi</u> .....	33
<b>RESULTADOS</b> .....	35
1. Porcentaje de mortalidad .....	35
2. Determinación de curvas de parasitemia .....	37
3. Detección de anticuerpos anti- <u>T. cruzi</u> .....	40
<b>DISCUSION</b> .....	50
<b>CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>APENDICE</b> .....	56
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	62

## INTRODUCCION

### 1. IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA

La enfermedad de Chagas es una parasitosis producida por el protozoo hemoflagelado Trypanosoma cruzi en el hombre y en los animales de sangre caliente; se encuentra limitada al Continente Americano. Los insectos que transmiten el parásito son chinches de la familia Reduviidae, denominados triatóminos, que se encuentran ampliamente distribuidos por todo el Continente (1).

La tasa de morbilidad y mortalidad que se reporta acerca de este padecimiento varían para cada país y está relacionada a diversos factores como la virulencia y el organotropismo que presentan las distintas cepas de T. cruzi así como la susceptibilidad del huésped infectado (1).

En la República Mexicana solamente se habían reportado 141 casos humanos comprobados parasitológicamente hasta 1980. En los últimos 15 años se han registrado otros 46 casos, lo que hace un total aproximado de 187 casos (Fig. 1). Los estados en los cuales se han presentado los casos de la enfermedad de Chagas son Oaxaca, Yucatán, Edo. de México, Sonora, Guerrero, Nayarit, Veracruz, Michoacán, Jalisco, Zacatecas, Morelos, Chiapas y Sinaloa (10).

Los estados de la República Mexicana en los que se han encontrado más casos humanos de enfermedad de Chagas, diagnosticados por el hallazgo del parásito son



Chiapas y Jalisco con 44 casos cada uno, Yucatán con 33 y Zacatecas con 12, entre otros (10). Es importante señalar que la mayor proporción de los casos se han diagnosticado mediante reacciones serológicas. En algunas regiones del país como Oaxaca, Morelos, Puebla y Guerrero se han reportado índices de frecuencia muy elevados mediante pruebas serológicas, lo que quizás indique una transmisión muy activa de la tripanosomiasis en dichas regiones (10).

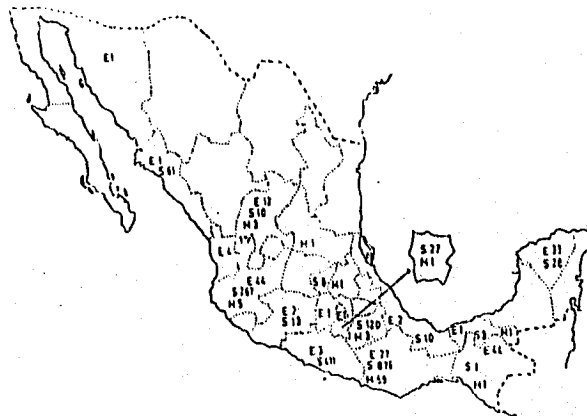


FIG.1. Distribución del número de casos humanos de infección por *T. cruzi* registrados en cada uno de los estados de la República Mexicana hasta 1991. E = diagnóstico parasitológico, S = diagnóstico serológico M = con miocarditis compatible con etiología chagásica (Tomado de Tay y Cole, 1995).

## 2. BIOLOGIA DEL PARASITO

T. cruzi es un parásito altamente pleomórfico que exhibe diferentes formas en su ciclo de vida (2).

La identificación de las etapas de desarrollo de T. cruzi está basada en criterios morfológicos, en relación a la forma general del parásito y la posición respecto al núcleo que presenta una estructura denominada cinetoplasto (2).

Las tres etapas más estudiadas en el desarrollo biológico de T. cruzi son identificadas como: tripomastigote, epimastigote y amastigote (2).

### 2.1. FASES MORFOLOGICAS DE T. cruzi

a) **Tripomastigote:** presenta una forma alargada que mide 20-25  $\mu\text{m}$  de ancho; tiene un gran núcleo vesicular y un cinetoplasto prominente, subterminal y posterior al núcleo, el cual está formado principalmente por DNA (Fig.2). Del cinetoplasto surge un flagelo que recorre todo lo largo del parásito dando lugar a una membrana ondulante; el flagelo sale libre por su porción anterior y le permite moverse activamente (1). A esta fase se le encuentra extracelularmente en circulación sanguínea del hospedero vertebrado y en el intestino posterior de los triatóminos; en estos últimos recibe el nombre de tripomastigote metacíclico (2).

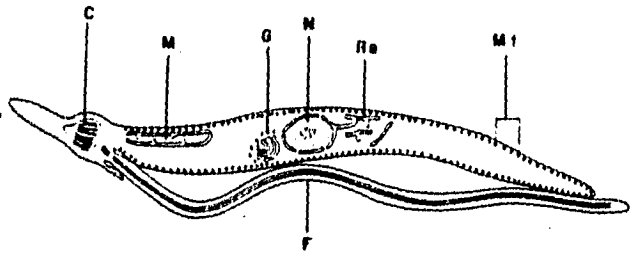


FIG. 2. Representación esquemática de la ultraestructura del tripomastigote de *T. cruzi*. C, cinetoplasto; M, mitocondria; G, aparato de golgi; N, núcleo; Re, retículo - endoplásmico; Mt, microtúbulos subpeculiares; F, flagelo (2).

b) **Epimastigote** es de aspecto fusiforme, mide 18-22  $\mu\text{m}$  de longitud. El cinetoplasto se observa en posición cercana al núcleo; el flagelo forma una pequeña membrana ondulante y sale libre por la porción anterior (Fig. 3). Este estadio morfológico se multiplica en el intestino medio de los huéspedes invertebrados, o bien, en medios de cultivo (1).

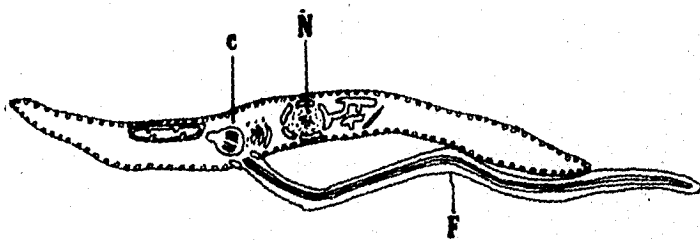


FIG. 3. Representación esquemática de la ultraestructura del epimastigote de *T. cruzi*. C, cinetoplasto; N, núcleo; F, flagelo.

c) Amastigote: es la forma replicativa intracelular de T. cruzi cuya multiplicación se realiza por fisión binaria. Es de forma semiesférica y mide 2-2.5  $\mu\text{m}$ , no presenta flagelo libre, pero al microscopio electrónico se ve el axonema dentro de una bolsa; además presenta un gran núcleo y un cinetoplasto (Fig.4) (2).

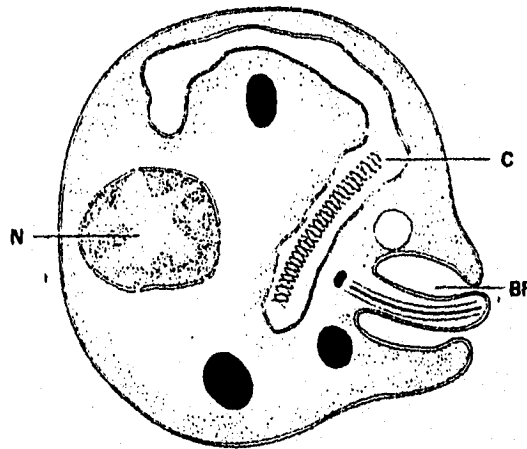


FIG. 4. Representación esquemática de la ultraestructura de un amastigote de T. cruzi: C, cinetoplasto; N, núcleo; BF, bolsa flagelar.

Los amastigotes y epimastigotes son las etapas del parásito que se multiplican en los hospederos vertebrados e invertebrados, respectivamente. Los tripomastigotes no se replican pero son las formas infectivas durante el ciclo biológico de T. cruzi (2).

## 2.2. CICLO BIOLÓGICO

Se inicia cuando un triatómino libre de infección por *T. cruzi* pica a un mamífero infectado con tripomastigotes en su sangre, estos pasan al intestino medio del insecto para transformarse en epimastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria longitudinal; al cabo de pocos días pasan a la región posterior y se transforman a tripomastigotes metacíclicos que son infectantes para un nuevo huésped vertebrado (3). Al momento de que el triatómino infectado pica a un huésped vertebrado defeca sobre su piel y deja orificios por donde pasan los tripomastigotes que se encuentran en las heces (1).

Una vez que los tripomastigotes metacíclicos penetran al tejido subcutáneo, se introducen en las células del tejido cercano al sitio de penetración, en su interior se transforman adoptando la forma de amastigote. En el citoplasma de la célula huésped se multiplican por fisión binaria repetidas veces hasta que la lisan, entonces salen a la circulación y se transforman rápidamente en tripomastigote sanguíneos, diseminándose mediante vía hematogena por todo el organismo; o bien, infectan nuevas células adyacentes al tejido donde inicialmente se reprodujeron (Fig. 5) (1).

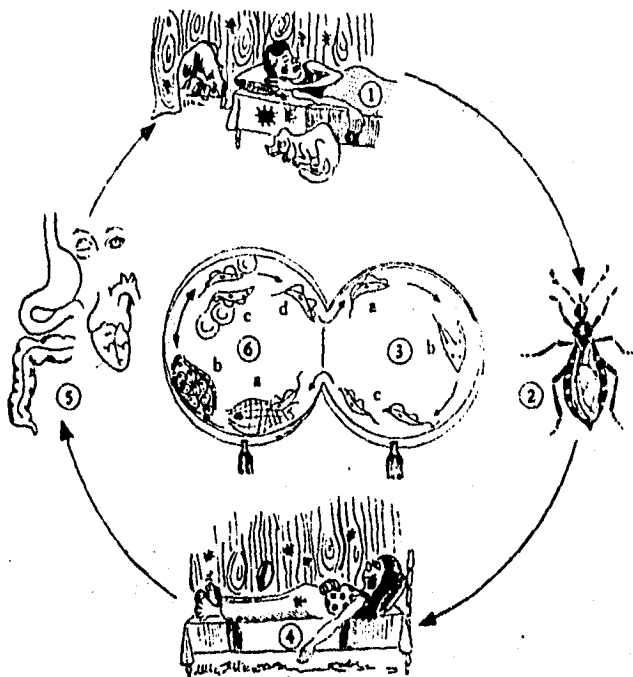


FIG. 5 *T. cruzi*. Ciclo de vida: 1. Huéspedes vertebrados de *T. cruzi*. 2. Los transmisores de *T. cruzi* son insectos de la familia Reduviidae, los cuales se infectan al picar los hospederos vertebrados e ingerir tripomastigotes sanguíneos. 3. En el tubo digestivo del vector se encuentran tripomastigotes (a), epimastigotes (b) y en el recto y las deyecciones aparecen los tripomastigotes metacíclicos que son los infectantes (c). 4. El hombre se infecta con las deyecciones del vector, depositadas en piel o mucosas durante la picadura. 5. Los parásitos intracelulares afectan varios tejidos. 6. Los tejidos son invadidos por tripomastigotes (a), los cuales se convierten en amastigotes intracelulares que se multiplican (b); en las formas agudas y subagudas aparecen tripomastigotes circulantes (c), infectantes para el vector (d). (Figura tomada de David Botero, 1987 modificada).

### 3. RELACION HUESPED-PARASITO

#### 3.1. FISIOPATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

T. cruzi puede afectar varios órganos como corazón, esófago, colon, cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos, músculos, etc. (4).

Durante la infección ocurre un contacto directo entre el parásito y la célula hospedera, con la subsecuente internalización del parásito. Un número de antígenos en la superficie de T. cruzi han sido identificados y pueden tener un papel en el reconocimiento y penetración hacia dicha célula (4). Muchos de estos antígenos pueden estar asociados a la penetración mientras que otros participan como receptores de superficie que se enlazan con la fibronectina (13) y la colágena (14) de la célula huésped y por lo tanto pueden estar involucrados en el enlace y el reconocimiento celular (4). Siguiendo al contacto mediado por receptores y ligandos entre la célula del hospedero y T. cruzi es posible que enzimas tales como proteasas (15) y glicosidasas (16,17) secretadas por el parásito, digieran las proteínas de membrana de las células durante la penetración del parásito y posiblemente esas enzimas usen su sitio activo para el enlace específico con la superficie de la célula del huésped. Una vez en el interior de la célula hospedera, T. cruzi se transforma hacia la fase de amastigote y escapa a la destrucción potencial de las enzimas lisosomales (4).

Durante la fase aguda de la infección los amastigotes de T. cruzi se reproducen dentro de las células hasta que las lisan. Los parásitos libres invaden o son fagocitados por otras células adyacentes que también terminan lisándose conduciendo a una reacción inflamatoria local con infiltrado de diferentes tipos de leucocitos. La reacción inflamatoria localizada en la puerta de entrada es visible y se conoce con el nombre de Chagoma. La inflamación se extiende a los ganglios regionales bloqueando los canales linfáticos y produciendo edema local (3). Cuando compromete al párpado constituye el signo de Romaña que consiste en un edema bpalpebral unilateral, indoloro con hiperemia conjuntival, escasa secreción conjuntival, dacriocistitis del ojo infectado y adenopatía local, en la que están comprometidos los ganglios cercanos al sitio de penetración de T. cruzi, con desaparición espontánea en unos 15 días (1). El parásito puede establecerse en tejidos viscerales, musculares, nerviosos y linfáticos. Las células del sistema retículo-endotelial, sufren destrucción debido al crecimiento y multiplicación de los parásitos. Esta fase se caracteriza por una alta parasitemia y un extenso parasitismo local (3).

Después durante la fase aguda ocurre una respuesta inmune que provoca la disminución de la parasitemia pero se mantiene la infección en algunos sitios extrasanguíneos. Este período que va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica, es llamado latente o



indeterminado. En esta fase, el paciente es asintomático a pesar de las alteraciones que se inician en plexos parasimpáticos del corazón y tubo digestivo (3).

El descubrimiento de autoanticuerpos para endocardio, estructuras vasculares e intersticios (autoanticuerpos EVI) (18,19) en el suero de enfermos que desarrollan la fase crónica de la enfermedad, permite la hipótesis de que la autoinmunidad puede estar involucrada en la patología de la enfermedad de Chagas, principalmente en su fase crónica (4).

### 3.2. MECANISMOS DE T. cruzi QUE EVADEN AL SISTEMA INMUNE DEL HUESPED.

Los tripomastigotes de T. cruzi son capaces de evadir los mecanismos dependientes de anticuerpos mediante dos formas (5):

a) Un rápido cubrimiento de los anticuerpos anti-T. cruzi sobre la superficie del parásito y la incorporación y posterior destrucción de los complejos antígeno-anticuerpo en su interior (20,21).

b) Producción de enzimas que secreta y T. cruzi que rompen la porción Fc del anticuerpo evitando que se realice una opsonización y un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), o bien la lisis por complemento (22).

Debido a que las células infectadas fallan en la expresión de los antígenos del parásito, esto origina que no sean reconocidas por el sistema inmune y por lo tanto los amastigotes sean protegidos durante el ciclo de replicación intracelular (5).

Existen otros mecanismos de evasión como:

1. Mimetismo molecular, en el cual el parásito libera antígenos parecidos a los del huésped. (23,24).
2. Adsorción de los antígenos del parásito por las células hospederas (25).
3. Adsorción de los antígenos de la célula huésped por el parásito (26-28).
4. Las células infectadas expresan el antígeno del parásito sobre su superficie (29).

#### **4. MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL HUESPED A LA INFECCION POR**

##### **T.cruzi**

En la enfermedad de Chagas se ha demostrado, de manera importante, la participación de la respuesta inmune humoral y celular en la protección contra la infección por T. cruzi.

A pesar de que la inmunidad humoral, vía complemento y anticuerpos, ha conducido a la protección, experimentos de transferencia adoptiva de células inmunes de ratones previamente infectados, han demostrado que la inmunidad celular participa

de manera activa; pensando que la producción de anticuerpos protectores no necesariamente son T-independientes, posiblemente para que se hayan producido tuvieron que originarse mediante la estimulación de linfocitos T-cooperadores (Th) con perfil de citocinas e IL-4, IL-6 los cuales estimulan a linfocitos B.

Por otro lado, las evidencias indican que mediante transferencia adoptiva se ha logrado protección a la infección por T. cruzi (30). Aunque el sistema inmune influye en la resistencia a la infección, dicha resistencia también depende de la virulencia de las cepas y la susceptibilidad del hospedador. Hay cepas de T. cruzi que matan al 100% de ratones infectados experimentalmente, como las cepas Y y Tulahuén, pero hay otras que no causan parasitemia significativa (12). En cuanto a la susceptibilidad, se conocen cepas de ratones con diferente grado de susceptibilidad; las cepas de ratón Balb/c, CBA y C3H/He son muy susceptibles pero la C57BL/10 es altamente resistente (9).

#### 4.1. INMUNIDAD INESPECIFICA DE TIPO CELULAR

Mediante estudios in vitro, se demostró que los tripomastigotes sanguíneos pueden ser lisados por contacto con eosinófilos, neutrófilos y células linfoides y por exposición a linfotoxinas, independientemente del complemento. Con los eosinófilos y neutrófilos la citotoxicidad contra los tripomastigotes depende de la presencia de anticuerpos (ADCC) (5).

Se ha demostrado por medio de estudios in vitro que los anticuerpos pueden estar involucrados en la inmunidad mediada por células ya que varios tipos de ellas han mostrado ser efectivas contra los tripomastigotes sanguíneos cubiertos de anticuerpos ya sea lisando o inactivando a los parásitos (31-34). El mecanismo de destrucción del parásito por eosinófilos, neutrófilos, células mononucleares parece ser por fagocitosis (35) y por efecto directo del peróxido de hidrógeno sobre el parásito (36) durante el estallamiento respiratorio intracitoplásmico.

Los eosinófilos se han encontrado en la fase aguda de la infección con T. cruzi y puede ingerir y digerir amastigotes (37); su fagocitosis es dependiente de anticuerpos, mientras que la fagocitosis por los neutrófilos es aumentada por la opsonización de anticuerpos. El daño del amastigote es precedido por el enlace del material granular del eosinófilo a su membrana. Durante la interacción eosinófilo-amastigote, los gránulos del eosinófilo son liberados y debido a que son citotóxicos pueden jugar un papel en la destrucción extracelular de T. cruzi todavía en la ausencia de anticuerpos.

Las plaquetas en presencia de anticuerpos, se adhieren a los tripomastigotes sanguíneos y los lisan, se dice que este fenómeno es dependiente de la presencia del componente C3 del complemento, cuando los tripomastigotes sanguíneos son incubados con sangre completa o con plaquetas aisladas en presencia de suero

inmune o fracciones de IgG, la adherencia de las plaquetas sobre los parásitos es inmediata y seguida pocas horas después por la desaparición completa de los parásitos, probablemente mediante lisis. El receptor C3b de las plaquetas al unirse al factor C3 del complemento conduce a la liberación de los gránulos con la subsecuente liberación de las enzimas proteolíticas que lisan al parásito (11).

Se demostró que la sangre de ratón deficiente del factor C5 aglutina tripomastigotes y las plaquetas se adhieren a esas agrupaciones para lisar al parásito. También se ha demostrado que mientras el suero inmune aglutina tripomastigotes in vitro, en la presencia de plaquetas los parásitos son eliminados (11), (4).

El papel del macrófago en la resistencia a la infección por T. cruzi es complicado por el hecho de que esta célula puede matar o mantener el crecimiento intracelular del parásito (4).

Durante la infección primaria de T. cruzi en el ratón, los macrófagos comienzan a activarse y cuando se extraen para ensayos in vitro son capaces de matar a los tripomastigotes, mientras que los macrófagos del ratón normal mantiene la infección y crecimiento intracelular del parásito. La actividad parasiticida aumentada contra T. cruzi in vitro está presente en los macrófagos de

ratones inoculados con BCG lo que nos indica que este mecanismo es inespecífico (5).

La activación del macrófago es llevada a cabo por linfocinas producidas por linfocitos sensibilizados. El aumento de la capacidad parasiticida de macrófagos activados está relacionado con la generación de radicales superóxido, mientras que en los macrófagos normales, los tripomastigotes sobreviven porque escapan del medio enzimático de las vacuolas fagocíticas (5).

Los anticuerpos contra T. cruzi aumentan la entrada del parásito hacia el macrófago pero no son esenciales ya que al bloquear los receptores Fc y C3b del macrófago la fagocitosis no se ve dañada, pero los anticuerpos amplifican la capacidad de los macrófagos activados para matar al parásito (5).

Otra función de los macrófagos es que son células esenciales para el procesamiento del antígeno y para la cooperación con los linfocitos participando como células presentadoras de antígeno. Los tripomastigotes pueden entrar a un macrófago normal por fagocitosis o por penetración activa vía su flagelo (5).

Después de la entrada del parásito al macrófago, dentro de las 24 h siguientes, el parásito escapa del fagolisosoma dentro del citoplasma y comienza su ciclo replicativo (38-39) o es eliminado dentro del fagolisosoma, probablemente por mecanismos que involucran el estallamiento oxidativo, donde radicales superóxidos y peróxidos de hidrógeno intervienen en el proceso de la muerte (33,38,40,41), (4).

Las células T involucradas en esta activación son las células cooperadoras (Th) (42) que pueden estimular la producción de muchos y diferentes factores que participan en la activación de los macrófagos.

Tres de los cinco tipos de interferones conocidos, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , activan a los macrófagos, estos aumentan in vitro la muerte de los tripomastigotes por los macrófagos (38). El IFN- $\gamma$  es más efectivo como estimulador de la actividad tripanocida. Otras citocinas tales como factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF), son también efectivos en la inducción de la actividad tripanocida (43). Las células asesinas naturales (NK) aumentan su actividad por el efecto del IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  para matar a los tripomastigotes de T. cruzi (44,45).

#### 4.2. INMUNIDAD ESPECIFICA DE TIPO CELULAR

Las células T están involucradas en la resistencia a la infección. Las células de ratones recuperados de una infección con T. cruzi confieren protección a ratones normales (4).

Se ha demostrado que el papel de macrófagos y linfocitos T es importante en la protección de ratones infectados con T. cruzi. El papel protector de linfocitos T ha sido indicado por experimentos de transferencia adoptiva, por ejemplo, en los estudios de Thomas, et al (1980), M. E. Rottenberg (1990), N. Nogueira y Donald E. Burguess (1979) se vio su protección en ratones infectados. Esta protección puede depender del grado de susceptibilidad del hospedador lo cual se ha demostrado al emplear diferentes cepas de ratones, por ejemplo, ratones C3H/He son muy susceptibles a la infección, Balb/C y CBA son susceptibles al igual que C3H/He y los ratones C57BL/10 son resistentes a la infección por T. cruzi (9).

De cualquier manera la transferencia adoptiva de células de ratones recuperados de una infección aguda puede conferir protección a ratones receptores no inmunes tal como se demuestra en el trabajo de Donald E. Burguess (1979) y en el de M. E. Rottenberg (1990), en donde las células de bazo obtenidas de ratones recuperados de una infección aguda por T. cruzi



disminuye la parasitemia y mortalidad en receptores singénicos, prolongando de esta manera su vida (30).

Posiblemente linfocitos T CD8+ y T CD4+ participan en la protección como se vio en el estudio de M.E. Rottenberg, R.L. Cardoni y E.L. Segura (1990) en donde las poblaciones celulares involucradas en la resistencia contra la infección de T. cruzi (células de bazo, linfocitos T, CD4+ y CD8+) fueron obtenidas de ratones infectados crónicamente. La administración de células de bazo inmunes y linfocitos T confirió un aumento en la resistencia contra el parásito. La actividad protectora de linfocitos T pero no la de las células totales de bazo inmunes fue completamente abolida por el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-Thy 1.2 y complemento, lo que conducía a la muerte de los ratones indicando que las células T están involucradas en la resistencia de los ratones infectados crónicamente. El pre-tratamiento de linfocitos T con anticuerpos monoclonales anti-L3T4 o anti-Lyt 2.2 reduce parcialmente la transferencia de la resistencia presentándose altas parasitemias pero un menor porcentaje de mortalidad; la disminución en ambas anula la transferencia de resistencia; esto indica que las células CD4+ y CD8+ son capaces de conferir protección contra la infección con T. cruzi (8).

La disminución de las células CD4+ por un tratamiento in vivo con anticuerpos anti-L3T4 antes de la infección resulta en un aumento en la

susceptibilidad del ratón a la infección por T. cruzi. Las clonas de las células T CD4+ provenientes de ratones infectados crónicamente con T. cruzi que mediante la protección por transferencia adoptiva, se vio que tienen una función cooperadora para la formación de anticuerpos ya que produce linfocinas que ayudan en la activación de los linfocitos B y de los propios linfocitos T.

Estos resultados muestran que la resistencia desarrollada por los ratones infectados crónicamente con T. cruzi es el resultado de la actividad tanto de células no T, T CD4+ y CD8+ (8).

T. cruzi induce supresión en la respuesta mediada por células y por anticuerpos, predominantemente durante la fase aguda, esta supresión es evidente en la respuesta de las células T in vitro y en la actividad presente en el bazo de ratones infectados crónicamente que suprimen las reacciones de hipersensibilidad tardía (DTH) y respuesta mitogénica (4).

Las células T citotóxicas (Tc) se encuentran también presentes en la infección y actúan en contra de las células infectadas probablemente por medio del reconocimiento de antígenos del parásito adheridos a la superficie de las células infectadas pero no matan directamente al parásito, aunque tal destrucción de la célula hospedera puede dejar al parásito vulnerable a otras formas de ataque (4).

El papel de las células T en la protección de los ratones infectados crónicamente se ha indicado por transferencia adoptiva de las células T y B. Mediante estos experimentos con células de bazo totales y deficientes de linfocitos T se ha observado que las primeras confieren una mayor protección contra la infección con T. cruzi y las segundas presentan una menor protección ya que presentan una mayor parasitemia; la cual comparada con la parasitemia producida en los ratones no protegidos, es mucho menor y además no produce la muerte.

Las células de bazo inmunes son capaces de activar a los macrófagos a un estado tripanocida por medio de linfocinas activas. La estimulación de los macrófagos microbicidas in vivo así como también de los linfocitos activados que son capaces de generar los factores que inducen la actividad tripanocida del macrófago en los animales no inmunizados a los cuales se les transfirieron dichas células y que fueron retados con dosis de tripomastigotes sanguíneos capaces de matar al 100% de los ratones no inmunizados resulta en una protección de los ratones y que dicha población de células de bazo son capaces de conferir protección por transferencia adoptiva. Las células responsables para la transferencia de la protección son las células enriquecidas con células T, que a la vez son responsables de la generación de los factores activadores de los macrófagos, por lo tanto, las células T son requeridas para conferir

protección in vivo a través de la transferencia adoptiva y también para la generación de los factores activadores de los macrófagos in vitro.

Liew reportó que el cultivo de células T de ratón infectado crónicamente suprime la respuesta DTH a varios antígenos pero no afecta a DTH en ratones sensibilizados antes de la infección con T. cruzi. Esta actividad supresora estuvo también presente en el suero de ratones infectados sugiriendo la participación de un mediador soluble. El ratón con DTH suprimida desarrolla satisfactoriamente reactividad DTH después de un segundo estímulo antigénico (7).

#### **5. AVANCES EN LA ELABORACION DE VACUNA CONTRA T. cruzi**

Se han desarrollado estudios de vacunación en diferentes especies animales utilizando diferentes antígenos, incluyendo células intactas lisadas, fracciones subcelulares y preparaciones de glicoproteínas de la superficie celular de T. cruzi. Los resultados en general muestran que estos antígenos reducen la parasitemia durante la fase aguda de la enfermedad (4).

Aunque T. cruzi aparentemente evade la respuesta inmune del huésped varios factores favorecen el desarrollo eventual de inmunización o protección efectiva para la enfermedad de Chagas en el humano (5):

a) La infección de ratón con cepas no virulentas de T. cruzi o inoculación de organismos atenuados por irradiación o empleo de fármacos resulta en una protección significativa para otro reto letal y reduce la manifestación patológica de la enfermedad crónica. Las vacunas compuestas de extractos de parásitos o componentes purificados son también protectores pero usualmente requieren el uso de adyuvantes (5).

b) Parece haber reactividad cruzada entre distintas cepas de T. cruzi.

c) Hay evidencias de que T. cruzi presenta variación antigénica entre las diferentes cepas.

Existen varios problemas importantes para superar el desarrollo de una segura y efectiva vacuna para la enfermedad de Chagas. Primero la vacuna debe bloquear la infección primaria con tripomastigotes metacíclicos o prevenir el establecimiento de la enfermedad crónica, sin embargo, la inmunidad adquirida naturalmente fracasa. Algunos experimentos han mostrado protección parcial de ratones al reto con T. cruzi, estos animales resisten la fase aguda de la enfermedad. Segundo, aunque un huésped resista la fase aguda, pueden permanecer los parásitos, de manera intracelular, en fase de amastigote; las células que están infectadas por éstos, presentan moléculas que el mismo hospedero las llega a conocer como extrañas y son las que inducen autoinmunidad. De esta forma el mismo organismo se ve afectado en la fase crónica. Esos problemas potenciales pueden limitar la realización de la vacunación.

## OBJETIVO

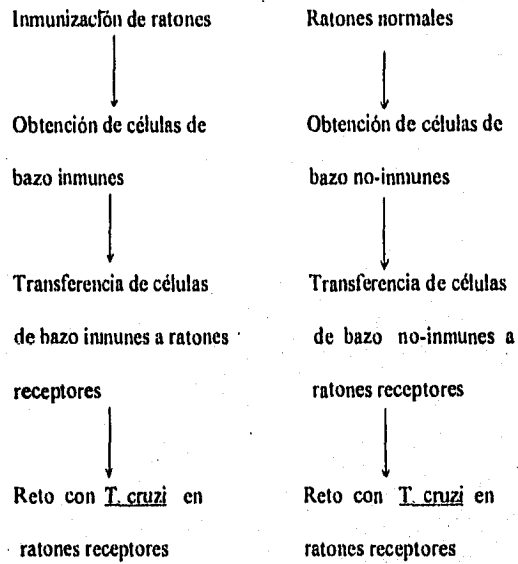
Hasta ahora, la variedad de antígenos utilizados para despertar la respuesta inmune del huésped consiste de los parásitos lisados, fracciones subcelulares y preparaciones de glicoproteínas de la superficie celular de T. cruzi, dichos antígenos confieren poca protección ya que reducen muy poco la parasitemia durante la fase aguda y un porcentaje bajo de ratones sobrevive al reto con dosis letal de T. cruzi; para que aquellos induzcan una mejor respuesta inmune se requiere que permanezcan mayor tiempo en circulación ayudando a estimular constantemente al sistema inmune; esto obliga a dar varios refuerzos con aquellos antígenos. Los antígenos que posiblemente estimulan con mayor frecuencia la respuesta inmune son los que componen a tripomastigote sanguíneo viable, por lo que utilizando dicha fase de desarrollo de T. cruzi que es la única que permanece en el torrente sanguíneo es probable que estimulen constantemente a las células del sistema inmune lográndose así un mayor número de células activadas y de memoria, de esta manera si se desarrolla una infección por T. cruzi con una cepa que permita la presencia de los parásitos en circulación sanguínea durante varios días, se producirá una activación constante de células inmunes las cuales podrían proteger a un huésped si se le transfieren antes de infectarse con una dosis letal de T. cruzi.

Para demostrar lo anterior se estableció el siguiente objetivo:

Inducir protección contra la infección por T. cruzi mediante la transferencia adoptiva de células de bazo inmunes estimuladas por acción de antígenos circulantes del parásito.

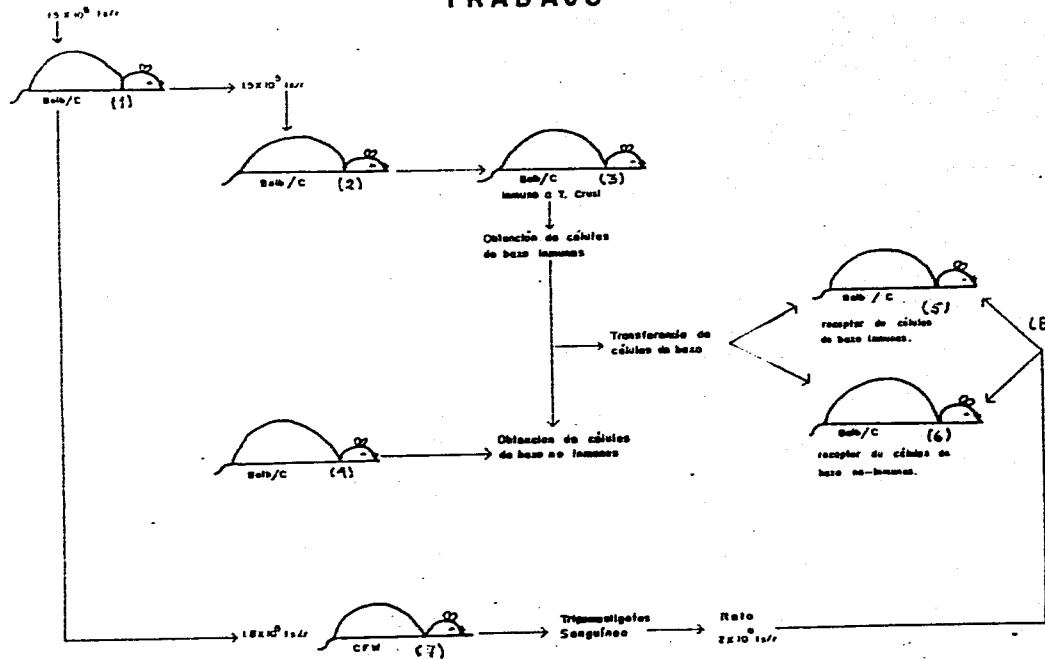
## ESTRATEGIA DE TRABAJO

Para alcanzar el objetivo se siguió la siguiente estrategia de trabajo:



(ver esquema de estrategia de trabajo)

## ESQUEMA DE ESTRATEGIA DE TRABAJO





## MATERIAL Y METODOS

**1. Parásitos:** se utilizó la cepa virulenta de T. cruzi denominada Querétaro en todos los experimentos. Los tripomastigotes sanguíneos fueron mantenidos por pases en ratones.

**2. Animales de laboratorio:** se emplearon ratones hembras CFW y Balb/C, de 6-8 semanas de edad.

**3. Mantenimiento de T. cruzi en ratón:** Los parásitos en fase de tripomastigotes sanguíneos fueron mantenidos en ratones CFW inoculando  $1 \times 10^6$  tripomastigotes sanguíneos/ratón por vía intraperitoneal (IP) y dejando que se presentara parasitemia hasta obtener la cantidad de parásitos que permitiera hacer el pase a nuevos ratones no infectados. Generalmente se realizaba en la tercera semana post-infección.

**4. Obtención de ratones inmunes:** los tripomastigotes sanguíneos obtenidos de la sangre de ratones CFW [1] se utilizaron para infectar a ratones Balb/c con una dosis de  $1.5 \times 10^5$  tripomastigotes sanguíneos/ratón. Con esta dosis los ratones sobreviven a la infección y se puede crear una inmunidad contra el parásito. El grado de parasitemia durante el período de infección se determinaba contando el número de parásitos presentes en la sangre mediante un hemocitómetro (ver diagrama de estrategia de trabajo, punto No. 2).

**5. Obtención de células de bazo inmunes y no-inmunes:** los bazos de todos los ratones Balb/C inmunes [3] fueron extraídos y las células se obtuvieron por perfusión con medio RPMI 1640. La suspensión celular se dejó sedimentar 5 min. para separar los trozos gruesos, luego se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 min. Al pellet resultante se le agregó la solución de lisis (ver apéndice) para romper a los glóbulos rojos durante 5 min., posteriormente las células se lavaron con 16 ml de medio RPMI 1640 centrifugándose a 1500 r.p.m. durante 5 min. Al pellet se le agregó de 1 a 3 ml de medio RPMI 1640 y tomando una muestra de 10  $\mu$ l se preparó una dilución 1/100 para contar las células con un hemocitómetro. Se realizó una dilución con medio RPMI 1640 para ajustar la concentración a  $1 \times 10^{10}$  células/ml. A partir de los ratones cepa Balb/C [4] no infectados se obtuvieron los bazos recibiendo el mismo tratamiento que los bazos inmunes para la obtención de las células de bazo no-inmunes.

**6. Transferencia adoptiva de células de bazo inmunes y no-inmunes:** Ratones cepa Balb/C [5 y 6] se utilizaron como receptores de células de bazo inmunes y no-inmunes a los cuales se inocularon por vía IP  $1 \times 10^8$  células en un volumen de 200  $\mu$ l por cada ratón.

**7. Reto con T. cruzi:** los parásitos que se utilizaron para el reto fueron obtenidos de la sangre de ratones CFW infectados [7]. La sangre fue diluida con medio RPMI 1640 a la concentración de  $1 \times 10^7$  tripomastigotes sanguíneos/ml. Los ratones cepa Balb/C que recibieron las células de bazo inmunes y no-inmunes fueron retados

intraperitonealmente con  $2 \times 10^6$  tripomastigotes sanguíneos por ratón en 200  $\mu$ l 12 h después de la transferencia de las células de bazo [8].

**8. Obtención de suero de ratón:** para la determinación de anticuerpos se obtuvo el suero de los ratones a partir de la sangre obtenida de la cola dilatada por calentamiento, o por punción cardíaca. La sangre se dejó 2 h a temperatura ambiente para la formación del coágulo. Después se centrifugó dos veces a 2500 r.p.m. durante 15 min para la separación del suero. Las muestras de suero se guardaron en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**9. Detección de anticuerpos anti-T. cruzi:** para llevar a cabo la detección de anticuerpos anti-T. cruzi se utilizó la técnica de ELISA indirecto, para lo cual primero se optimizó la técnica respecto al número de epimastigotes por pozo (como antígeno), la dilución del suero y la dilución del conjugado. La optimización de la técnica se realizó de la siguiente manera:

- a) Acoplamiento del antígeno: se utilizó una placa para ELISA con 96 pozos en los cuales se agregó 200  $\mu$ l del antígeno, en este caso son epimastigotes de T. cruzi fijados con p-formaldehído al 2%. Se colocaron 3 diferentes cantidades de epimastigotes:  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$ , dejando secar la placa a temperatura ambiente por 4 días.
- b) Se lavó 4 veces con PBS.T20.
- c) Bloqueo: se utilizó una solución de PBS.T20-BSA al 1% colocando 200  $\mu$ l de esta solución en cada pozo y dejando actuar 2 h a temperatura ambiente.

**d)** Se lavó 4 veces con PBS.T20.

**e)** Sueros: se utilizaron 3 diluciones diferentes: 1/100, 1/1000 y 1/10000 . Se colocaron 100  $\mu$ l de cada dilución en el pozo correspondiente dejándose durante una noche en refrigeración. La placa se cubrió con parafilm.

**f)** Se lavó 4 veces con PBS.T20.

**g)** Conjugado GAM-POD (anticuerpos de cabra específicos a cadenas de inmunoglobulinas de ratón acoplados a peroxidasa): se utilizaron 2 diluciones diferentes: 1/10000 y 1/20000 colocando 100  $\mu$ l de cada dilución en el pozo correspondiente dejando actuar por 2 h a temperatura ambiente.

**h)** Se lavó 4 veces con PBS.T20.

**i)** Sustrato: (TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se colocaron 100  $\mu$ l en los pozos dejando actuar durante 15-20 min en la oscuridad.

**j)** Paro de reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N: se colocaron 100  $\mu$ l en todos los pozos.

**k)** Leer a 450 nm.

## RESULTADOS

Pensando en que la estimulación frecuente del sistema inmune por los tripomastigotes sanguíneos que permanecen constantemente en circulación permite un mayor número de células inmunes activadas y de memoria, se obtuvieron las células de bazo inmunes a T. cruzi las cuales se transfirieron a ratones de la misma cepa singénica tratando de demostrar que estas células inducen protección contra la infección por T. cruzi; para evaluar el efecto de las células inmunes se midió el porcentaje de mortalidad, las curvas de parasitemia y la presencia de anticuerpos en los ratones retados con una dosis letal de T. cruzi.

### 1. PORCENTAJE DE MORTALIDAD.

La determinación del porcentaje de mortalidad se realizó para observar si se llevó a cabo la inducción de la protección contra la infección por T. cruzi mediante la transferencia adoptiva de células de bazo inmunes a partir de ratones donadores inmunes a T. cruzi. El porcentaje de mortalidad se determinó por el número de ratones muertos de cada lote hasta el día 40 post-infección. Este resultado se muestra en la tabla I.

En la tabla I se observa que el porcentaje de mortalidad fue del 100% tanto para los ratones que se infectaron solo con T. cruzi sin recibir ningún tipo de células de bazo como para los que se les transfirieron células de bazo no-inmunes con posterior reto con T. cruzi; comparando este resultado con el porcentaje de mortalidad que

presentaron los ratones que recibieron células de bazo inmunes y se retaron con T. cruzi, que fue del 0%, se observa que los ratones de este último grupo sobreviven indicando que las células de bazo inmunes inducen protección contra la infección por T. cruzi ya que los dos grupos de ratones, anteriormente mencionados, presentan un 100% de mortalidad indicando que no sobreviven a la infección por T. cruzi y concluyéndose que la muerte de los ratones es debida a la infección por T. cruzi; también se observa que los demás grupos de ratones presentaron 0% de mortalidad, que corresponden a los que no se les inoculó nada, a los que se les inoculó medio RPMI y los que recibieron células de bazo inmunes y no-inmunes, por lo que la transferencia de las células de bazo inmunes y no-inmune no fueron la causa de la muerte.

LOTE	No. RATONES	PORCENTAJE DE MORTALIDAD (%)
I	3	0 (0/3)
II	3	0 (0/3)
III	3	0 (0/3)
IV	10	0 (0/10)
V	6	100 (6/6)
VI	5	100 (5/5)
VII	9	0 (0/9)

TABLA I. Mortalidad presentada en ratones receptores de células de bazo inmunes o no-inmunes y retados o sin retar con *T. cruzi*. La dosis de células de bazo inmunes o no-inmunes fue de  $10^8$  células/ratón. La dosis de reto fue de  $2 \times 10^8$  tripomastigotes sanguíneos/ratón. Los ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal. Lote I: ratones sin inocular (control negativo de inoculación); Lote II: ratones inoculados con medio diluyente de células de bazo (RPMI 1640); Lote III: ratones inoculados con células de bazo no-inmunes; Lote IV: ratones inoculados con células de bazo inmunes; Lote V: ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos; Lote VI: ratones inoculados con células de bazo no-inmunes y retados con tripomastigotes sanguíneos; Lote VII: ratones inoculados con células de bazo inmunes y retados con tripomastigotes sanguíneos.

## 2.DETERMINACION DE CURVAS DE PARASITEMIA

Las curvas promedio de parasitemia se determinaron para cada lote de ratones con el fin de conocer el comportamiento de la infección por *T. cruzi*. Dichas curvas se realizaron contando el número de parásitos por ml de sangre en intervalos de 3 días durante un periodo de 40 días o hasta su muerte. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.

## CURVAS PROMEDIO DE PARASITEMIA

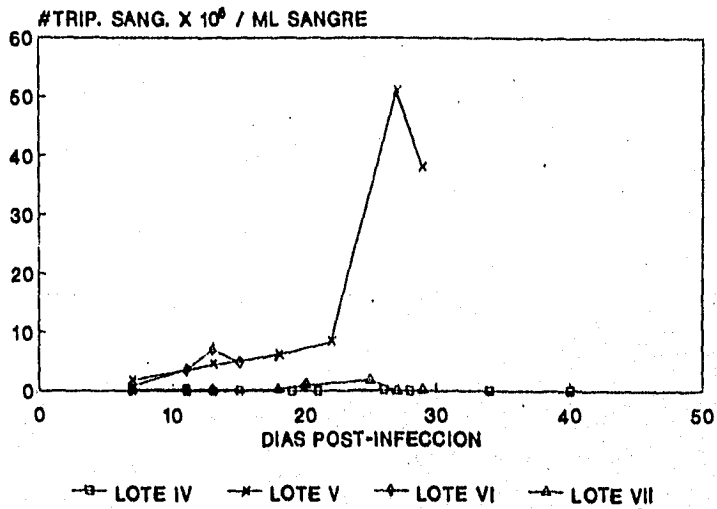


FIG. 6. Determinación de curvas de parasitemia para los diferentes lotes durante los 40 días post-infección. Lote IV: Células de bazo inmunes. Lote V: *T. cruzi*. Lote VI: Células de bazo no inmunes + *T. cruzi*. Lote VII: Células de bazo inmunes + *T. cruzi*. Las curvas de parasitemia correspondientes a los lotes: Lote I: sin inoculación (control negativo). Lote II: Medio RPMI 1640 y Lote III: Células de bazo no inmunes no se presentan porque no se observaron parásitos en los ratones en ningún momento del ensayo y para permitir la visualización de la parasitemia de los lotes IV a VII.



En las curvas promedio de parasitemia obtenidas (Fig.6) se observa que las correspondientes a los ratones sin inoculación y a los que se inocularon con medio de cultivo y con células de bazo no-inmunes, no presentaron parásitos en ningún momento del seguimiento. La curva promedio de parasitemia de los ratones a los que se les transfirieron células de bazo inmunes presenta una baja parasitemia (no mayor a un valor de  $1 \times 10^5$  parásitos/ml de sangre) con respecto a las que muestran los grupos de ratones infectados con T. cruzi posiblemente debido a que algunas células de bazo inmunes se encontraban parasitadas ocasionando la infección a los ratones receptores; la parasitemia presentada a partir el día 23 es casi nula.

Los ratones inoculados con T. cruzi pero que no recibieron células de bazo (lote V) presentan una curva promedio de parasitemia que va en aumento conforme avanza el tiempo con parasitemias muy altas en un intervalo de  $1.8$  a  $51 \times 10^6$  tripomastigotes sanguíneos/ml sangre, la curva a partir del día 29 ya no se continuó porque todos los ratones de ese lote murieron.

La curva promedio de parasitemia de los ratones que recibieron células de bazo no-inmunes y que fueron retados con T. cruzi (lote VI) tiene un intervalo de parasitemia de  $0.8$  a  $7.2 \times 10^6$  tripomastigotes sanguíneos/ml, dicha curva ya no se siguió a partir del día 15 porque todos los ratones murieron.

La curva promedio de los ratones que recibieron células de bazo inmunes y que fueron retados con T. cruzi (lote VII) representa una parasitemia muy baja en

comparación con la de los otros ratones infectados con T. cruzi (lote V y VI) permaneciendo los primeros 18 días constante luego aumentó pero a partir del día 27 disminuyó siendo la parasitemia hasta el día 40 nula, esto nos indica que las células de bazo inmunes transferidas a los ratones receptores confieren protección contra la infección por T. cruzi ya que observando las curvas de los otros ratones infectados con T. cruzi (lote V y lote VI) la parasitemia es mucho menor y los ratones no mueren.

De acuerdo a estos resultados se concluye que las células de bazo inmunes inducen protección contra la infección por T. cruzi y aunque algunas de las células de bazo inmunes que posiblemente se encuentran infectadas no alteran la inducción de la protección contra T. cruzi porque el número de parásitos es muy bajo, las células de bazo no-inmunes no inducen protección contra la infección por T. cruzi sino por el contrario aumentan ligeramente el grado de parasitemia y la mortalidad se presenta en un menor tiempo.

### **3. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-T. cruzi**

#### **3.1. Estandarización de la técnica de ELISA indirecto.**

La técnica de ELISA indirecto se optimizó tomando en cuenta el número de epimastigotes por pozo, la dilución del suero y la dilución del conjugado (ver material y métodos).

Las condiciones óptimas para la realización de la técnica de ELISA indirecto son aquellas que nos den la mayor absorbancia a una menor dilución

del conjugado, dilución de suero y de cantidad de epimastigotes/pozo. Los resultados obtenidos se observan en las figuras 7 y 8.

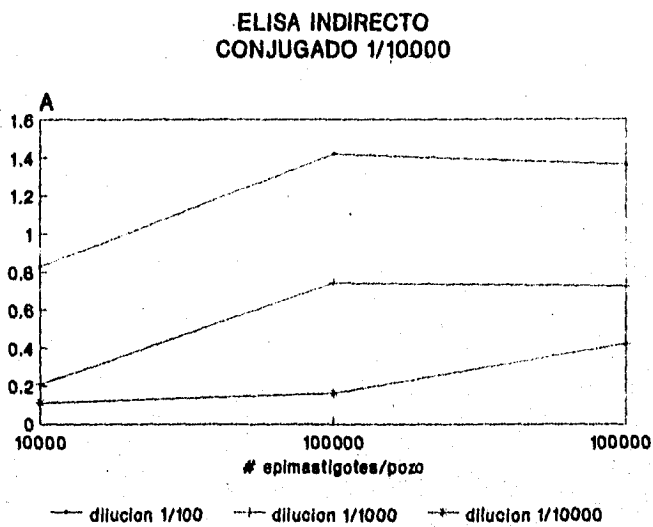
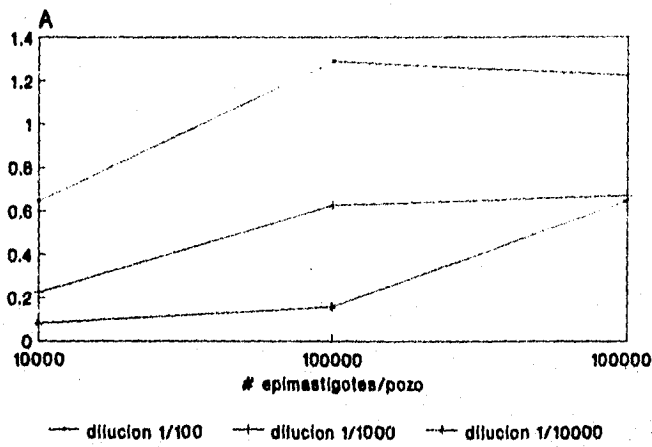


FIG. 7. Estandarización de la técnica de ELISA indirecto. La dilución del conjugado utilizada es de 1/10000 y las tres diferentes cantidades de epimastigotes/pozo y diluciones del suero. La dilución de suero 1/100 muestra los valores más altos de absorbancia.

### ELISA INDIRECTO CONJUGADO 1/20000



OPTIMIZACION

FIG. 8. Estandarización de la técnica de Elisa indirecto. La dilución del conjugado empleada es de 1/20000 y las tres diferentes cantidades de epimastigotes/pozo y diluciones del suero. La dilución de suero 1/100 muestra los valores de absorbancia más altos.

Observando ambas figuras (7 y 8) se muestra que la gráfica 7 presenta los mayores valores de absorbancia por lo que la dilución de conjugado para los estudios subsecuentes es 1/10000. Analizando la misma figura (7) se observa que la dilución del suero que presenta los más altos valores de absorbancia es la dilución 1/100, observando esta misma curva (dilución 1/100) el máximo valor de absorbancia lo presenta la cantidad de  $10^5$  epimastigotes/pozo.

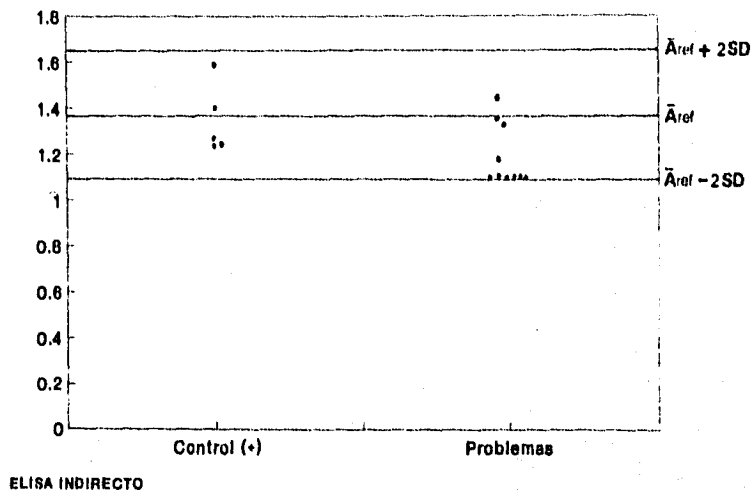
De acuerdo a estos resultados las condiciones óptimas para la realización de la técnica de ELISA indirecto son  $10^5$  epimastigotes/pozo, dilución del suero 1/100 y dilución del conjugado 1/10000 ya que a estas condiciones se obtienen los mayores valores de absorbancia a la menor dilución de suero y conjugado. Con estos datos ya establecidos se realizó la técnica de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-T. cruzi.

### 3.2. Detección de anticuerpos anti-T. cruzi

#### 3.2.1. A partir de los ratones donadores de células de bazo inmunes.

La clasificación de los ratones donadores como inmunes fue realizada en base a la presencia de anticuerpos anti-T. cruzi en sus sueros. La detección de anticuerpos en el suero de los donadores se efectuó mediante la técnica de ELISA indirecto para determinar si los donadores estaban inmunes contra la infección por T. cruzi para que se llevara a cabo la obtención y la transferencia de las células de bazo inmunes.

**DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-*T. cruzi*  
EN RATONES DONADORES DE CELULAS INMUNES**



**FIG. 9.** Análisis de los sueros de los ratones donadores por ELISA indirecto. Los sueros diluidos 1/100 de los ratones donadores se probaron por duplicado mediante un ELISA indirecto en placas de 96 pozos cubiertas con  $10^3$  epimastigotes/pozo fijados con p-formaldehído (ver material y métodos). Las líneas horizontales representan el valor promedio más dos desviaciones estándar ( $\bar{A}_{ref} + 2SD$ ) de las absorbancias de los sueros de referencia. El grupo de sueros de referencia correspondientes a 5 ratones seropositivos.

Para la técnica de ELISA indirecto se empleó como sueros de referencia un grupo de 5 sueros provenientes de ratones positivos a T. cruzi. Se consideró positivo aquel suero problema que presentara una absorbancia mayor a la absorbancia media de los sueros de referencia menos dos desviaciones estándar ( $\bar{A}_{ref} - 2SD$ ) y menor a  $\bar{A}_{ref} + 2SD$  y como negativos aquel que presentara una absorbancia menor a una  $\bar{A}_{ref} - 2SD$ .

En la fig. 9 se observa que de los 10 sueros problemas ensayados para clasificarlos como positivos y negativos, todos fueron positivos y ninguno negativo de acuerdo al criterio mencionado anteriormente. Una vez que los ratones donadores se clasificaron como inmunes o no-inmunes se efectuó la obtención de las células de bazo inmunes y su posterior transferencia a los ratones receptores.

### 3.2.2 Detección de anticuerpos anti-T. cruzi de los ratones empleados en este estudio.

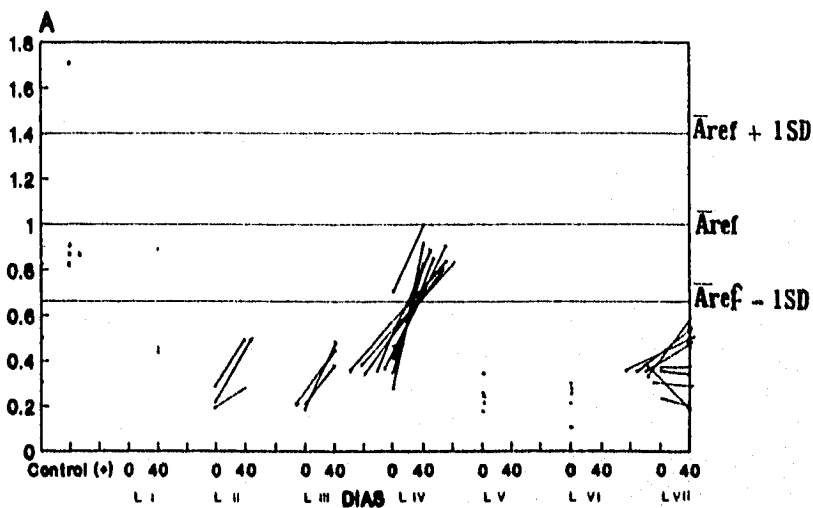
La detección de anticuerpos anti-T. cruzi de los ratones con los que se trabajó en el experimento se realizó a los 0 y 40 días post-infección para conocer el estatus serológico de los ratones receptores antes y después de la infección y observar si se encontraban inmunes a la infección por T. cruzi. La detección de anticuerpos en el suero e los receptores se efectuó mediante la técnica de ELISA indirecto. Los resultados obtenidos se observan en la figura 10.

**FALTA PAGINA**

**No.** 46



## DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-T.cruzi



**ELISA INDIRECTO**

L = Lots

FIG.10 ELISA indirecto para observar el estatus serológico de los ratones receptores. Los sueros de los ratones receptores obtenidos inicialmente y al final del experimento se analizaron por ELISA empleando como referencia un grupo de sueros positivos. Los valores de absorbancias correspondientes a los 2 sueros obtenidos de un mismo receptor están enlazados.

Para la realización de la técnica de ELISA indirecto se utilizaron como sueros de referencia un grupo de 5 sueros provenientes de ratones con anticuerpos anti-T. cruzi (seropositivos). Se consideró positivo aquel suero problema que presentara una absorbancia (A) mayor a la absorbancia media de los sueros de referencia menos una desviación estándar ( $\bar{A}_{ref}-1SD$ ) y menor a la  $\bar{A}_{ref}+1SD$  y como negativo aquel que presentara una A menor a  $\bar{A}_{ref}-1SD$ .

En la figura 10 se observa que un suero de referencia positivo presenta una A mayor a la  $\bar{A}_{ref}+1SD$  esto puede ser debido a un ruido de fondo elevado considerándose así un falso positivo. Los sueros problemas correspondientes a los ratones que no se inocularon (control negativo, lote I) se consideraron negativos excepto por uno cuya A es mayor a  $\bar{A}_{ref}+1SD$  por lo que se considera un falso positivo ya que puede tener alguna sustancia que tenga reacción cruzada con T. cruzi, a este grupo de ratones solo se les determinó a los cuarenta días. Los sueros de los grupos de ratones receptores a los cuales a uno de ellos se les inoculó medio de cultivo y al otro células de bazo no-inmunes (lotes II y III respectivamente) se consideraron negativos a los 0 y 40 días. A los sueros de los grupos de ratones infectados con T. cruzi excepto a los que se les transfirieron células de bazo inmunes (lotes V y VI) se consideraron negativos a los 0 días, a los 40 días no se pudo determinar

si los sueros eran positivos o negativos debido a que los ratones murieron mucho antes de finalizar el estudio.

Los sueros obtenidos a los 0 días de los ratones que recibieron células de bazo inmunes (lote IV) fueron negativos y a los 40 días fueron positivos, esto se debe a que al presentar parasitemia posiblemente debido a que algunas células de bazo inmunes estaban infectadas se logró la activación del sistema inmune del ratón receptor llevándose así la producción de anticuerpos. Los sueros obtenidos a los 0 y 40 días de los ratones que recibieron células de bazo inmunes y posteriormente retados con T. cruzi se consideraron negativos de acuerdo al criterio anteriormente planteado. En este caso se esperaba que a los 40 días existieran anticuerpos pero estos resultados nos demuestran lo contrario por lo que se sospecha de una inmunosupresión en donde la producción de anticuerpos se ve alterada, en este caso disminuida.

## DISCUSION

En la enfermedad de Chagas, se ha visto la participación de la respuesta inmune humoral y celular. En trabajos como los de Thomas M. Trischmann y Barry R. Bloom (1980), M.E. Rottenberg y E.L. Segura (1990), Donald E. Burgess y William Hanson (1979) se ha demostrado que la inmunidad celular participa de manera activa en la protección contra la infección por T. cruzi. En este estudio se trató de generar una amplia producción de células inmunes a T. cruzi, para ello se requería de un antígeno que permaneciera constantemente en circulación para la estimulación frecuente del sistema inmune celular, en los trabajos anteriormente mencionados se utilizó la fase de epimastigote de T. cruzi como inmunógeno, estos son capaces de infectar pero la probabilidad de que sobrevivan y se transformen a la fase de tripomastigote sanguíneo es muy baja, por tanto se requieren de varios refuerzos para asegurar una mayor activación de células inmunes; para evitar la generación de un bajo porcentaje de células inmunes, en este trabajo se empleó como inmunógeno la fase de tripomastigote sanguíneo puesto que al permanecer constantemente en circulación estimularía una mayor cantidad de células inmunes a T. cruzi presentándose la ventaja de evitar la inoculación con varios refuerzos.

El porcentaje de mortalidad observado en el grupo de ratones receptores de células de bazo inmunes y retados con una dosis letal de T. cruzi (lote VII) fue del 0% indicando sin lugar a dudas que la protección se debe exclusivamente a las células del ratón inmune lo

cual se demuestra al observar que el 100% de los ratones inoculados con células de bazo no-inmunes mueren al igual que los ratones infectados con T. cruzi, sin recibir células de bazo.

Los resultados relacionados a las curvas de parasitemia muestran que la presencia de parásitos en sangre se debe a la inoculación con T. cruzi, ya que los ratones retados con este parásito muestran parasitemia. Pero también se observa que los ratones que no se les inoculó T. cruzi pero se les transfirió células de bazo inmunes muestran parasitemia, esto se debe posiblemente a que algunas células de bazo inmunes estaban infectadas con amastigotes y que al transferirse a ratones receptores estos se infectaron.

El efecto protector de las células de bazo inmunes se observa en la curva promedio de parasitemia de los ratones que se les transfirieron estas células y se retaron con T. cruzi, para los que se observa que el nivel de parasitemia fue tan bajo que nunca fue mayor a  $10^3$  tripomastigotes sanguíneos por ml sangre, incluso al día 28 bajó a cero el nivel de parasitemia. El tipo de células que conforman la población de células de bazo inmunes son linfocitos T, B, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, las cuales se ha visto que se activan quedando muchas de ellas como células de memoria para el reconocimiento del antígeno en posteriores inoculaciones con el parásito, por lo tanto, dichas células al transferirse a ratones receptores que posteriormente se retaron con una dosis letal de tripomastigotes sanguíneos entraron en contacto nuevamente con el antígeno activando de una manera más rápida, y al haber células de memoria, éstas reconocen rápidamente al antígeno formando así una barrera de defensa contra la infección por T. cruzi que estimularían las células del sistema inmune del ratón receptor; mientras las células de bazo inmunes transferidas llevan a cabo

estos efectos contra los tripomastigotes de T. cruzi las células del huésped se comienzan a activar y posteriormente llevan a cabo los mismos efectos.

Comparando las curvas de parasitemia para los ratones receptores de células de bazo no-inmunes y retados con T. cruzi y para los retados con T. cruzi sin recibir células de bazo, se observa que el tiempo en que murieron los ratones es menor para los primeros que los infectados con T. cruzi posiblemente debido a que las células de bazo no-inmunes transferidas, de alguna manera afectan al sistema inmune del ratón receptor, tal vez como un efecto inmunosupresor lo que origina que el ratón receptor se encuentre inmunocomprometido y por la infección que presenta por T. cruzi, ésta se desarrolla de manera letal en un menor tiempo que en el que ocurre en una infección normal.

Respecto a la presencia de anticuerpos anti-T. cruzi en los ratones ensayados, se observó que los sueros correspondientes a los ratones sin inoculación (lote I), a los que se les inoculó medio de cultivo (lote II) y a los que se les transfirieron células de bazo no-inmunes fueron negativos de acuerdo al criterio anteriormente mencionado (ver resultados) a los 0 y 40 días, esto se debió a que los ratones no fueron retados con T. cruzi y por consiguiente los ratones receptores no estuvieron en contacto con el parásito y entonces no se estimuló al sistema inmune. Esto también nos indica que tanto en el medio como en las células de bazo no-inmunes no hay alguna sustancia que tenga reacción cruzada con el tripomastigote sanguíneo.

Con respecto a los sueros correspondientes al grupo de ratones que recibieron células de bazo inmunes y que se retaron con T. cruzi estos fueron negativos tanto a los 0 como a los 40 días esperando que fueran positivos, quizá no lo fueron por la supresión del sistema inmune (inmunosupresión) del ratón receptor por T. cruzi debido a la acción que éste ejerce sobre las células de bazo como lo demostró Ramos, et.al en 1978 y Cunningham en 1980, y más específicamente sobre la actividad de las células T ( Reed et al en 1983). Debido a la inmunosupresión de las células T y de la producción de IL-2 la cual es necesaria para la estimulación pararia y autocrina de las células T no se lleva a cabo la estimulación de la producción de las otras citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 capaces de la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas y de la producción de anticuerpos que en este caso serían específicos para los tripomastigotes de T. cruzi, es por ello que a los 40 días no se detectan anticuerpos anti-T. cruzi.

Los sueros de ratones a los cuales se les transfirieron células de bazo inmunes y que no se retaron con T. cruzi a los 40 días son positivos posiblemente debido a que algunas células de bazo inmunes transferidas estaban infectadas presentándose así el antígeno de T. cruzi al sistema inmune y por lo tanto se llevó a cabo la producción de anticuerpos. En este caso no se pudo llevar a cabo la inmunosupresión ya que esta depende de la concentración del antígeno, en este caso de la dosis de inoculación con el parásito como observaron Ramos etal(1979) y Maleckar y Kierszenbaum (1983), el primero observó que ciertos número de parásitos presentes en las células de bazo infectadas pueden ser responsables de que no se presente la supresión debido a un menor número de parásitos como sucede en nuestro caso donde los parásitos presentes en las células de bazo inmunes son muy pocos en cambio

Maleckar y Kierszenbaum mostraron que a mayores concentraciones de T. cruzi se llevó a cabo la inmunosupresión. Es por ello que en este caso no se presenta la inmunosupresión ya que el número de parásitos es relativamente pequeño como se puede observar en la curva promedio de parasitemia correspondiente, en cambio, la inmunosupresión se observa en el grupo de ratones que recibieron células de bazo inmunes y que se retaron con una dosis letal de T. cruzi ya que posiblemente se tiene un mayor número de parásitos debido al reto con T. cruzi aunque se haya llevado a cabo la inducción de la protección contra la infección por T. cruzi.



## CONCLUSIONES

1. La infección de tripomastigotes sanguíneos en ratones inducen la producción de células de bazo inmunes a T. cruzi.
2. Las células de bazo inmunes a T. cruzi, provenientes de ratones infectados y que han presentado parasitemia por 4 semanas, son capaces de proteger al 100% de los ratones que reciben estas células, cuando son infectados con una dosis letal de T. cruzi.
3. El hecho de que T. cruzi se encuentra constantemente en sangre y que por lo tanto sus antígenos estimulan frecuentemente el sistema inmune del huésped apoya los trabajos relacionados en la obtención de vacunas en las que antígenos se están poniendo constantemente en contacto con el sistema inmune del huésped tal como las vacunas a base de DNA en las que al inocular estas moléculas que codifican para un antígeno de un parásito, son expresados en el huésped de manera constante.

## APENDICE

Modo de preparación de las soluciones empleadas en los diferentes métodos utilizados.

### 1. Mantenimiento de T. cruzi en ratón y Obtención de ratones inmunes.

Dulbecco's PBS (DPBS):

NaCl	8 g	138 mM
KCl	0.2 g	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g	8.1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g	1.2 mM
H <sub>2</sub> O mega	1000 ml	

pura

Filtrar por una membrana de 0.22  $\mu$ m y esterilizar en autoclave. Se conserva indefinidamente a T ambiente.

### 2. Detección de anticuerpos anti-T. cruzi.

a) p-formaldehído al 2% :

p-formaldehído	2 g
H <sub>2</sub> O destilada.	100 ml

b) PBS.T20 : NaCl 0.15 M, NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 10 mM, pH=7.8, 0.05% tween 20

Stock 10x :	NaCl	90 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	13.8 g
	H <sub>2</sub> O bidestilada	900 ml
	Disolver	
	Ajustar pH a 7.8 con NaOH 5M	
	Aforar a	995 ml
	Filtrar sobre membrana de 0.2 μm	
	Tween 20	5 ml

Se conserva 6 meses a T ambiente.

c) PBS.T20-BSA al 1% :

PBS.T20 10x	10 ml
H <sub>2</sub> O dest.	90 ml
BSA (albúmina sérica bovina)	1 g

d) K<sub>3</sub> Fe(CN)<sub>6</sub> : Stock 100x:

K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0.33 g
H <sub>2</sub> O dest.	100 ml

Se conserva 6 meses a T ambiente.

e) TMB 100x:

3,3',5,5' tetrametil- 13 mg

benzidina

DMSO 1 ml

Guardar a 4° en la oscuridad.

f) H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> 130 mM(100x):

H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> al 30% 143 µl

H<sub>2</sub> O bidest. 10 ml

Guardar por lo menos 1 mes a

T ambiente.

g) Buffer para sustrato: 0.1M acetato de sodio/Acido cítrico pH=6.0

Acido cítrico 0.1M (50ml):

Ac. cítrico monohidrato 1.05 g

H<sub>2</sub> O bidest. 50 ml

Acetato de sodio 1.36 g

H<sub>2</sub> O dest. 80 ml

Disolver

Agregar ácido cítrico 0.1M hasta la  
obtención de pH = 6.0

H<sub>2</sub>O dest. Aforar a 100 ml

Filtrar sobre membrana de 0.2 µm

Guardar a 4° C

**h) Conjugado GAM-POD (anti-γ -globulina de ratón-peroxidasa):**

**Diluyente:**

K<sub>3</sub> Fe(CN)<sub>6</sub> 100% 100 µl

PBS.T20-BSA al 1% 9.9 ml

**Conjugado:**

**Dilución 1/10000**

GAM-POD 4 µl

Diluyente 400 µl

**Dilución 1/20000**

Conjugado 1/10000 40 µl

Diluyente 3.96 µl

i) Sustrato a preparar al momento de su uso:

Buffer para sustrato	9.8	ml
TMB 100	100	µl
Agitar		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100	100	µl

j) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N:

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. (36N)	10	ml
H <sub>2</sub> O dest.	350	ml

### 3. Obtención de células de bazo inmunes y no inmunes:

a) Medio RPMI 1640:

Medio RPMI 1640	16.2	g
H <sub>2</sub> O dest.	1000	ml

b) Solución para lisis de eritrocitos:

NH <sub>4</sub> Cl	2.08	g
KHCO <sub>3</sub>	0.25	g
EDTA.2Na	0.009	g
H <sub>2</sub> O dest.	250	ml

Filtrar por una membrana de 0.22  $\mu$ m  
y esterilizar en autoclave. Se - -  
conserva indefinidamente a T amb.

**4. Transferencia de células de bazo inmunes y no-inmunes y reto con T. cruzi.**

**Medio RPMI 1640:**

Medio RPMI 1640    16.2 g

H<sub>2</sub>O dest.            1000 ml

## BIBLIOGRAFIA

1. Tay Zavala Jorge, Lara A. Ramón, Velasco C. Oscar., Parasitología Médica., Méndez Editores S.A. DE C.V., 5a. ed., 1991., México, D.F.
2. Miercio, E.A. Pereira. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*., Pag. 64-78.
3. Botero David., Restrepo Marcos., Parasitosis Humanas, Ediciones Corporación para Investigaciones Biológicas., 1a. ED., 1987., Medellín Colombia., Pag. 239-254.
4. Garry B., Takle and David Snary., Immunology and molecular biology of parasitic infections., Kenneth S. Warren., Blackwell Scientific Publications. Boston USA., Third edition, 1993, Pag. 213-236.
5. Tizard Ian., Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis., ED. CRC, 1985., EEUU.
6. Fernando Villalta, H. Stuart Ponkratz and Felipe Kierszenbaum. Extracelular killing of *T. cruzi* amastigotes by humano eosinophils. *Journal Protozool.*, 34(3), 1978, pag. 285-290.



7. Felipe Kierszenbaum and Marcelo D. Szein. Chagas disease (American Trypanosomiasis). In parasitic infections and the immune system. Kierszenbaum F. Academic Press. INC. USA. pag. 53-87.

8. Rottenberg M.E., Cardoni R.L., and Segura E.L., Involvement of L3T4+, LYT2.2+ T cell subsets and non-T cells in the resistance of mice against *Trypanosoma cruzi* infection. International Journal for Parasitology. Vol. 20 No. 3 pag.397-400, 1990. Impreso en Gran Bretaña.

9. N. Nogueira, J. Ellis, S. Chaplan and Z. Cohn. *Trypanosoma cruzi*: In vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. Experimental Parasitology, Vol. 51. pag. 325-334, 1981. The Rockefeller University New York N.Y. 10021 USA.

10. Tay Jorge, Schenone Hugo, T. Sánchez José, Robert Lilia. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Bol. Chil. Parasitol., 1992, 47: 43-53.

11. Umekita F. Lilia and I. Mota. In-vitro lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: Role of C3b receptors. PAHO/WHO Immunology Research and Training Center, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil. Parasite Immunology. 1989, 11, pag. 561-566.

12. N. Mchardy. Passive protection of mice against infection with *Trypanosoma cruzi* with plasma: The use of blood-and vector bug-derived trypomastigote challenge. *Parasitology.*, 1980, Vol. 80 pag. 471-478.

13. Ouaiissi MA, Cornette J., Capron A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1986; 19:201.

14. Velge P., Ouaiissi MA., Cornette J., Afchain D., Capron A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: Possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology.* 1988; 97:255.

15. Cazzullo JJ. Protein and aminoacid catabolism in *Trypanosoma cruzi* *Comp. Biochem. Physiol.* 1984;79B:309.

16. Pereira MEA. A Developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science*, 1983;219:1444.

17. Harth G., Haidaris G., SoM. Neuraminidase formó *Trypanosoma cruzi*: Analysis of enhanced expression of the enzyme in infectivos form. *Proc. Natl Acad. SCI. USA.* 1987;84:8320.

18. Cossio PM., Diez C, Szarfman A., Kreutzer E., Candiolo B., Arana RM. Chagasic cardiomyopathy: Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 1974;49:13.

19. Cossio PM., Laguens PR., Kreutzer E., Diez C., Segal A., Arana RM. Chagasic cardiomyopathy: Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*, 1974; 50:1252.

20. Schmunis, G.A., Szarfman, A., Langerbach, T., and Desouza, W. Induction of capping in blood stage trypanastigotes of *Trypanosoma cruzi* by human anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, *Infect. Immun.* 1978, 20,567.

21. Kloetzel, J. and Deane, M.P., Presence of immunoglobulins on the surface of bloodstream *Trypanosoma cruzi* capping during differentiation in culture. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, 1977 19:397.

22. Krettli, A.U., and Eisen, H., Escape mechanisms of *Trypanosoma cruzi* from the host immune system, in *seminaire INSERM: Relations Hote-Parasite Dans les affectivas parasitaire naturelles experimentales*, Seillac, France, JUL. 1980.

23. Cossio PM., Laguens RP., Kreutzer E., Diez C., Segal A., Arana RM. Chagasic cardiopathy: Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *AM. J. Pathol.* 1977;86:533.

24. Wood JN., Hudson L., Jessell TM., Yamamoto M. A monoclonal antibody defining determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature*, 1982; 296:34.
25. Ribeiro Dos Santos R., Hudson L. *Trypanosoma cruzi*: Immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 1980; 40:36.
26. Petry K., Nudelman E., Eisen H., Hakomori S. Sulphated lipids represent common antigens on the surface of *Trypanosoma cruzi* and mammalian tissue. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1988; 30:113.
27. Bretana A., O'Daly J.A. Uptake of fetal proteins by *Trypanosoma cruzi* immunofluorescence and ultrastructural studies. *Int. J. Parasitol.*, 1976; 6:379.
28. Williams GT., Fielder L., Smith H., Hudson L. Adsorption of *Trypanosoma cruzi* proteins to mammalian cells in vitro. *Acta Trop.* 1985; 42:33.
29. Peyrol S. Ouassi MA., Capron A., Grimaud J A., *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural visualisation of fibronectin bound to culture forms. *Exp. Parasitol.*, 1987; 63:112.
30. Donald E. Burgess and William C. Hanson. Adoptive transfer of protection against *Trypanosoma cruzi* with lymphocytes and macrophages. *Infection and Immunity.*, 1979; VOL. 25, No. 3, pag. 838-843.

31. Kierszenbaum F., Hayes MM. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infections: Requirements for cellular destruction of circulating forms of *Trypanosoma cruzi* in human and murine in vitro systems. *Immunology*, 1980; 40:61.

32. Okabe K., Kipnis TL., Calich VLG., Diasda Silva W. Cell mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1980; 16:344.

33. Kipnis TL., Jamen SL. Sher A., David J.R., Cell mediated cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980; 30:47.

34. Umekita LF., Mota I. In vitro lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: Role of C3b receptors. *Parasite Immunol.*, 1989 11:561.

35. Rimoldi MT., Cardoni RL., Olabuenaga SE., De Bracco MM. *Trypanosoma cruzi*: sequence of phagocytosis and cytotoxicity by human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology*, 1981; 42:521.

36. Villalta F., Kierszenbaum F. Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. Uptake and mechanism of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils. *J. Immunol.*;1983; 131:1504.

37. Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanism of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human eosinophils. *J. Immunol.*, 1983; 131:1504-1510.

38. Nogueira N., Cohn Z., *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 1976; 143:1402.

39. Milder R., Koetzel J., The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages in vitro, interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology*, 1980; 80:139.

40. Nathan C., Nogueira N., Juangbhanich C., Ellis J., Cohn Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro: correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, 1979; 149:1056.

41. Nogueira N., Klebanoff S., Cohn Z. *T. cruzi*: Sensitization to macrophage killing by eosinophil peroxidase. *J. Immunol.*, 1982; 128:1705.

42. Nickell SP., Gebremichael A., Hoff R., Boyer M.H. Isolation and functional characterisation of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 1987; 138:914.

43. Reed SG, Nathan CF, Dhill DL, ET AL. Recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide, comparison with interferon gamma. *J. Exp. Med.*, 1987; 166:1734.

44. Rottenberg M, Cardoni R L, Andersson R, Segura E L, Orné A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol.*, 1988; 28:573.

45. Hatcher FM., Kuhn RE. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science*, 1982; 218:295.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA